



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Tesis de Doctorado

“Farmacocinética y Farmacodinamia intracelular de antimicrobianos utilizados en la terapia de la mastitis subclínica bovina producida por *Staphylococcus aureus*”

Luis Alejandro Moncada Cárdenas

2017



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

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

**“Farmacocinética y Farmacodinamia intracelular de antimicrobianos
utilizados en la terapia de la mastitis subclínica bovina producida
por *Staphylococcus aureus*”**

Autor: M.V. MONCADA CÁRDENAS, Luis Alejandro

Director: Doctora Nora Mestorino

Lugar de trabajo: Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y
Terapéutica .**Facultad de Ciencias Veterinarias.**
Universidad Nacional de La Plata

Miembros del Jurado:

Doctor. Alejandro Luis Soraci
Doctor. Luis Calvinho
Doctora. Magdalena Rambaud

TÍTULOS Y RESÚMENES

Título: *Farmacocinética y Farmacodinamia intracelular de antimicrobianos utilizados en la terapia de la mastitis subclínica bovina por Staphylococcus aureus*

Palabras claves: Mastitis subclínica, *Staphylococcus aureus*, Intracelular, Farmacocinética, Farmacodinamia, Antibacterianos.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis doctoral, tuvo como objetivo realizar un aporte al conocimiento de la farmacocinética (PK) intracelular (IC) de azitromicina, danofloxacina y penicilina G, así como, establecer la relación entre ésta y la interacción farmacodinámica (PD) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica. Se aislaron un total de 220 cepas, de las que se seleccionaron 10 cepas que cumplieran con las características morfológicas y bioquímicas propias de *S. aureus* y que fueron además, sensibles a todos los grupos de antibacterianos ensayados. Las 10 cepas seleccionadas fueron sometidas a pruebas de sensibilidad para determinar la CIM de cada uno de los antibacterianos (ATB) a pH fisiológico de 7.4, así como suponer condiciones de pH intracitoplasmático y fagolisosomal, estas pruebas se repitieron a pH 5.0 y 6.5. De igual forma, en las mismas tres condiciones de pH, se realizaron estudios encaminados a determinar la cinética de muerte bacteriana por medio de curvas de letalidad y la determinación del efecto post antibiótico (PAE) de cada uno de los antibacterianos. Posteriormente, en leucocitos polimorfonucleares (PMN) extraídos de sangre y leche bovina, se realizaron pruebas de infección controlada con *S. aureus*, con la finalidad de medir el efecto que surten los ATB a nivel IC. Así como determinar la velocidad de penetración del ATB al interior celular, la cantidad de ATB que penetra al interior celular y su eflujo. Esto permitió realizar una integración de los parámetros PK – PD a nivel IC. La cuantificación de los analitos se llevó a cabo mediante métodos microbiológicos y por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Nuestros estudios nos permitieron cuantificar la cantidad de ATB que penetra al interior celular y observar el efecto que tienen a ese nivel sobre las cepas de *S. aureus* fagocitadas. Se determinó que las cepas de *S. aureus* intracelulares tratadas con dosis terapéuticas de los 3 antibacterianos, por espacio de 5 horas, sufrieron una reducción de entre 1.8 a 2 Log₁₀. Este estudio permite concluir entonces que azitromicina, danofloxacina y penicilina G, presentan penetración intracelular, y su eficacia difiere en las concentraciones que estos alcanzan a nivel IC y el tiempo de permanencia dentro de la célula.

ABSTRACT

The present doctoral thesis aimed at contributing to the knowledge of the pharmacokinetics (PK) intracellular (IC) of azithromycin, danofloxacin and penicillin G, and establish the relationship of the pharmacodynamic interaction (PD) versus *Staphylococcus aureus* strains isolated from infected cows with subclinical mastitis. A total of 220 strains were isolated. Ten strains that met morphological and biochemical characteristics typical of *S. aureus* and were sensitive to all antibacterial groups were selected. The ten selected strains were tested for sensitivity to determine the CIM for each of the three antibiotics (ATB) at a physiological pH of 7.4, and assuming both intracytoplasmic and phagolysosomal pH conditions, these experiments were repeated at pH 6.5 and 5.0 Likewise, at the same three pH conditions, studies to determine death kinetics of bacteria by killing curves and recognition of post antibiotic effect (PAE) of each of the antibiotics were performed. Subsequently, testing with controlled infection of *S. aureus* in order to measure the effect that supply the ATB at IC level were performed in polymorphonuclear leukocyte (PMN) extracted from blood and bovine milk, including determining the rate of penetration of the ATB into the cell, the amount of ATB that penetrates the cell interior and its efflux. This allows integration of PK - PD parameters at IC level. In all cases, quantitation of the analytes was performed by microbiological and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods. Our studies allow us to quantify the amount of ATB that penetrates the cell interior and observe the effect at that level on strains of *S. aureus* phagocytosed. It was determined that the intracellular *S. aureus* strains treated with a therapeutic doses of 3 antibacterial, for 5 hours were reduced by between 1.8 to 2 Log₁₀.

This study allows to conclude that azithromycin, danofloxacin and penicilna G, they have intracellular penetration, and their effectiveness differs in that these concentrations reach IC level and residence time within the cell.

DEDICATORIA

PARA:

JUSTO PASTOR Y CARMEN ELISA

Dioses vivos, por enseñarme a vivir, a pensar, a soñar y sobre todo por tolerar toda mi impaciencia y desacato.

LUZ AMPARO, CARLOS ALBERTO, LILIA BIBIANA, DANIELITO

Compañeros de viaje, por permitirme ser parte de su hermoso árbol de vida y estar siempre en esos precisos momentos.

JUAN FELIPE

Por todos los días, los meses y los años que me perdí de tu entrañable compañía.

SANTI

Porque... ya sabes, todo es posible!

A LA RAYUELA DE LA VIDA MISMA.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra NORA MESTORINO. Directora de esta tesis, infatigable investigadora y generoso ser humano, porque sin su confianza, apoyo, colaboración, circunspección, y sobre todo, amor por su trabajo, este proyecto no hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional de La Plata por darme la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral, a la Facultad de Ciencias Veterinarias, y especialmente a la cátedra de farmacología, farmacotecnia y terapéutica, lugar donde llevé adelante este proyecto.

Al Dr Jorge Errecalde por recibirme en su grupo de trabajo y permitirme trabajar a su lado con humor y gentileza.

A Martin Daniele. Gran amigo, compañero de viajes y tertulias, transcendental ayuda en muchos de los ensayos de esta tesis y gran apoyo en los momentos difíciles.

A la Dra Laura Marchetti. Admirable compañera, ecuánime profesional y generoso ser humano a quien debo gran parte de este trabajo.

A Martin Dadé. Por su gran ayuda en la facultad de medicina, pero sobretodo por brindarme su hogar y entretenidas noches de lectura.

A todos mis compañeros de trabajo de la Cátedra de farmacología, farmacotecnia y terapéutica, a los que están y los que estuvieron, que aportaron su tiempo y trabajo, para que este proyecto se hiciera realidad. Especialmente a Martín Quintero, Bárbara Huber, Mariana Lucas, Andrea Lambertini, Carlos valle y Naty Gonzales.

A la Cátedra de Farmacología Básica de la facultad de medicina de la UNLP, donde me abrieron las puertas y estuvieron dispuestos a ayudarme siempre, especialmente al Dr Guillermo Schinella.

A Edwin Salgado, Walter Ledezma y Martita! Mis grandes amigos en la ciudad de la plata.

Por ultimo y en especial a mis padres y mis hermanos por su apoyo y paciencia.

A TODOS MIL Y UN MILLON DE GRACIAS!!!

INDICE

TÍTULOS Y RESÚMENES	iii
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE	viii
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE TABLAS	xx
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xxv
1. INTRODUCCION	28
1.1. MASTITIS BOVINA	28
1.1.1. Generalidades	28
1.1.2. Impacto de la mastitis en la República Argentina	33
1.1.3. Género <i>Staphylococcus</i>	39
1.1.4. Identificación de la problemática.....	49
1.2. USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA MASTITIS BOVINA	55
1.2.1. Tratamiento parenteral.....	58
1.2.2. Tratamiento intramamario.....	63
1.3. PENETRACIÓN INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS	67
1.3.1. Parámetros físicoquímicos que controlan la penetración intracelular de antibióticos	67
1.3.2. Mecanismos de penetración intracelular de los antibióticos.....	70
1.3.3. Penetración de los diferentes grupos antibióticos en el interior de los PMN	72
1.4. BASES FARMACOLÓGICAS PARA HACER FRENTE A LA PROBLEMÁTICA	74
1.4.1. Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos	76
2. HIPÓTESIS	84
2.1. Premisas.....	84
2.2. Formulación de hipótesis	85
3. OBJETIVOS	86
3.1. Objetivos generales	86
3.2. Objetivos específicos.....	86
4. MATERIALES Y MÉTODOS	88
4.1 MATERIALES	88
4.1.1 Productos biológicos y materiales para microbiología	88
4.1.2 Reactivos, solventes y diluyentes.....	88
4.1.3 Material descartable y de laboratorio	89
4.1.4 Instrumental.....	91
4.1.5 Equipamiento Informático.....	92
4.2. MÉTODOS	92
4.2.1 Selección de cepas y pruebas bioquímicas.....	92

4.2.1.1. Tinción de Gram.....	93
4.2.1.2. Prueba de catalasa.....	95
4.2.1.3. Prueba de coagulasa.....	96
4.2.2. Estudio de susceptibilidad por antibiograma.....	97
4.2.2.9. Selección de los antimicrobianos a evaluar.....	103
4.2.3. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CIM).....	104
4.2.4. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	111
4.2.5. Curvas de letalidad bacteriana (CLB).....	112
4.2.6. Determinación del Efecto Posantibiótico (PAE).....	122
4.2.7. Captación y actividad intracelular de los antimicrobianos seleccionados.....	134
4.2.8. Cinética intracelular.....	146
4.2.9. Diseño y corroboración a campo de un régimen de dosificación racional.....	147
4. RESULTADOS.....	148
5.1. SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	148
5.2. PRUEBA CUANTITATIVA PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA.....	152
5.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA.....	157
5.4. CURVAS DE LETALIDAD O MUERTE BACTERIANA.....	161
5.4.1. AZITROMICINA.....	162
5.4.2. DANOFLOXACINA.....	204
5.4.3. PENICILINA G.....	247
5.5. ÍNDICE DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	292
5.6 EFECTO POSTANTIBIOTICO.....	309
5.6.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO IN-VITRO.....	310
5.6.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO IN-VIVO.....	319
5.7. CAPTACION Y ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS.....	328
5.8. CINETICA INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	338
5.8.1. AZITROMICINA.....	338
5.8.2. DANOFLOXACINA.....	340
5.8.3. PENICILINA G.....	342
6. DISCUSION.....	346
6.1. ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD POR ANTIBIOGRAMA.....	346
6.2. SELECCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS.....	354
6.2.1 <i>Azitromicina</i>	354
6.2.2 <i>Danofloxacina</i>	358
6.2.3. <i>Penicilina G</i>	363
6.3 CURVAS DE LETALIDAD BACTERIANA.....	367
6.3.1. <i>Azitromicina</i>	368
6.3.2. <i>Danofloxacina</i>	370
6.3.3. <i>Penicilina G</i>	373
6.3.4. ÍNDICE DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	375
6.4. EFECTO POSTANTIBIOTICO (PAE).....	380
6.4.1. EVALUACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES.....	380
6.4.2. EVALUACION DE RESULTADOS DE PAE “ <i>IN VITRO</i> ”.....	383
6.4.3. EVALUACION DE RESULTADOS DE PAE “ <i>In Vivo</i> ”.....	385
6.5 CAPTACION Y ACTIVIDAD DEL ANTIBACTERIANO A NIVEL INTRACELULAR.....	388

6.5.1. Técnicas para determinar la penetración de los antibióticos en el interior celular	389
6.5.1.1 AZITROMICINA	390
6.5.1.2. DANOFLOXACINA	391
6.5.1.3. PENICILINA G	392
6.6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ANTIMICROBIANOS A NIVEL INTRACELULAR	393
6.7. CINETICA INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .	398
6.7.1. AZITROMICINA	398
6.7.2. DANOFLOXACINA	400
6.7.3. PENICILINA G	402
7. CONCLUSIONES.	405
8. BIBLIOGRAFIA.	408

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos.
- Figura 2.** Morfología y tinción de Gram del género *Staphylococcus*.
- Figura 3.** Cultivo de *Staphylococcus* spp.
- Figura 4.** Principales factores de virulencia de *S. aureus*.
- Figura 5.** Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección. El *S. aureus*.
- Figura 6.** Localización intracelular de algunos microorganismos.
- Figura 7:** Triángulo de Davis: Interacción huésped-microorganismo-antimicrobiano. *Adaptado de Van Bambeke F, 1999.*
- Figura 8:** Factores determinantes de la actividad antimicrobiana. *Adaptado de Van Bambeke F, 1999.*
- Figura 9:** Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos que gobiernan la eficacia antimicrobiana: $C_{m\acute{a}x}/CIM$, ABC/CIM y $T>CIM$.
- Figura 10.** Diferencias estructurales entre bacterias Gram+ y Gram–.
- Figura 11.** Antibiograma correspondiente a un aislamiento de *S. aureus* causante de mastitis
- Figura 12.** Preparación de diluciones seriadas de los antimicrobianos para la determinación de la CIM por el método de macrodilución en caldo.
- Figura 13.** Lectura y determinación de la CIM.
- Figura 14.** Colonias de *S. aureus* en agar sangre.
- Figura 15.** Presencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias de *S. aureus* en agar sangre.
- Figura 16.** Apariencia de *S. aureus* a la prueba de Gram.
- Figura 17.** Comparativo entre una prueba positiva y una negativa a la prueba de catalasa, la emisión de burbujas (Imagen inferior) indica positividad en la prueba.
- Figura 18.** Prueba de coagulasa en tubo.
- Figura 19.** Resultado de la prueba de determinación de la CIM por el método de macrodilución
- Figura 20.** CIM de azitromicina frente a *S. aureus* a diferentes pHs.
- Figura 21.** CIM de danofloxacina frente a *S. aureus* a diferentes pHs.
- Figura 22.** CIM de penicilina G frente a *S. aureus* a diferentes pH.
- Figura 23.** Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 7.4.
- Figura 24.** Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a azitromicina en CMH a pH 7.4.
- Figura 25.** Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 26. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (0.25 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 µg/mL), D: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM (1 µg/mL).

Figura 27. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (16 µg/mL).

Figura 28. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (16 µg/mL).

Figura 29. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 6.5.

Figura 30. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH a pH 6.5.

Figura 31. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (2 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (4 µg/mL).

Figura 32. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (2 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (4 µg/mL).

Figura 33. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (8 µg/mL), B: 2xCIM de azitromicina (16 µg/mL), C: 4xCIM de azitromicina (32 µg/mL), D: 8xCIM de azitromicina (64 µg/mL).

Figura 34. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (8 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (16 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (32 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (64 µg/mL).

Figura 35. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 5.

Figura 36. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH a pH 5.

Figura 37. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) a pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (16 µg/mL) a pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (32 µg/mL) a pH 5.

Figura 38. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) a pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (16 µg/mL) a pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (32 µg/mL) a pH 5.

Figura 39. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes a pH 5. A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (64 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (128 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (256 µg/mL).

Figura 40. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 a pH 5, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (64 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (128 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (256 µg/mL).

Figura 41. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH suplementado con leche bovina.

Figura 42. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH suplementado con leche bovina.

Figura 43. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con leche, B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (1 µg/mL) en CMH suplementado con leche.

Figura 44. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con leche bovina, B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (1 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 45. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con leche bovina. A: *S. aureus* frente a 0.25xCIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 0.5xCIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 1xCIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 2xCIM de azitromicina (16 µg/mL), E: 4xCIM de azitromicina (32 µg/mL) y F: 8xCIM de azitromicina (64 µg/mL).

Figura 46. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, en CMH suplementado con leche bovina. A: *S. aureus* frente a 0.25xCIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 0.5xCIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 1xCIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 2xCIM de azitromicina (16 µg/mL), E: 4xCIM de azitromicina (32 µg/mL) y F: 8xCIM de azitromicina (64 µg/mL).

Figura 47. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 48. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 49. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 µg/mL) en CMH suplementado con suero bovino.

Figura 50. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 51. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de azitromicina (1 µg/mL), B: 1xCIM de azitromicina (2 µg/mL), C: 2xCIM de azitromicina (4 µg/mL), D: 4xCIM de azitromicina (8 µg/mL), E: 8xCIM de azitromicina (16 µg/mL) y F: 16xCIM de azitromicina (32 µg/mL).

Figura 52. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de azitromicina (1 µg/mL), B: 1xCIM de azitromicina (2 µg/mL), C: 2xCIM de azitromicina (4 µg/mL), D: 4xCIM de azitromicina (8 µg/mL), E: 8xCIM de azitromicina (16 µg/mL) y F: 16xCIM de azitromicina (32 µg/mL).

Figura 53. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH pH 7.4.

Figura 54. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH pH 7.4.

Figura 55. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH pH 7.4.

Figura 56. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 57. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (16 µg/mL).

Figura 58. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (16 µg/mL).

Figura 59. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH pH 6.5.

Figura 60. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH pH 6.5.

Figura 61. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH pH 6.5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacina (0.5 µg/mL) en CMH pH 6.5.

Figura 62. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 63. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), B: 2xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), C: 4xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), D: 8xCIM de danofloxacina (8 µg/mL) y E: 16xCIM de danofloxacina (16 µg/mL).

Figura 64. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (16 µg/mL).

Figura 65. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH pH 5.

Figura 66. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH pH 5.

Figura 67. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.5 µg/mL) en CMH pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacina (1 µg/mL) y D: curva de crecimiento frente a 1 CIM de danofloxacina (2 µg/mL) en CMH pH 5.

Figura 68. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.5 µg/mL) en CMH pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacina (1 µg/mL) y D: curva de crecimiento frente a 1 CIM de danofloxacina (2 µg/mL) en CMH pH 5.

Figura 69. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 5. A: *S. aureus* frente a 2xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), B: 4xCIM de danofloxacina (8 µg/mL), C: 8xCIM de danofloxacina (16 µg/mL) y D: 16xCIM de danofloxacina (32 µg/mL).

Figura 70. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 2xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), B: 4xCIM de danofloxacina (8 µg/mL), C: 8xCIM de danofloxacina (16 µg/mL) y D: 16xCIM de danofloxacina (32 µg/mL).

Figura 71. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en leche.

Figura 72. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en leche.

Figura 73. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en leche.

Figura 74. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en leche.

Figura 75. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en leche. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (4 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (8 µg/mL).

Figura 76. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en leche. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (4 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (8 µg/mL).

Figura 77. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 78. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 79. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

Figura 80. Modelado de Gompertz realizado a *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

Figura 81. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (4

µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacin (2 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacin (4 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacin (8 µg/mL).

Figura 82. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacin (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacin (4 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacin (2 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacin (4 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacin (8 µg/mL).

Figura 83. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclinica frente a Penicilina G en CMH pH 7.4.

Figura 84. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en CMH pH 7.4.

Figura 85. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin penicilina G) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL); C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL).

Figura 86. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin penicilina G) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL); C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 87. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 32xCIM de PenG (8 µg/mL).

Figura 88. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 32xCIM de PenG (8 µg/mL).

Figura 89. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclinica frente a PenG en CMH pH 6.5.

Figura 90. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a PenG en CMH pH 6.5.

Figura 91. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en CMH pH 6.5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en CMH pH 6.5.

Figura 92. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

Figura 93. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

Figura 94. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

Figura 95. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a PenicilinaG en CMH pH 5.

Figura 96. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en CMH pH 5.

Figura 97. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 5

Figura 98. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 5.

Figura 99. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 5. A: 0.25xCIM; B: 0.5xCIM; C:1xCIM (0.125 µg/mL); D: 2xCIM; E: 4xCIM; F: 8xCIM y G: 16xCIM de PenG respectivamente.

Figura 100. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 5. A: 0.25xCIM; B: 0.5xCIM; C:1xCIM (0.125 µg/mL); D: 2xCIM; E: 4xCIM; F: 8xCIM y G: 16xCIM de PenG respectivamente.

Figura 101. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Penicilina G en leche.

Figura 102. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en leche.

Figura 103. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en leche y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL).

Figura 104. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en leche y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL).

Figura 105. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en leche. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y, E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

Figura 106. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en leche. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y, E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

Figura 107. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a PenG en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 108. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a PenG en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 109. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en CMH-40% suero bovino y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

Figura 110. Modelado de Gompertz realizado a *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en CMH-40% suero bovino y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

Figura 111. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 16xCIM de PenG (8 µg/mL).

Figura 112. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 16xCIM de PenG (8 µg/mL).

Figura 113: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 7.4.

Figura 114: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 6.5.

Figura 115: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 5.

Figura 116: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en leche bovina.

Figura 117: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Figura 118. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 7.4.

Figura 119. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 6.5.

Figura 120. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 5.

Figura 121. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en leche.

Figura 122. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en suero bovino.

Figura 123. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 7.4.

Figura 124. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 6.5.

Figura 125. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 5.0.

Figura 126. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en leche.

Figura 127. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al inicio de las curvas de muerte construidas en suero bovino.

Figura 128. Estimación del EPA (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a azitromicina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin azitromicina) en CMH.

Figura 129. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a azitromicina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin azitromicina) en leche.

Figura 130. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a danofloxacina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin danofloxacina) en CMH.

Figura 131. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a danofloxacina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin danofloxacina) en leche.

Figura 132. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a penicilina G incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin penicilina G) en CMH.

Figura 133. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a penicilina G incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin penicilina G) en leche.

Figura 134. Evolución de las ufc/mL de *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección en muslo de ratones para evaluar la duración del PAE in vivo.

Figura 135. Rectas de calibración mediante ajuste lineal del área de pico cromatográfico de estándares de danofloxacina en ácido fosfórico 0.05 M (A), en suero (B) y en músculo (C) en un rango de concentración 10 a 500 ng/0.2 mL.

Figura 136. Perfil de las concentraciones séricas y tisulares seguido por DAN tras su administración intramuscular en ratones. Integración con la evolución de las ufc/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC control y tratadas con DAN obtenidas luego de realizar la infección en los ratones para evaluar el PAE de la danofloxacina in vivo.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de calidad y precio por litro entregado por la industria

Tabla 2. Especies del género *Staphylococcus*

Tabla 3. Subespecies del género *Staphylococcus*

Tabla 4: Partición de los antimicrobianos en plasma y leche en animales en periodo de lactancia. Adaptado de Ziv G, 1980^a.

Tabla 5: Clasificación de los agentes antimicrobianos desde el punto de vista PK/PD. Adaptado de Jacobs M, 2004.

Tabla 6: Valores de referencia establecidos por el **CLSI (2009)** para los diámetros de los halos de inhibición de la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla 7: Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados obtenidos a partir de los estudios de susceptibilidad por antibiograma frente a *S. aureus*.

Tabla 8. Solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock de Azitromicina, Danofloxacina y Penicilina G.

Tabla 9. Rangos aceptables establecidos por CLSI en 2008 como CIMs de *S. aureus* ATCC 29213.

Tabla 10. Resultados de la prueba de susceptibilidad por antibiograma efectuado frente a las 68 cepas de *S.aureus*.

Tabla 11. CIM₅₀ Y CIM₉₀ de los diferentes antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* a diferentes pHs.

Tabla 12. CIM de azitromicina (expresada en µg/mL) a pH 7.4, 6.5 y 5.0

Tabla 13. CIM de danofloxacina (expresada en µg/mL) a pH 7.4, 6.5 y 5.0

Tabla 14. CIM de Penicilina G frente a *Staphylococcus aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.0

Tabla 15. Estadística descriptiva para la concentración inhibitoria mínima (CIM) de azitromicina, danofloxacina y penicilina G frente a *S. aureus* a diferentes pHs del medio de cultivo.

Tabla 16. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Azitromicina frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 17. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Danofloxacina frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 18. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Penicilina G frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla 19. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 7.4 frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 20. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 7.4 frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CIM de azitromicina.

Tabla 21. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 6.5 frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 22. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 6.5 frente a diferentes concentraciones múltiplos de la CIM de azitromicina.

- Tabla 23.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 5 frente a concentraciones inferiores a la CIM (64 µg/mL).
- Tabla 24.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 5 frente a diferentes concentraciones (CIM -64µg/mL-, 2 y 4 veces la CIM) de azitromicina.
- Tabla 25.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con leche bovina frente a concentraciones inferiores a la CIM (8 µg/mL).
- Tabla 26.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con leche bovina frente a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, CIM -8µg/mL-, 2, 4 y 8 veces la CIM) de azitromicina
- Tabla 27.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con suero bovino frente a concentraciones inferiores a la CIM (2 µg/mL).
- Tabla 28.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con suero bovino frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -2 µg/mL-, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de azitromicina
- Tabla 29.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus*, en CMH pH 7.4 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM (0.25 µg/mL).
- Tabla 30.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -1 µg/mL-, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina
- Tabla 31.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.
- Tabla 32.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -1 µg/mL, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina
- Tabla 33.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.
- Tabla 34.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 frente a diferentes concentraciones (2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina
- Tabla 35.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en leche sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.
- Tabla 36.** Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en leche frente a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina
- Tabla 37.** Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 38. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina

Tabla 39. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 sin penicilina G y frente a concentraciones inferiores a la CIM (0.25 µg/mL).

Tabla 40. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 frente a diferentes concentraciones (CIM -0.25 µg/mL-, 2, 4, 8, 16 y 32 veces la CIM) de penicilina G

Tabla 41. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 42. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 frente a diferentes concentraciones (CIM -0.25 µg/mL, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de penicilina G.

Tabla 43. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 sin Penicilina G.

Tabla 44. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 frente a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de Penicilina G

Tabla 45. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en leche sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 46. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en leche frente a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de Penicilina G.

Tabla 47. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

Tabla 48. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino frente a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de Penicilina G.

Tabla 49. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de azitromicina.

Tabla 50. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de danofloxacina.

Tabla 51. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de penG.

Tabla 52. Índice de la actividad antibacteriana (*E*) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 7.4.

Tabla 53. Índice de la actividad antibacteriana (*E*) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 6.5.

Tabla 54. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 5.

Tabla 55. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en leche bovina empleada como caldo de cultivo.

Tabla 56. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

Tabla 57. Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 7.4.

Tabla 58. Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 6.5.

Tabla 59. Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 5.

Tabla 60 Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en leche.

Tabla 61 Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en suero bovino.

Tabla 62 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH pH 7.4.

Tabla 63 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH pH 6.5.

Tabla 64 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH pH 5.0.

Tabla 65. Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en Leche.

Tabla 66. Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en suero bovino.

Tabla 67. PAE presentado por azitromicina frente a *S. aureus* cepa ATCC 29213 y cepas aisladas a campo en CMH-pH 7.4.

Tabla 68. PAE presentado por azitromicina en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

Tabla 69. PAE de danofloxacin en CMH frente *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de animales portadores de mastitis subclínica

Tabla 70. PAE presentado por danofloxacin en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

Tabla 71. PAE presentado por danofloxacin en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

Tabla 72. PAE presentado por danofloxacin en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

Tabla 73. Determinación del PAE in vivo para danofloxacin mediante un modelo de infección en muslo de ratón neutropénico (Promedio \pm DE).

Tabla 74. PAEs de danofloxacina obtenidos in vivo aplicando un modelo de infección por *Staphylococcus aureus* en muslo de ratón

Tabla 75. Resultados de la re-validación de danofloxacina en suero y en músculo de ratón

Tabla 76. Concentraciones séricas individuales y promedio \pm DE obtenidas tras la administración de 10 mg/kg de DAN por la vía intramuscular

Tabla 77. Concentraciones musculares individuales y promedio \pm DE en músculo de ratones tras la administración de 10 mg/kg de DAN por la vía intramuscular

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

- ABCC₀₋₂₄. Área bajo la curva control de crecimiento bacteriano, sin antimicrobiano en función del tiempo de t_0 a t_{24}
- ABC/CIM. Predictor de eficacia Área bajo la curva concentración tiempo en relación a la concentración inhibitoria mínima
- ABC_{0-∞}. Área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito
- ABC₀₋₂₄. Área bajo la curva concentración en función del tiempo desde el tiempo 0 a 24 hs.
- AUBCA. Area bajo la curva de los valores de NA (número de bacterias viables en presencia de antibiótico) en función del tiempo desde t_0 hasta t_2 .
- AMH. Agar Mueller Hinton
- AMC. Amoxicilina con ácido clavulánico
- ANOVA. Análisis de la varianza
- ATB. Antimicrobiano
- AZT. Azitromicina
- CBM. Concentración bactericida mínima
- CCCP. NaCN, FNa, 2,4 dinitrofenol, iodoacetamida, carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.
- CIM. Concentración inhibitoria mínima
- CIM₅₀. Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 50% de los aislamientos evaluados
- CIM₉₀. Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 90% de los aislamientos evaluados
- CI50. Concentración antibiótica a la que se alcanza 50% del máximo efecto bactericida.
- CLB. Curva de letalidad bacteriana
- CLSI. Acrónimo del Instituto de Estandarización de Procedimientos de Laboratorios Clínicos de E.E.U.U. (ex NCCLS)
- C_{máx}. Concentración plasmática máxima
- C_{máx}/CIM. Predictor de eficacia Concentración máxima en relación a la CIM.
- CMH. Caldo Mueller Hinton.
- CV. Coeficiente de variación
- DAN. Danofloxacin
- DE. Desviación estándar
- DEL. Días en leche.
- d. Días

E. Índice de actividad antibacteriana.
EDTA. Acido etilendiamino tetra acético.
Emax. Efecto bactericida máximo.
ESC. Efecto sub-CIM
EPL. Efecto de potenciación leucocitaria
ETA. Eficacia total del antibiótico
F. Biodisponibilidad
FMLP. Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FQ. Fluoroquinolonas
g. Gramo
h. Hora/s
HPLC. Acrónimo inglés de cromatografía líquida de alta resolución
I. Sensibilidad intermedia
Kc. Constante de velocidad de crecimiento bacteriano en ausencia de antibiótico.
Kmax. Constante de máxima velocidad bactericida.
Kg. Kilogramo
LEFyT. Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos de la Cátedra de Farmacología de la facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de la Plata.
LMR. Límite máximo de residuos
Log₁₀. Logaritmo en base 10
mg. Miligramos
min. Minutos
mL. Mililitro
mm. Milímetro
NC. Número de bacterias viables en ausencia de antibiótico.
NA. Número de bacterias viables en presencia de antibiótico.
Nmax. Máximo desarrollo bacteriano en ausencia de antibiótico.
°C. Grados celcius
PAE. Efecto post-antibiótico
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

PMA. Forbol-miristato-acetato

R. Resistente

s. Segundos

S. Sensible

S. aureus contracción de *Staphylococcus aureus*

SARM. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

T>CIM. Porcentaje de tiempo durante el cual la concentración sérica excede la CIM del patógeno

Tlag. Fase de latencia.

TI50. Tiempo al que se alcanza el 50% del máximo efecto bactericida.

TN50. Tiempo al que se alcanza el 50% del máximo crecimiento bacteriano.

T_{máx}. Tiempo al que se produce la concentración plasmática máxima

t₀: tiempo de inicio del ensayo (0 horas)

t₂: tiempo de la finalización del ensayo (24 horas)

UFC. Unidades formadoras de colonias

UFC/mL. Unidades formadoras de colonias por mililitro

µg. Microgramo

µL. Microlitro

>. Mayor que

<. Menor que

±. Más o menos

≤. Menor o igual que

≥. Mayor o igual que

% . Porcentaje

1N. solución 1 Normal.

1. INTRODUCCION

1.1. *MASTITIS BOVINA*

1.1.1. *Generalidades*

La mastitis bovina, es definida por la Federación Internacional de Lechería (1999) como una inflamación de la glándula mamaria que tiene por objetivo final la eliminación del agente patógeno y/o la restauración de la funcionalidad del órgano, cuando éste se ha visto afectado. Dicha inflamación, puede ser ocasionada por microorganismos patógenos transmisibles, por lesiones traumáticas, disturbios metabólico-nutricionales, situaciones de estrés, cambios fisiológicos asociados con una terminación temprana de la lactancia y, menos frecuente, por alergia y neoplasmas (Philpot y Nickerson, 1993; National Mastitis Council, 2004).

Se caracteriza por daños del epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse cambios patológicos localizados o generalizados dependiendo de la magnitud del daño (Giesecke, 1975). Según el grado de la inflamación, la mastitis se clasifica en mastitis clínica, subclínica o infección latente.

Clásicamente ha sido considerada como una “enfermedad multifactorial” (Hans Andresen, 2001), debido a que el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla; del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes en el rodeo y, fundamentalmente de las condiciones del medio ambiente y del manejo en general, tanto del tambo como del ordeño en particular.

La presentación de la mastitis se ve favorecida por diversas circunstancias que propician la distribución del microorganismo patógeno en el interior de la glándula mamaria, lo cual sucede principalmente durante el ordeño, momento en que se ven alterados los mecanismos naturales de resistencia del conducto del pezón (Figura 1).

Puede afirmarse que un 80-90% de los casos de mastitis son ocasionados por la invasión de microorganismos patógenos específicos en los pezones y tejidos de la ubre

(Loor *et al.*, 1999). Mientras que el resto son resultado de lesiones traumáticas, con o sin invasión secundaria de microorganismos (Bramley y Dodd, 1984; Gasque y Blanco, 2001).

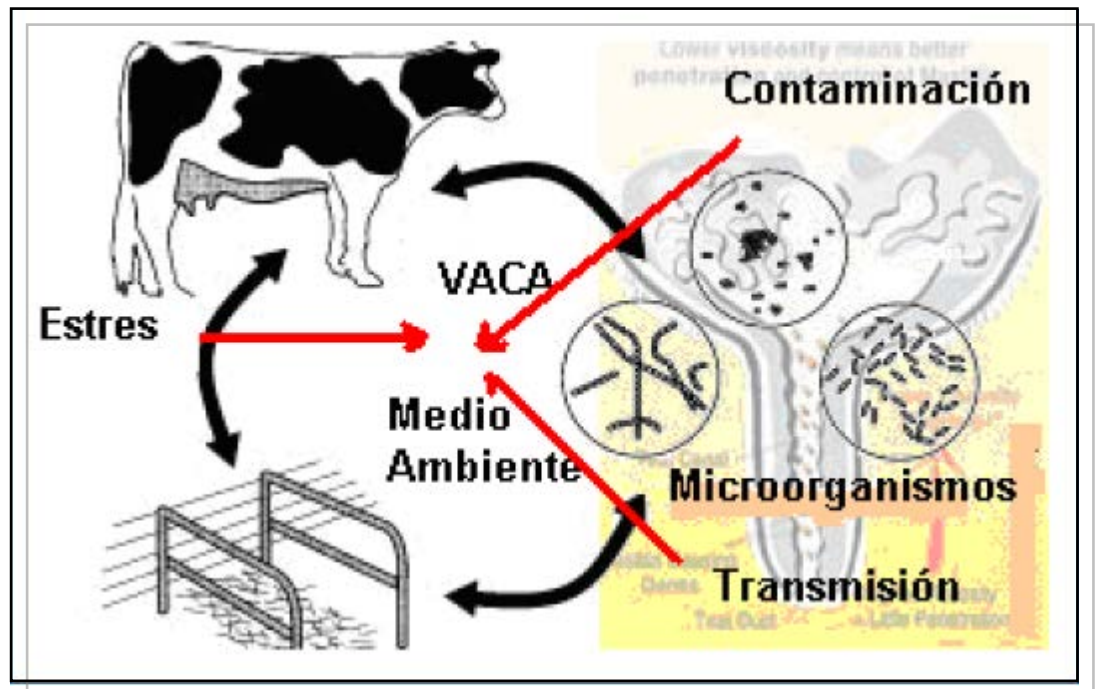


Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos.

No obstante el conocimiento generado en los últimos años acerca de la patogénesis y epidemiología de los principales agentes bacterianos causantes de mastitis subclínica, se dispone de escasa información sobre el impacto diferencial de cada patógeno en la producción de leche. Estudios en los cuales se ha evaluado la relación entre resultados bacteriológicos positivos en vacas infectadas que presentan mastitis subclínica (Gröhn *et al.*, 2004; Reksen *et al.*, 2008), han reportado que los diferentes géneros bacterianos inducen una disminución de la producción de distinta magnitud, tanto en vacas como en vaquillonas.

El detrimento económico directo atribuible a casos de mastitis, se compone principalmente de la disminución de la producción a corto plazo y de las pérdidas que se manifiestan a largo plazo. En estas últimas, debido a que normalmente prevalece un bajo estándar de producción, la vaca generalmente experimenta un secado prematuro del o los cuartos afectados, o incluso puede morir.

Este tipo de eventos, están íntimamente relacionados con descarte de leche durante los tratamientos antibióticos y el período de supresión, costos del propio tratamiento, y el trabajo extra dispensado al animal (Seegers *et al.*, 2003). La disminución en la producción de leche de los animales afectados, es a su vez, el componente más importante dentro del total de pérdidas económicas que genera la enfermedad.

Evaluando el impacto económico de la mastitis, (Seegers *et al.*, 2003) recopilaron datos acerca de los niveles de pérdidas reportados en diferentes investigaciones llevadas a cabo bajo diversas condiciones de producción. Esa sistematización de los hallazgos, mostró que las pérdidas de producción a lo largo de una lactancia oscilaban entre 0.5 a 2% en vacas de 1 solo parto, y hasta un 5.8 % en vacas de 2 o más partos.

Generalmente los estudios dirigidos a estimar el efecto sobre la producción de la mastitis, se han basado en mediciones mensuales de la producción individual (Houben *et al.*, 2003), lo cual impide por ejemplo, capturar datos de la evolución de la producción diaria entre controles lecheros o cuantificar el descarte de leche con antibióticos, con la consecuente subestimación de la pérdida (Fetrow, 2000). Actualmente, la aplicación de nuevas tecnologías en las unidades de ordeño, con capacidad de realizar la medición diaria de la leche producida, implica una mejora en los registros y un avance en la forma de modelar el efecto de distintas enfermedades sobre la curva de lactación. Mediante modelos matemáticos se puede comparar no sólo animales enfermos versus sanos, sino también sus producciones anteriores y posteriores al día del evento, posibilitando así la detección de las pérdidas acontecidas en el corto plazo para ser compensadas en el largo plazo.

Wilson *et al.*, en 2004 utilizaron un enfoque similar para determinar el efecto de la mastitis clínica en la producción diaria de leche, reportando una pérdida de 597 kg por lactancia en vacas de dos o más lactancias. Los autores hallaron también que la producción diaria, previa a la presentación del caso clínico, fue superior en las vacas que padecieron la enfermedad que en las que no evidenciaron mastitis. La estimación final de la pérdida en las vacas afectadas, teniendo en cuenta la producción potencial de los animales, alcanzó a 1.181 kg por lactancia. Similares resultados fueron obtenidos por Hagnestam *et al.* (2007), quienes calcularon hasta un 9% de pérdidas en la producción de leche a 305 días para vaquillonas en su primer lactancia, y hasta un 11% en vacas multíparas.

La cuantificación de la disminución de producción láctea como consecuencia de la aparición de un caso clínico ha sido realizada, inicialmente, sobre infecciones experimentales (Louis *et al.*, 1990). Solo un estudio informado en 2004, evaluó este efecto a partir de infecciones naturales acontecidas en rodeos comerciales (Gröhn *et al.*, 2004). Los autores comunicaron que los diferentes géneros bacterianos inducen una disminución de la producción de distinta magnitud, tanto en vacas como en vaquillonas. Es así que, ***Staphylococcus aureus***, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. *Streptococcus* spp. y *Trueperella pyogenes* fueron los responsables de las mayores pérdidas en producción.

Si bien en algunos países como Holanda o Noruega, ***S. aureus***, continúa siendo el patógeno más frecuentemente aislado en mastitis clínicas y subclínicas, los patógenos de origen ambiental, definidos así por tener como reservorio el ambiente en el que conviven las vacas, surgen como actores centrales en las formas clínicas de la mastitis (Bradley y Green, 2001; Gröhn *et al.* 2004; Kalmus *et al.*, 2006).

Los principales microorganismos reconocidos dentro de este grupo son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus*, especies del género *Enterococcus* y enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y especies de *Citrobacter*, *Serratia* y *Proteus*.

Streptococcus dysgalactiae ha sido descrito como una especie de naturaleza tanto infecciosa como ambiental (Calvinho 2007).

Dentro de los patógenos no comunes del medio ambiente, podemos mencionar a *Trueperella pyogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, y el alga incolora *Prototheca* sp., entre otros (Hans Andresen, 2001).

Según la fisiopatología y epidemiología de los agentes patógenos involucrados en la mastitis, Poutrel y Rainard (1982), se permitieron dividirlos en dos grandes grupos: patógenos mayores y patógenos menores. Dentro del primer grupo ubican a ***Staphylococcus aureus***, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Trueperella pyogenes*, asociados a las mayores pérdidas económicas, mientras que el segundo agrupa a *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa* negativa.

En general, existe una gran variedad de microorganismos catalogados como patógenos contagiosos productores de mastitis, sin embargo, los más comunes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*; otros que también se incluyen son *Mycoplasma bovis* y *Trueperella pyogenes* (Bedolla y Castañeda, 2002). La fisiopatología relacionada con la infección producida por dichos patógenos hace que esta se manifieste frecuentemente como mastitis subclínica, en la cual la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal, sin que existan cambios organolépticos en la misma. En este caso, el dolor y la inflamación no se detectan observando la ubre. El número de células somáticas en la leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, resulta elevado, al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto (Loor *et al.*, 1999).

La mastitis subclínica solo se detecta aplicando pruebas de laboratorio que demuestren la presencia de productos de la inflamación (leucocitos, fibrina, suero) o de microorganismos infecciosos, así como de cambios en la composición química de la leche (Bofill *et al.*, 1988; Philpot y Nickerson, 1993).

La mastitis subclínica es la más persistente del grupo de las mastitis, con un gran impacto en la calidad higiénico-sanitaria de la leche (Ariznabarreta *et al.*, 2002). Este tipo de mastitis es de ocurrencia frecuente y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y caída del precio de la misma dado el número elevado de células somáticas presentes en los tanques de leche (Wellenberg *et al.*, 2002).

Tan solo en los Estados Unidos, los costos anuales derivados de la presentación de mastitis en los rodeos, han sido estimados entre 1.5-2.0 billones de dólares americanos (Kerr *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2003; Biesenkamp-Uhe *et al.*, 2007). Mientras que las pérdidas de producción de leche, por mastitis subclínica, y los costos elevados por el temprano reemplazo de vacas asociado con un conteo elevado de células somáticas han sido estimados en 960 millones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002). Romero (2004), reportó que los costos de mastitis en Estados Unidos son de alrededor de 107 a 180 dólares por vaca/año.

Es particularmente significativo el hecho que las pérdidas por esta enfermedad representan el doble de las pérdidas por infertilidad y problemas de reproducción (Chaves, 2009). Existe consenso en que las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis son debidas a la sumatoria de varias causas, como disminución de la producción, litros de leche descartada, reemplazos tempranos con la consecuente pérdida genética que generan, reducción del precio de venta, gastos en tratamientos, en servicio veterinario y en mano de obra; considerándose la primera como la más importante (Halasa *et al.*, 2007; Klostermann *et al.*, 2010, Larriestra y Vissi, 2012, Saran y Chaffer, 2000).

La mastitis continúa siendo la enfermedad más prevalente y costosa en las explotaciones lecheras en la mayor parte del mundo.

1.1.2. Impacto de la mastitis en la República Argentina

En el país, la mayor cuenca lechera, se encuentra ubicada en la región pampeana, la cual abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa. En ellas, se encuentran ubicados, prácticamente la totalidad de los tambos e industrias del sector lechero.

La estructura de producción primaria de leche en Argentina hasta hace unos pocos años, se caracterizaba por un elevado número de tambos localizados en diversas cuencas, mientras que la industria procesadora estaba estratificada, con pocas grandes empresas y varios centenares de pequeñas y medianas empresas (Gutman *et al.*, 2003).

Actualmente, las producciones individuales muestran un fuerte incremento y, con ellas, la glándula mamaria de los animales se expone durante cada vez mayor tiempo al vacío del ordeño. A su vez, las vacas por unidad de superficie tienden a incrementarse y son a menudo manejadas en ambientes muy contaminados.

En términos generales, la rutina de ordeño, la infraestructura y el manejo de los rodeos continúan sin evidenciar cambios radicales, que se ajusten a las nuevas necesidades de la industria lechera, situación tal que trae aparejada una serie de consecuencias sanitarias

que se evidencian en un crecimiento muy por encima de los valores óptimos de células somáticas y vacas en tratamiento.

Según datos reportados por la Industria Lechera, desde octubre de 2010 a septiembre de 2011, se perciben algunos puntos preocupantes en cuanto a la calidad de la leche que se produce en el país. Estas cifras son realmente alarmantes, ya que provienen de unas 18 industrias, con una media de 6.616 tambos, los cuales entregaron durante ese período un promedio de 575 millones de litros mensuales. A continuación, en la **Tabla 1**, se presentan los datos de calidad en referencia al conteo de células somáticas informados.

Tabla 1. Datos de calidad y precio por litro entregado por la industria

	Empresas	Tambos	Vol. Mensual (mill. de litros)	\$/lt	UFC (x1.000)	CCS (x1.000)
Oct – 10	18	6604	626,4	1,320	58,5	339,7
Nov – 10	18	6581	588,1	1,325	58,8	339,6
Dic – 10	18	6567	576,8	1,348	61,8	362,1
Ene – 11	18	6565	546	1,378	69,5	402,3
Feb – 11	18	6550	481,1	1,419	72,3	430,9
Mar – 11	18	6572	510	1,539	61,6	417,5
Abr – 11	18	6593	513,5	1,567	59,4	397,4
May – 11	18	6577	555	1,568	62,8	384
Jun – 11	18	6620	572,3	1,543	64,8	385,6
Jul – 11	18	6670	613	1,514	67	383,3
Ago – 11	18	6751	664,1	1,497	65,2	371,4
Sep – 11	18	6741	658,9	1,496	62,7	344,4
Gran Promedio		6616	575,4	1,460	63,7	379,9

Fuente: MAGyP – Subsecretaría de Lechería. Octubre de 2011.

Como podemos apreciar en la tabla, los valores de CCS promediaron las 380 mil/mL, indicando que en Argentina existe una gran prevalencia de mastitis subclínica y por lo tanto continúa perdiendo un gran volumen de producción sólo por el nivel de infección mastítica de sus rodeos.

Haciendo referencia al estudio realizado por Philpot (1993), en el cual se calcularon las pérdidas de producción según el nivel de células somáticas en tanque, podríamos estimar que en este caso se estarían perdiendo alrededor de 14 millones de litros mensuales (2.5% del total). Si consideramos, a la vez, un valor promedio de USD 0.5 por litro de leche, la situación nos estaría indicando una pérdida cercana a los USD 11 millones por mes a nivel local.

Actualmente no hay un trabajo completo que aclare lo que ocurre a nivel nacional cuando se habla de mastitis clínicas, sin embargo, contamos con análisis de los casos clínicos en la práctica diaria, en los que se evidencia la misma tendencia en aquellos tambos que llevan registro de este dato (Castro, 2012).

Según un relevamiento de datos realizado por Castro en el año 2012, en el caso de las vaquillonas, el promedio de días en leche (DEL) desde el parto hasta el primer caso de mastitis fue de 22 días y en general, estas nunca recuperaron el nivel productivo de sus compañeras libres de la enfermedad. Es así como las pérdidas de producción en esta categoría animal rondaron los 316 litros. En vacas, sin embargo, el promedio de DEL al primer caso de mastitis fue de 81 días y las pérdidas rondaron los 345 litros.

El trabajo presentado por Castro (2012), es particularmente interesante porque permite observar dos aspectos fundamentales, el primero es que dependiendo de la bacteria que intervenga, la baja en la producción puede comenzar incluso una semana antes del diagnóstico de la mastitis clínica y segundo, que aquellos animales, especialmente vacas, que tuvieron al menos un caso de mastitis en los días previos a manifestarlo, estaban en niveles de producción mayor que las que nunca tuvieron mastitis.

Esto prueba que por norma general, las vacas más productoras son las más susceptibles y que, con el aumento de la producción individual, aumentan los casos de mastitis.

Si bien, como se ha mencionado, en el país no se cuenta con información actualizada referente a la situación de los patógenos más prevalentes asociados a Mastitis Bovina, una revisión publicada por Calvino y Tirante (2005) sobre la prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y la evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina, presenta que hasta la década del 90, *S. aureus* era el patógeno más frecuentemente encontrado en los aislamientos de mastitis bovina. En esa revisión, los autores igualmente resaltaron que, en su mayoría la información recopilada pertenecía a trabajos realizados en muestras tomadas y/o analizadas a conveniencia, por lo que dicha información podría no ajustarse exactamente a la prevalencia real de los patógenos presentes en los rodeos en general. Se sabe en términos generales, salvo contadas

excepciones, que en los rodeos con bajo recuento de células somáticas hay una menor presencia de infecciones por *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*; y una mayor incidencia de infecciones provocadas por patógenos ambientales (Erskine *et al.*, 1988).

Durante el transcurso de los últimos 30 años, se ha ido presentando una transformación del sector lechero en la República Argentina, consistente en la disminución del número de tambos, con la subsecuente generación de nuevas unidades productivas cada vez más intensificadas, lo cual, sumado a la expansión de la frontera agrícola, ha ido generando un aumento en la concentración de animales expuestos a distintas condiciones de confinamiento que generan un gran desafío para el control de los patógenos ambientales (Mozeris *et al.*, 2008). *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis*, se consideran estreptococos ambientales dado que tienen como reservorio y ruta de acceso el ambiente en el que conviven las vacas (Khan *et al.*, 2003, Lopez-Benavidez *et al.*, 2007). Sin embargo, la transmisión vaca a vaca ha sido planteada desde hace tiempo para *Strep. dysgalactiae* y recientemente para *Strep. uberis* (Zadoks *et al.*, 2003; Rato *et al.*, 2008).

Estudios efectuados hacia fines de la década del 70 sobre muestras de leche provenientes de 40 establecimientos lecheros (12 con ordeño manual y 28 con ordeño mecánico) del Depto. Las Colonias, Provincia de Santa Fe, mostraron una elevada prevalencia de ***Staphylococcus aureus*** (54%), *Streptococcus agalactiae* (23%) y *Pseudomonas aeruginosa* (13%) (Tessi *et al.*, 1979).

En otro relevamiento realizado en 1977 en la Provincia de Córdoba (Río Cuarto, Tercero Arriba, Juárez Celman y Gral. San Martín), sobre 30 establecimientos lecheros (18 con ordeño mecánico y 12 con ordeño manual), el patógeno aislado en mayor frecuencia fue nuevamente ***S. aureus*** (43.27%), seguido por distintas especies del género *Streptococcus* (*Streptococcus uberis* -19.2%- , *S. agalactiae* -13.5%- y *S. dysgalactiae* -5.3%-) (González *et al.*, 1980).

Posteriormente a fines del 80 se realizó el seguimiento a partir de 1.150 vacas provenientes de 39 tambos pertenecientes a los deptos Castellanos y Las Colonias de la provincia de Santa Fe, donde fue encontrado nuevamente un predominio de ***S. aureus*** (21.7%) entre los patógenos mayores aislados, seguido por microorganismos del género

Streptococcus (12.5%, -*Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus agalactiae*, 5.9 y 2.7%, respectivamente). Dentro de los patógenos menores se aislaron *Corynebacterium* spp. (43.9%), *Micrococcus* spp. (9.7%) y *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) (6,6%) (Calvinho *et al.*, 1991a). Los patógenos mayores se distribuyeron en el 95% de los tambos y en el 22.6% de las vacas y dentro de ellos el más difundido fue ***S. aureus*** (87% de los tambos), seguido por *S. dysgalactiae* (51% de los tambos) (Calvinho *et al.*, 1991a). De los establecimientos evaluados en dichas investigaciones solamente el 20% aplicaba el programa de control de mastitis basado en los cinco puntos que se ha mantenido como tradicional: desinfección de pezones post ordeño, terapia antibiótica de casos clínicos, control periodico de la máquina de ordeñar, terapia antibiótica de la vaca seca y descarte de animales con infecciones intramamarias crónicas (Booth, 1981).

Posteriormente Giraud *et al.* (1995), realizaron un relevamiento en 17 establecimientos lecheros de la zona centro sur de la provincia de Córdoba, en donde se recolectaron muestras de leche del 10 al 20% de las vacas en ordeño, aplicando una técnica de muestreo sistemático. Los investigadores determinaron que los patógenos más frecuentemente aislados correspondían a distintas especies de SCN (12.2%), especies de *Streptococcus* (8.13%) y en tercer lugar ***S. aureus*** (5.9%).

También se han caracterizado a los microorganismos causantes de mastitis subclínica en la provincia de Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos (Tirante *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2001). En un estudio realizado sobre 7.580 muestras compuestas de vacas pertenecientes a 38 rodeos lecheros ubicados en la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos entre diciembre de 1996 y octubre de 1997, más del 50% de los microorganismos aislados eran especies de *Staphylococcus*. Los patógenos mayores (FIL, 1999) más frecuentemente aislados fueron ***S. aureus*** (31.6%) y *S. agalactiae* (11.6%) (Tirante *et al.* 1998). Un análisis retrospectivo basado en el cultivo de muestras compuestas de cuartos de 16.065 vacas en ordeño pertenecientes a 74 establecimientos lecheros (63 ubicados en la provincia de Buenos Aires, 7 en la provincia de Entre Ríos y 2 en la provincia de Santa Fe) tomadas entre diciembre de 1996 a marzo de 2000, reveló una prevalencia de ***S. aureus*** de 21.9%, *S. agalactiae* 5.8% (hallado en el 68.9% de los rodeos estudiados), *Streptococcus* no *agalactiae* 4.3%. Los patógenos

menores más frecuentemente aislados fueron: *Staphylococcus* spp. 13.6% y *Corynebacterium* spp 14.3% (Chaves *et al.*, 2001).

Dentro de los estudios más recientes, se describe uno sobre la incidencia de mastitis clínica dentro de los primeros 30 días de lactancia (Izak y Ackermann, 2010), que fue realizado en rodeos localizados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. En el cual se registró menos de 200.000 células somáticas en leche del tanque durante el último año, rodeos libres de *Strep. agalactiae* y que se mantenían controladas las infecciones por *S. aureus*. En este estudio el organismo más frecuentemente aislado fue *Strep. uberis* (32.9%), seguido por *Strep. Dysgalactiae* (18.06%). Resultados que manifiestan una tendencia al incremento de las mastitis medioambientales.

Taverna *et al.*, (2001) evaluaron la evolución del recuento de células somáticas (RCS), leche de camiones cisterna provenientes de la cuenca central de Santa Fe (periodo junio de 1997 a junio de 1998), mostraron una media geométrica de 416.869 células/mL. La población de tambos que componían los camiones cisterna contaba con una producción diaria de 3.5 millones de litros (aproximadamente el 50% del total de la producción de la cuenca lechera central) (Taverna *et al.*, 2001). Un año más tarde, el RCS promedio fue 407.000 células/mL, en donde el 53% de la leche incluida presentaba RCS inferiores a las 400.000 células/mL (Taverna *et al.*, 2001). En el caso de establecimientos lecheros ubicados en el noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero mostraron una evolución de los RCS desde valores promedio de 687.000 células/mL en 1993 a 375.000 células/mL en 2002. Durante ese último año un 25% de los tambos mostró RCS por debajo de las 300.000 células/mL; mientras que sólo el 6% superó las 600.000 células/mL (Revelli *et al.*, 2004).

Si bien se puede observar una ligera tendencia a disminuir el RCS, *S. aureus* continúa siendo el patógeno mas prevalente en los casos de mastitis a lo largo del tiempo, produciendo estragos, repercutiendo en menor producción, menor calidad y mayores pérdidas económicas. Esta situación fomentó la necesidad de mejorar las condiciones sanitarias inherentes a esta actividad y adecuar la calidad de la leche a las exigencias internacionales, con la puesta en marcha de programas y planes de control en diferentes provincias (Dupuy *et al.*, 1989). La inclusión del RCS en los sistemas de pago en la década del 90 fue el punto de inflexión para el mejoramiento de la calidad sanitaria de la leche.

De manera que, la mastitis subclínica es comúnmente de larga duración, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche, afecta adversamente la calidad de la misma, puede servir como reservorio para infectar a otros animales en el rodeo y fundamentalmente resulta difícil de tratar con antimicrobianos.

1.1.3. Género *Staphylococcus*

El nombre deriva de las palabras griegas *staphyle* y *coccus* cuyo significado etimológico es racimo de uvas y grano, respectivamente. Rosenbach en 1884, fue probablemente la primera persona que cultivó a un estafilococo puro y que estudió sus características en el laboratorio (Kloos y Schleifer, 1986). Observó que los aislados formaban dos tipos de colonias, únicamente diferenciables por el color: naranjas y blancas. Propuso el nombre de *Staphylococcus pyogenes aureus* para la primera y *Staphylococcus pyogenes albus* para la segunda. Winslow y Winslow, en 1908, clasificaron los estafilococos cuyas colonias eran naranjas dentro del género *Aureococcus* y los de colonias blancas dentro del género *Albococcus*, describiendo al *Albococcus epidermidis*.

Posteriormente en 1920, Winslow *et al.*, incluyeron al género *Staphylococcus* en la familia *Micrococcaceae*. Hucker en 1948, al realizar la revisión de la sexta edición del Manual de Bergey's, concluyó que los *Staphylococcus* y los micrococos no eran distintos, dio prioridad al nombre genérico de *Micrococcus* e incluyó a los *Staphylococcus* dentro de este género. En este mismo año, Abd-el-Malek y Gibson llamaron al grupo de estafilococos y micrococos "complejo *Staphylococcus-Micrococcus*", considerando a los *Staphylococcus* como patógenos y a los micrococos como saprófitos.

En 1955, Evans *et al.*, propusieron separar estos organismos basándose en la necesidad de oxígeno para su crecimiento. Situaron las especies que eran aerobias facultativas en el género *Staphylococcus* y las aerobias estrictas en el género *Micrococcus*. Esta clasificación fue aceptada por Breed *et al.* en la séptima edición del Manual de Bergey's (1957), en donde se reconocían dos especies de estafilococos: *Staphylococcus aureus*, coagulasa positivo y con capacidad de fermentar el manitol y *Staphylococcus epidermidis*,

coagulasa negativo e incapaz de fermentar el manitol. El uso de la taxonomía numérica en 1959 indicó que los *Staphylococcus* coagulasa positivos constituían un grupo homogéneo, mientras que los *Staphylococcus* coagulasa negativos no lo eran (Hill, 1968).

Baird-Parker (1963), fue el primero en reconocer tipos específicos dentro del grupo heterogéneo de los estafilococos coagulasa negativos (ECN). Dividió a los estafilococos en seis subgrupos basándose en pruebas fisiológicas y bioquímicas. Así, el subgrupo I contenía la especie *S. aureus* (coagulasa y fosfatasa positivas, generalmente producían ácido a partir de manitol aeróbica y anaeróticamente); los subgrupos II hasta VI eran tipos distinguibles de ECN, que se diferenciaban en la producción de fosfatasa y acetoina, así como en la capacidad de producir ácido aeróticamente a partir de la lactosa, maltosa y manitol.

En 1965, Baird-Parker definió a los subgrupos del II hasta el VI como biotipos del 1 al 5, e indicó que la mayoría de estos biotipos merecerían tener el rango de especies.

En la actualidad el género *Staphylococcus* pertenece a:

- Phylum 2 del Dominio *Bacteria*
- Clase *Bacilli*
- Orden: *Bacilliales*
- Familia *Staphylococcaceae* [*Staphylococcus* 2008]

Según el Manual de Bergey's, 2001 tiene las siguientes características:

- Son cocos Gram positivos, dispuestos de a pares, tétradas o grupos irregulares semejantes a un racimo de uva (Figura 2).
- Catalasa positivos, excepto por *S. aureus* subsp. *Anaerobius* y *S. saccharolyticus*
- Anaerobios facultativos.
- Inmóviles.
- Producen ácidos a partir de glucosa, tanto en aerobiosis como anaerobiosis.
- Toleran altas concentraciones de NaCl (hasta un 10%).
- Temperatura óptima de crecimiento entre 30-37 °C.
- Las colonias son lisas, mantecosas, redondas, ligeramente convexas, de 1 a 4 mm de diámetro (Figura 3).

Algunas cepas producen pigmentos que van desde el anaranjado al amarillo pálido (Zinsser, 1994; Koneman *et al.*, 1999).

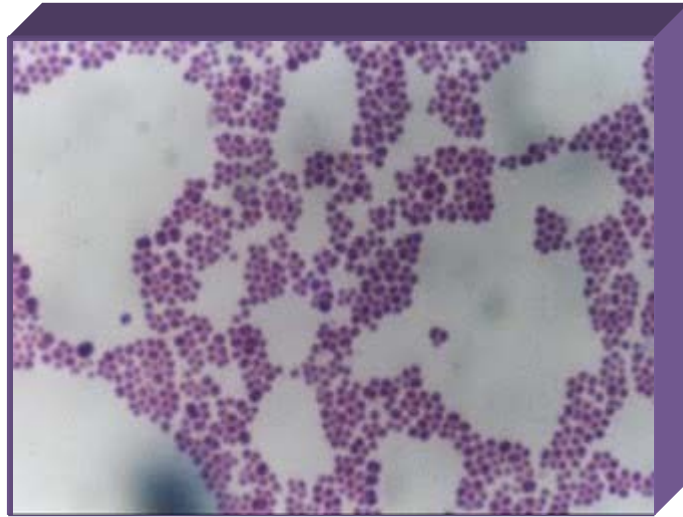


Figura 2. Morfología y tinción de Gram del género *Staphylococcus* (www.cdc.org/ncidod/diseases/submenu/sub_staphylococcus)



Figura 3. Cultivo de *Staphylococcus* spp. (<http://microbiologia.blogspot.com.ar/>)

En la actualidad, el género *Staphylococcus* consta de 45 especies y 24 subespecies validadas, de los cuales la mayoría son SCN (Euzéby, 2011) (**Tablas 2 y 3**).

Tabla 2. Especies del género *Staphylococcus*

<i>S. agnetis</i>	<i>S. fleurettii</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. arlettae</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. pulveri</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. rostri</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. saccharolitucus</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. camosus</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. schleiferi</i>
<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. sciuri</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. simiae</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. lutrae</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. condimentii</i>	<i>S. microti</i>	<i>S. stpaenovicii</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. succinus</i>
<i>S. epidirmis</i>	<i>S. nraelensis</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. petenkofferi</i>	<i>S. xilosus</i>

Tabla 3. Subespecies del género *Staphylococcus*

<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>	<i>S. hyicus</i> subsp <i>chromogenes</i>
<i>S. aureus</i> subsp <i>aureus</i>	<i>S. hyicus</i> subsp <i>hyicus</i>
<i>S. capitis</i> subsp <i>capitis</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>
<i>S. capitis</i> subsp <i>urealyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>saprophyticus</i>
<i>S. camosus</i> subsp <i>camosus</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>
<i>S. camosus</i> subsp <i>utilis</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	<i>S. sciuri</i> subsp <i>carmaticus</i>
<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealitycus</i>	<i>S. sciuri</i> subsp <i>lentus</i>
<i>S. equorum</i> subsp <i>equorum</i>	<i>S. sciuri</i> subsp <i>rodentus</i>
<i>S. equorum</i> subsp <i>linens</i>	<i>S. sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>
<i>S. hominis</i> subsp <i>hominis</i>	<i>S. succinus</i> subsp <i>casei</i>
<i>S. hominis</i> subsp <i>novibiosepticus</i>	<i>S. succinus</i> subsp <i>succinus</i>

Dentro de los *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP), podemos citar a ***S. aureus***, *S. intermedius* y algunas excepciones de *S. hyicus* (Bergey's, 1984). Siendo *S. aureus*, uno de los más representativos del grupo, catalasa positivo y productor de pigmentos que otorgan a las colonias un color amarillo intenso característico (Madigan *et al.*, 2003).

1.1.3.1 *Staphylococcus* y mastitis

El hábitat primario de estos patógenos se halla en la piel de la glándula mamaria y en las lesiones del pezón, de manera que el principal reservorio son las ubres infectadas, donde los microorganismos se adaptan, sobreviven y crecen. Así la infección ocurre principalmente durante el ordeño, diseminándose de vaca en vaca, a través de las pezoneras, unidades de ordeño, los paños y esponjas de lavado, las manos de los tamberos/operarios u otros objetos infectados; siendo mínima la transmisión durante el intervalo entre ordeños (Zadoks, 2002; Bedolla y Castañeda, 2003).

Frecuentemente los patógenos contagiosos causan infecciones por largos periodos de tiempo (semanas, meses y hasta años), siendo muy insidiosas (National Mastitis Council, 1997a), razón por la cual, los microorganismos contagiosos han sido la causa primaria de los tradicionales esfuerzos dirigidos al control de la mastitis (National Mastitis Council, 1995).

Como patógenos oportunistas de gran impacto en la mastitis, se encuentra el grupo de los denominados *Staphylococcus* coagulasa negativos (ECN). Estas bacterias son de elevado interés, debido a que al día de hoy son los microorganismos más frecuentemente aislados en vacas y novillas de los rebaños, por lo que son considerados actualmente como patógenos emergentes de la mastitis bovina (Pyörälä S. *et al.*, 2009).

Normalmente los ECN se encuentran en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador. A menudo son denominados microorganismos oportunistas, ya que habitan zonas donde les es sencillo colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores.

La implementación de programas de control de mastitis durante los últimos 30 años condujo a una reducción de la incidencia general de la mastitis clínica, llegando en algunos casos a una disminución del 90%. Sin embargo, mientras que la enfermedad clínica ocasionada por patógenos mayores (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) descendió significativamente, los patógenos considerados menores como los ECN han ido en aumento; tomando cada vez mayor fuerza como generadores de mastitis en bovinos. Las especies más comunes de ECN aisladas de mastitis bovina son *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus simulans* (Pyörälä S. *et*

al., 2009). Parece ser que existen diferencias en cuanto a la patogenicidad de las distintas especies de ECN, las que se evalúa mediante técnicas de diagnóstico molecular (Zadoks y Schukken, 2006). Se encontraron especies de ECN aislados de mastitis bovina con diferente susceptibilidad antimicrobiana y diversos factores de virulencia (Taponen S. *et al.*, 2009).

Sin embargo, el ***Staphylococcus aureus***, constituye la principal causa de mastitis a nivel mundial, encontrándose en más del 80% de los casos. Este microorganismo generalmente causa mastitis subclínica y crónica, aunque también puede generar formas sobreagudas y agudas, pudiendo evolucionar hasta la gangrena, pero ocasionando la muerte en raros casos (Martínez, 1984; Morin y Hurley, 1994).

La infección por ***Staphylococcus aureus*** es típicamente crónica, puesto que es capaz de sobrevivir en células alveolares, en neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria bovina durante largo periodo de tiempo (Hebert *et al.*, 2000). Estos microorganismos además, son capaces de multiplicarse en el interior de las vacuolas citoplasmáticas de la célula alveolar, usando como propio el citoesqueleto membranoso de la célula huésped. También, pueden adoptar “formas L” que, al no poseer pared celular, resisten a los agentes antibacterianos que actúan sobre los componentes de la pared bacteriana (Sears y Smith, 1990). Por otra parte, tienen la capacidad de formar una cápsula de características lipoproteicas (proteína A) e hidrofóbicas que dificulta la fagocitosis y constituye el principal factor de infecciosidad y supervivencia en la ubre (Corbellini, 1996; Zandarín *et al.*, 1996).

Los factores de virulencia de *S. aureus* son variados y suponen siempre retos tanto clínicos como farmacológicos, ya que limitan ostensiblemente el éxito bacteriológico y clínico de los tratamientos.

En la figura 4, se resumen los principales factores de virulencia asociados a *S. aureus*.

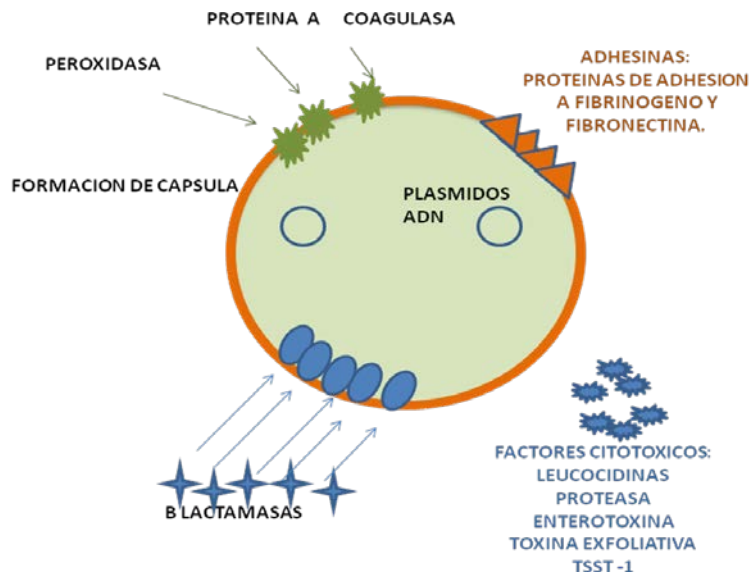


Figura 4. Principales factores de virulencia de *S. aureus*. Adaptado de (http://2014hs.igem.org/Team:Elan_Vital_South_Korea/p_background)

Otro factor sumamente importante es la capacidad de formar biofilms. La definición de un biofilm bacteriano señala que es "una comunidad microbiana sésil", caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas han producido. Exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica (Nazar, 2007). La formación de un biofilm supone una secuencia coordinada de sucesos que incluye una fijación inicial a la superficie primaria, la formación de microcolonias, su expansión y la posterior diseminación de bacterias (Tu Quoc *et al.*, 2007).

Aunque aún se comprende poco la regulación de la formación del biofilm, se supone compleja y multifactorial (Clarke y Foster, 2006). En la fase de proliferación se ocasiona una acumulación de células en multicapa rodeadas de una matriz polimérica de polisacárido (O’Gara y Humphreys, 2001), la que contiene también proteínas de superficie responsables de la fijación de las bacterias a los distintos sustratos (Oliveira *et al.*, 2006). De vez en cuando algunas bacterias se desprenden del biofilm y difunden al medio ambiente (Otto. M, 2008).

El *S. aureus* y la mayoría de los SCN aislados a partir de mastitis subclínica tienen la habilidad de formar biofilm.

Dos componentes de la superficie han sido identificados como factores importantes que intervienen en la formación de biofilm por *Staphylococcus*: el polisacárido de adhesión intercelular (PIA) (Stevens *et al.*, 2008) y la proteína asociada a biofilm (BAP) (Ziebuhr *et al.*, 2006). Las proteínas codificadas por los genes *icaADBC* (operón de adhesión intercelular) median en la biosíntesis de la matriz de exopolisacáridos PIA que juegan un papel importante en la adhesión célula-célula.

La formación de biofilms, está fuertemente asociada con la virulencia en cepas clínicas de *Staphylococcus coagulasa negativos*, causantes de mastitis bovina.

S. aureus aislados que poseen el gen *bap* son fuertes formadores de biofilm y son más a menudo asociados con la persistencia de Infecciones intramamarias (Cucarella *et al.*, 2004). Se especula que la proteína BAP se proyecta desde la superficie de la célula bacteriana, promoviendo la interacción con superficies de la célula huésped, u otras bacterias (Cucarella *et al.*, 2001).

Homólogos a la proteína BAP se han identificado también en cepas de *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans* y *S. xylosus* aisladas de mastitis por hibridación usando el gen *bap* de *S. aureus* como sonda (Tormo *et al.*, 2005). BAP está implicada en la unión primaria así como en la siguiente etapa de agregación bacteriana, posiblemente en cooperación con PIA (Cucarella *et al.*, 2001; Cucarella *et al.*, 2004). Sin embargo, BAP también puede mediar la formación de biofilms en ausencia de PIA, lo que indica que la expresión de *bap* representa un mecanismo alternativo de formación de biofilm (Tormo *et al.*, 2005). Es evidente que los *Staphylococcus* pueden utilizar diferentes mecanismos para formar biofilms. En varios estudios, la presencia de genes del operón *icaADBC* no se correlaciona completamente con la producción in vitro de biofilm, lo que indica que otros mecanismos están probablemente involucrados (Vasudevan *et al.*, 2003; Chokr *et al.*, 2006).

Una vez que las bacterias o sus toxinas llegan al epitelio secretor se producen daños de grados variables en las células alveolares. Este patógeno suele tener los factores de virulencia más poderosos, entre ellos las hemolisinas (alfa, gamma y delta), proteínas que tienen la propiedad de incorporarse a la estructura de la membrana celular de la célula afectada, formando poros que modifican la permeabilidad al agua e iones, lo que lleva a la

lisis osmótica. También pueden producir beta-hemolisina, que es una esfingomielin-fosfolipasa que altera la estructura lipídica de la membrana celular (Almeida y Matthews, 1996). A esto debemos agregar su capacidad de generar diversas enzimas (coagulasas, factor aglutinante, estafilocinasas, hialuronidasas, fosfatasas, nucleasas, proteasas, lipasas, catalasas, lisozima). También producen leucocidinas y enterotoxinas (A, B, C, D y E). Todas estas sustancias le confirieren la propiedad de ser altamente invasivo (Bergey, 1984; Morin y Hurley, 1994; Velasco y Yamasaki, 2001).

De manera tal que, la mastitis por *Staphylococcus aureus* produce daños tisulares y disminución de la producción de leche, con pérdidas del 45% por cuarto y del 15% por vaca infectada; constituyendo esta leche y las ubres afectadas, la principal fuente de contagio de dichos agentes etiológicos (National Mastitis Council, 2000b). Las bacterias dañan el sistema de conductos y tienden a producir cicatrices, que resultan en sacos de infección encerrados en la ubre, difíciles de alcanzar por los antibióticos (Figura 5).

Prácticamente, en todos los casos, las bacterias causantes de mastitis penetran a la glándula mamaria a través del canal del pezón, que funciona como la primera y más importante barrera de defensa de la misma. De allí la gran importancia de reducir la carga microbiana de la piel del pezón y preservar la funcionalidad del canal y del esfínter del pezón, antes que las bacterias penetren y colonicen el parénquima. En este último caso, ocurre la respuesta inflamatoria y con ella el daño al epitelio secretor y la disminución de la calidad de la leche (Corbellini, 2000).

Una vez que las bacterias y/o sus toxinas han superado la línea de defensa del canal del pezón y alcanzan los tejidos altos, afectan la segunda línea de defensa, que incluye factores humorales inespecíficos presentes en la leche (lactoferrina, inmuno-lactoperoxidasa, lisozima, fracciones del complemento y otros compuestos químicos) y mecanismos de defensa inmunológicos o específicos, ya sea de tipo humoral (inmunoglobulinas y otros factores solubles) o de base celular, incluyendo el sistema fagocítico (macrófagos (MA), Polimorfonucleares (PMN) y el sistema linfoideo (-L- linfocitos T, B y sin clasificar)).

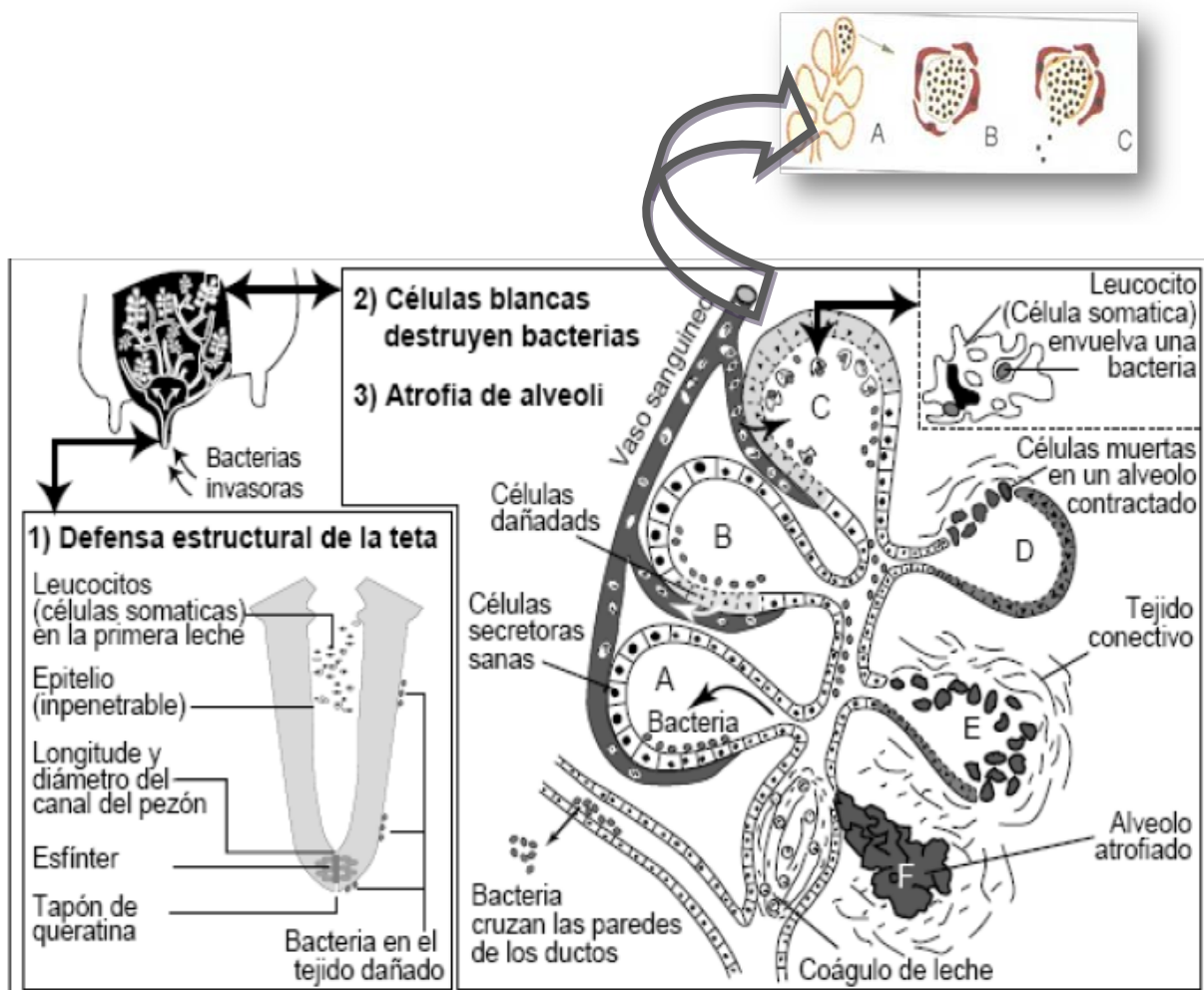


Figura 5. Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección. El *S. aureus* invade el tejido mamario formando bolsones inaccesibles a la destrucción natural o a los antibióticos.

Fuente: <http://www.infocarne.com/bovino/mastitis.asp>

Normalmente, podemos encontrar PMN, MA, L y escasas células epiteliales (CE) en la leche de cuartos mamarios sanos. Ellos constituyen las llamadas “Células Somáticas” (CS). En la leche proveniente de cuartos no infectados, el conteo de CS (CCS) es menor a 100.000/mL, consistiendo en un 12 % de PMN, 60 % de MA y 28 % de L. La proporción de CE es del 12-15 % durante las primeras 4 semanas de lactancia y menor al 2 % a medida que transcurre la misma (Corbellini, 2000).

Es decir, la mastitis no se trata de una simple enfermedad, sino de un verdadero complejo multifactorial que involucra a la vaca, al productor, a la industria, a los laboratorios farmacéuticos, al consumidor y finalmente al medio ambiente. El control de la mastitis necesita del trabajo mancomunado entre todos los sectores involucrados.

1.1.4. Identificación de la problemática.

Como mencionamos, el problema de mayor impacto sanitario y económico en las explotaciones lecheras a nivel mundial es sin duda la mastitis subclínica. Un buen manejo del tambo es fundamental en la disminución de la prevalencia para esta patología. Sin embargo, si bien se trabaja cada vez más en tratamientos alternativos a los quimioterápicos, los **antibióticos** siguen siendo una herramienta esencial, y su *uso racional* es aún una **necesidad imprescindible**.

Cuando se administran antibacterianos, para el tratamiento de enfermedades infecciosas en general y en particular para el tratamiento de la mastitis bovina, se identifican cuatro problemas concretos:

1) Uso ineficiente de agentes antimicrobianos:

- Tratamientos sin diagnóstico
- Uso innecesario de antibacterianos
- No utilización cuando son indicados
- Administración de dosis inadecuadas
- Establecimiento de periodos inter-dosis inadecuados
- Asociación ineficiente o francamente antagónica de drogas
- Desconocimiento del concepto de tiempo de retirada o lo que es peor, caso omiso del mismo.

2) Desconocimiento del comportamiento farmacocinético/farmacodinámico

- No se logra alcanzar las concentraciones adecuadas
- No se logra el tiempo de contacto adecuado
- El antimicrobiano es incapaz de llegar al sitio de localización de la bacteria
- El antimicrobiano es inactivo a nivel subcelular donde se ubica la bacteria
- La molécula es secuestrada en sitios diferentes del blanco farmacológico.

3) Falta de confirmación de cura bacteriológica.

4) Inexistencia de un severo control de residuos medicamentosos.

El fracaso terapéutico generalmente está relacionado con un **uso totalmente irracional de los antimicrobianos** en explotaciones lecheras, alcanzando a varios sectores:

1) Sector productivo: ocasionando, como mencionamos, importantes pérdidas económicas.

2) Sector industrial: ya que como vimos, la elaboración de subproductos a partir de materia prima de deficiente calidad, acarrea pérdidas económicas de magnitud y fundamentalmente impide la inserción en mercados internacionales. Las empresas padecen desde simples pérdidas, hasta desastres financieros y deterioros de su prestigio.

3) Salud pública: Este sector se ve seriamente afectado y aquí tenemos varios tópicos a considerar:

a.- Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública, aún en los países más desarrollados. El mayor peligro que tiene la leche contaminada con *Staphylococcus* reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el hombre gastroenteritis agudas.

b.- La presencia de residuos de antibióticos, que en el organismo podrán provocar desde alteraciones en la flora normal (por aumento de la presión de selección entre las poblaciones bacterianas) hasta reacciones alérgicas frente a dichos antimicrobianos en los consumidores ya sensibilizados, fundamentalmente en la población infantil.

c.- La transferencia e intercambio de determinantes genéticos de antibiótico-resistencia entre el sistema animal-hombre-ambiente.

Clásicamente el enfoque general de esta problemática se ha dirigido a la identificación del problema, sin avanzar en acciones que conlleven a controlar las causas que lo originan. No se tiene en cuenta que, una vez producidos los efectos indeseables, ya se han generado las pérdidas de los sectores involucrados.

Producir leche de buena calidad no solamente importa por su impacto en la salud pública, sino que también es un factor que estabiliza el desarrollo socio-económico en áreas

rurales, particularmente en los países en desarrollo (De Boer, 1981; McDowell, 1981, Larrea, 2011). Las exigencias de crecientes cantidades de alimentos que tiene la población mundial, en cierta forma tienden a opacar una necesidad paralela en cuanto a las cualidades nutritivas e higiénicas necesarias para satisfacer los requerimientos nutricionales inherentes a ésta.

Si bien son incuestionables las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, es muy importante entender que, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un sin número de riesgos que hacen peligrar la calidad original.

Estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos patógenos, alteración físico-química de sus componentes, adquisición de olores extraños y malos sabores; y contaminación con sustancias químicas (pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc.). Todos estos riesgos, ya sea en forma aislada o en conjunto, conspiran en forma negativa contra la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, atentan la salud pública y economía de cualquier país.

De ahí que el desafío para quienes trabajamos y convivimos a diario en este tema, no sólo es producir mayor cantidad de leche sino, también, de la mejor calidad higiénica. Para ello deben contemplarse aspectos fundamentales, como lo son la higiene microbiológica, higiene química e higiene estética, conjunto de factores que deben contribuir favorablemente a la mejora del sector lechero argentino, con el beneficio consecuente en el desarrollo físico e intelectual de las futuras generaciones.

Las implicaciones en la salud pública por el consumo de leche o derivados provenientes de vacas mastíticas en tratamiento han sido bien documentadas (Erreclade, 1996; Giesecke, 1983, 1985; Heeschen *et al.*, 1985; Mestorino y Erreclade, 2012). La leche mastítica es nutricionalmente inferior a la leche normal y estéticamente inaceptable (Giesecke, 1983). El mayor peligro que tiene la contaminación de la leche con *Staphylococcus*, reside en que algunas cepas de estos microorganismos pueden producir una enterotoxina capaz de causar en el ser humano gastroenteritis agudas. Esta enterotoxina es termoestable

y los *Staphylococcus* que la producen se encuentran con mucha frecuencia en operarios aparentemente sanos y en el ganado lechero. Este tipo de intoxicación alimentaria puede producirse, incluso, en leches correctamente pasteurizadas, bastando para ello que la leche haya permanecido en la temperatura favorable para la multiplicación de los *Staphylococcus* durante el período necesario para la producción de una cantidad peligrosa de enterotoxina.

Por otra parte los residuos de antimicrobianos también inciden en los procesos de industrialización, retrasando o suprimiendo el proceso de fermentación del yoghurt y queso; y reduciendo la calidad de la manteca (Du Preez, 1980). También existe preocupación por las eventuales toxicidades de los residuos lácteos. Los sabores indeseables reducen el valor de los mismos y la presencia de bajos niveles de antibióticos puede causar problemas de salud en los consumidores, la cual se ve afectada, también, por la transmisión de microorganismos patógenos desde la ubre enferma al hombre, pudiendo provocar enfermedades como endocarditis, meningoencefalitis, enteritis y artritis (Zurich, L y San Martín, B. 2004).

Otro de los peligros que representa la infección y consecuente terapia infructuosa de este microorganismo, es su gran habilidad para evadir los mecanismos de defensa del hospedador y sobrevivir a los tratamientos antimicrobianos implementados. Es por esta razón, que con gran frecuencia existen infecciones persistentes por *S. aureus*, que además de perdurar por largos periodos de tiempo en el animal afectado, representan un riesgo potencial en la transferencia de genes de resistencia bacteriana a otros animales, al ambiente inmediato y al hombre (Waage *et al.*, 2002).

Estas consideraciones nos incitan a desarrollar el conocimiento con miras hacia el control de infecciones intracelulares, tomando como modelo al *Staphylococcus aureus*, microorganismo incluido en los programas de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos como **bacteria patógena zoonótica emergente** (OIE, capítulo 6.7 del Código Sanitario para los animales terrestres).

El tratamiento antibacteriano frente a microorganismos capaces de mantenerse y prosperar en el medio intracelular, por lo tanto, significa un reto de grandes proporciones, ya que las bacterias en este estado son especialmente refractarias a los mecanismos inmunes (tanto humorales como celulares). Estas infecciones no solo son perjudiciales para

el huésped sino que constituyen una verdadera fuente de reserva para infecciones recurrentes. La pobre acción de los antimicrobianos a nivel intracelular posibilita la supervivencia de los microorganismos, y esto a su vez predispone el camino para la selección de cepas resistentes.

Las reflexiones acerca de si todos los antimicrobianos pueden o no ser efectivos contra las infecciones intracelulares, o acerca de cuáles son los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos que rigen esta actividad y también, cómo la quimioterapia puede ser mejorada en este aspecto, son las bases del presente razonamiento.

1.1.4.1. Localización intracelular de los microorganismos

Numerosos estudios han demostrado que los microorganismos pueden desarrollar diferentes estrategias para asegurar su supervivencia. Algunos de ellos se adaptan para vivir exclusivamente en el interior de la células, por lo que se denominan intracelulares obligados (*Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnettii*, *Rickettsia* spp., etc). Otros microorganismos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *Listeria* spp., *Legionella pneumophila*, algunas especies de *Salmonella* y ***Staphylococcus aureus***) pueden residir tanto dentro como fuera del medio celular y han sido denominados intracelulares facultativos y finalmente están los microorganismos extracelulares, que cumplen su ciclo vital extracelularmente (Troue y Tulkens, 1981). Este último grupo se encuentra en continua revisión ya que pueden transformarse en facultativos, por ejemplo el *Streptococcus pyogenes*, clásicamente considerado de vida extracelular, actualmente se puede localizar en el interior celular, como ocurre en los procesos de faringitis crónica en humanos (Okadaet al., 1998).

Los fagocitos, como células especializadas en la lucha contra las infecciones bacterianas, constituyen la primera línea de defensa del organismo frente a estos agentes externos. Los mecanismos microbiocidas de éstas células incluyen en primer lugar la fagocitosis o inclusión del microorganismo en el interior celular, y luego la acción bactericida

propriadamente dicha, la que puede ser dependiente de oxígeno (producción de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno) o independiente de oxígeno (enzimas hidrolíticas).

A su vez los microorganismos intracelulares, pueden evadir la acción microbicida de los fagocitos por diferentes mecanismos. Unos inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, por lo que las bacterias proliferan intracelularmente y sobreviven o en los lisosomas (*M. leprae*) o en los fagosomas (*M. tuberculosis*, *Chlamydia* spp.); también pueden producir toxinas, que causan exocitosis o rotura de la membrana del lisosoma o del fagosoma; o bien producir enzimas inactivantes de los productos de oxidación del fagocito, como las catalasas, que desdoblan el peróxido de hidrógeno producido por los fagocitos en agua y oxígeno (*S. aureus*) (Mandell, 1975). Dentro de la célula, los microorganismos pueden localizarse en diferentes lugares: en el fagosoma o en el fagolisosoma, como *S. aureus* o *Haemophilus influenzae*; en el citosol, como *Salmonella* spp., *Rickettsia* spp.; o pueden ser capaces de traspasar la membrana del fagosoma (*Trypanosoma cruzi*), aunque la mayoría de los microorganismos permanecen en el lisosoma (Moulder, 1985; Reinoso *et al.*, 1995) (Figura 6).

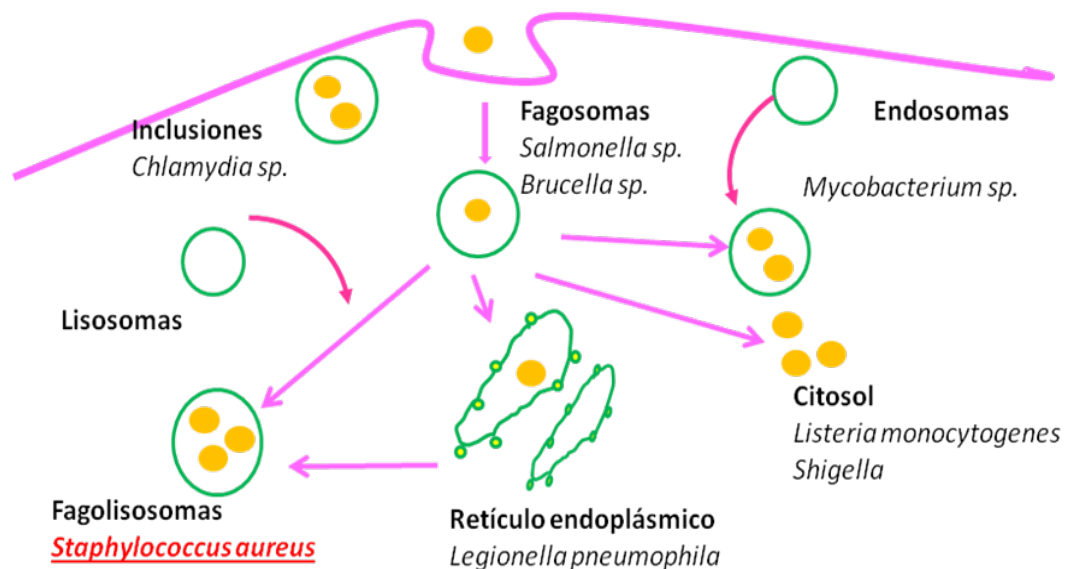


Figura 6. Localización intracelular de algunos microorganismos

Numerosos investigadores, desde el comienzo de la era antimicrobiana, han dirigido sus estudios hacia el conocimiento de la relación antimicrobiano - sistema inmunitario,

llegando a postular que los antimicrobianos habitualmente son menos efectivos en ausencia de fagocitos funcionales, o por el contrario, que la presencia de antimicrobianos incrementa la fagocitosis y el efecto bactericida de los leucocitos sin modificar su capacidad quimiotáctica (Mandell *et al*, 2001). Según los primeros estudios realizados acerca de la interacción antibiótico-bacteria intracelular-fagocito, los microorganismos intracelulares que sobrevivían dentro de los fagocitos estaban protegidos del efecto bactericida de la mayoría de los antimicrobianos hasta entonces conocidos (Magoffin y Spink, 1951; Solberg, 1972). Mandell propuso en 1973 para este suceso dos explicaciones, por un lado podría ser que la bacteria intracelular tuviera su metabolismo alterado y por lo tanto los antimicrobianos no podrían actuar, o bien, los antimicrobianos no serían capaces de penetrar en el fagosoma. Más tarde Mandell observó que la bencilpenicilina era inactiva frente al *S. aureus* fagocitado, mientras que la rifampicina mostraba actividad, por lo que llegó a la conclusión de que la incapacidad de la bencilpenicilina para actuar sobre las bacterias fagocitadas se debía, en parte, a la incapacidad de llegar al lugar de localización de la bacteria (Mandell 1973).

Los resultados de Mandell fueron el punto de partida para el desarrollo de toda una línea de investigación orientada al estudio de la penetración y localización intracelular de los antimicrobianos.

1.2. USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA MASTITIS BOVINA

Pese a las décadas de investigación y planes integrales de control, como hemos mencionado, la mastitis bovina continúa siendo un problema a nivel mundial.

Las estrategias para reducir el impacto de las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* consisten en reducir la incidencia de nuevas infecciones o disminuir la duración de las infecciones existentes (Sol *et al.*, 1997).

La terapia con antibióticos ha sido y continúa siendo la más adecuada en el tratamiento de la mastitis. Ante la instauración de una terapia con antibióticos se debería elegir el agente al cual el microorganismo es altamente susceptible, fijar la dosis y duración

del tratamiento según las características farmacocinéticas/farmacodinámicas del medicamento seleccionado. Y finalmente, cumplir rigurosamente con los períodos de retirada (Errecalde, 2000; Mestorino y Errecalde, 2012).

Cuando se decide tratar una mastitis, el tratamiento debe ser integral y completo. Para lo cual es fundamental realizar un buen diagnóstico, evaluando cuidadosamente la susceptibilidad bacteriana y eligiendo el antimicrobiano o combinación antimicrobiana más adecuada. Se debe considerar especialmente el terreno mamario y las posibilidades de penetración del producto elegido, no solamente en la glándula mamaria, sino la llegada a sitios más profundos en donde pueda encontrar al microorganismo, es decir en polimorfonucleares y aún más profundamente en los fagolisosomas.

El plan de administración implementado es fundamental, pues debe permitir el “tiempo de contacto ideal” o la “concentración adecuada” para que el medicamento logre atacar al microorganismo causal. Además se debe poner especial atención al periodo de descarte de la leche, el cual debe ser respetado meticulosamente, ya que nos permitirá enviar al mercado leche con niveles de inhibidores por debajo de los máximos niveles residuales permitidos (Errecalde, 2000).

Es decir, la eficacia de la terapia antimicrobiana en mastitis depende de varios factores, tales como el tipo de compuesto, la dosis empleada, la vía de administración, y la duración del tratamiento (Mestorino, 1993; Ziv, 1978).

Las vacas infectadas, portadoras de *S. aureus* son una fuente permanente de infección para el resto del rodeo y pueden incrementar la incidencia de infecciones. Cuanto más crónica es la enfermedad y más edad tiene la vaca, peor es el pronóstico. Se dice que por cada mes de persistencia de la infección, la probabilidad de cura disminuye en un 20%, considerando que originalmente era del 100% (Pyorälä, 1995).

El promedio de los índices de cura de mastitis por *S. aureus* tratadas durante la lactancia es del 40% y en casos crónicos es menor al 15% (Pyorälä, 1995). Los resultados del tratamiento al secado son un poco más alentadores pero siguen siendo bajos (Pyorälä, 1995).

La baja eficacia terapéutica puede atribuirse a la pobre penetración de algunos antimicrobianos en los sitios donde hay fibrosis, inflamación o abscesos, a la inactivación farmacológica por componentes propios de la sangre o la leche, a la localización intracelular del *S. aureus*, a la supervivencia en células fagocíticas y a la inducción de formas L durante el tratamiento (Nickerson *et al.*, 1999). A pesar de lo difícil que es combatir al *S. aureus* hay que recalcar que luego de la erradicación del mismo es excepcional la aparición de nuevos casos (Pyorälä, 1995).

Los antimicrobianos pueden ser administrados por dos vías: intramamaria o parenteral. La terapia combinada es aquella en la cual se administran los antimicrobianos por ambas vías en forma simultánea. Se ha postulado que este tipo de terapia es preferible en los casos de mastitis por *S. aureus* pues de esta manera se lograría una mejor penetración del antimicrobiano en el tejido glandular (Ziv, 1980; Taponem *et al.*, 2003).

La vía intramamaria (IMM), es aceptada como de elección en el tratamiento de mastitis subclínicas o crónicas, y que en el caso de mastitis agudas, frecuentemente fracasa debido a la pobre y despareja distribución del medicamento a través del intenso crecimiento del parénquima mamario, o por el bloqueo que producen los productos inflamatorios. En estas circunstancias, se prefiere la terapia parenteral (Ziv, 1980a, 1980b). No debemos olvidar que el éxito de la terapia parenteral depende del pasaje de los principios químicos desde la sangre a la leche (Mestorino, 1993). De ahí la importancia de que el médico veterinario tratante tenga conocimientos sólidos sobre determinados conceptos farmacológicos. Por ejemplo, los aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina), que son bases hidrosolubles, aplicados de manera parenteral, no presentan buena difusión hacia el interior de la glándula mamaria ni a la interfase leche célula acinar, y en mucha menor medida al interior celular, por lo que su aplicación no tiene efecto terapéutico tangible. Adicionalmente, la actividad antibacteriana de los aminoglucósidos se ve reducida casi por completo en presencia de suero, leche o pus (Fang y Vikerpur, 1995).

La llegada del antimicrobiano al interior de la glándula, ya sea luego de la administración sistémica o IMM, depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del compuesto que inciden directamente en su comportamiento PK. Estas propiedades son:

liposolubilidad del antimicrobiano, grado de ionización y porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas y a las proteínas tisulares (Ziv, 1980a).

Tradicionalmente, la mastitis subclínica por *S. aureus* es tratada en el período de secado mediante la aplicación intramamaria (IMM) de antimicrobianos. Aunque esta maniobra continúa siendo una herramienta fundamental en el control de la mastitis por *S. aureus*, el tratamiento exitoso de la mastitis subclínica durante la lactancia permitiría reducir la duración de las infecciones existentes. De esta manera se lograría mejorar la calidad de la leche obtenida, reducir la probabilidad de contagio y evitar la cronicidad en aquellas infecciones tratadas a tiempo.

Entre las desventajas del tratamiento de la mastitis subclínica por *S. aureus* durante la lactancia se destaca la relación costo-beneficio de la estrategia utilizada. Los costos incluyen el correcto diagnóstico de las vacas infectadas y los estudios de susceptibilidad de las cepas involucradas, los costos de los tratamientos antimicrobianos, la presencia de residuos químicos en la leche, el descarte de la misma y la necesidad de realizar un diagnóstico post-tratamiento que garantice el éxito de la terapia (Ziv y Sulman, 1974). Adicionalmente, existe el riesgo latente de que el tratamiento falle, razón por la cual deben diseñarse protocolos terapéuticos racionales que optimicen el uso de los antimicrobianos, ya sea en el tratamiento de secado como en el de lactancia.

A pesar de que los antimicrobianos se han instaurado en la terapéutica antimastítica hace más de 50 años, el conocimiento PK y PD de los mismos en la leche es aún limitado.

1.2.1. Tratamiento parenteral

La administración sistémica para el tratamiento de la mastitis comenzó a utilizarse en la década del 70 (Ziv, 1980a).

En los casos agudos, la administración IMM frecuentemente, como mencionamos, fracasa dada la pobre y despareja distribución del medicamento (Ziv, 1980b). En estas circunstancias, se prefiere la terapia parenteral (Ziv, 1980b).

Desde el punto de vista clínico, el éxito de la terapia parenteral depende principalmente del pasaje de los antimicrobianos desde la sangre a la leche (Ziv, 1980a, 1980b; Mestorino, 1993; Lucas, 2009). Las concentraciones antimicrobianas en tejidos altamente vascularizados son equivalentes a las determinadas en plasma sanguíneo. Por el contrario, en los sitios donde la vascularización es escasa o en aquellos que están separados del compartimento central por membranas biológicas, los niveles farmacológicos no serán equivalentes (Ziv, 1980a; 1980b).

El tiempo durante el cual las concentraciones en la glándula mamaria son efectivas depende principalmente de las características fisicoquímicas del fármaco, la dosis utilizada, la biodisponibilidad de la molécula, la capacidad de penetración en la glándula mamaria y la susceptibilidad del agente causal (Ziv, 1980a).

La capacidad de penetración en la glándula mamaria, o la biodisponibilidad láctea ($F_{láctea}$) se obtiene a partir de relacionar el $ABC_{0-\infty}$ (área bajo la curva extrapolada al infinito) en leche y el $ABC_{0-\infty}$ en plasma, tal como se observa en la ecuación 1.

$$F_{láctea} = \frac{ABC_{0-\infty}(\text{leche})}{ABC_{0-\infty}(\text{plasma})} \quad \text{Ec. 1}$$

De esta manera se puede determinar la relación que existe entre la cantidad de antimicrobiano que es absorbido y la cantidad que atraviesa la glándula mamaria y llega a la leche que se encuentra en su interior (Mestorino, 1993).

Aquellos antimicrobianos que presentan un alto volumen de distribución son los que mejor penetran en el interior de la glándula mamaria (Ziv, 1980a). Sin embargo, las diferencias en el grado de penetración sangre:leche ocurren aún entre compuestos que están química y estructuralmente relacionados. Estas diferencias pueden explicarse a través del principio de difusión pasiva (Ziv, 1980a).

Los antimicrobianos atraviesan las membranas biológicas por difusión pasiva o por transporte especializado. En la difusión pasiva las moléculas del antimicrobiano atraviesan la membrana biológica a través de la bicapa lipídica o a través de los canales o poros que se encuentran en la membrana y cuyo interior es hidrófilo (Ziv, 1980a).

Los compuestos liposolubles, polares o no polares, atraviesan la membrana por difusión pasiva a través de la porción lipídica. La transferencia en este caso es directamente proporcional al gradiente de concentración y al coeficiente de partición de la molécula (Ziv, 1980; Mestorino y Errecalde, 2012).

Los ácidos orgánicos débiles y las bases se encuentran en la leche y en el plasma en su forma ionizada o no ionizada. La fracción no ionizada es generalmente más liposoluble que la ionizada y difunde mejor a través de la membrana biológica (Ziv, 1980a; Mestorino y Errecalde, 2012). La proporción del fármaco que se encuentra en la forma no ionizada depende del pK_a de la molécula y del pH del medio en el que la misma está disuelta. Cuando las moléculas atraviesan la membrana por difusión simple, se distribuyen de acuerdo al grado de ionización, a la carga que tenga la forma ionizada y al porcentaje de unión a las proteínas o macromoléculas que se encuentran en la solución que baña la membrana biológica. Esto último se debe a que las moléculas unidas a proteínas o tejidos no son capaces de atravesar las membranas (Ziv, 1980a). Estas mismas consideraciones se deben tener en cuenta a la hora de evaluar la penetración de los agentes antimicrobianos a sitios subcelulares (Mestorino y Errecalde, 2012).

La relación entre las concentraciones teóricas de un fármaco a ambos lados de una membrana biológica, pueden ser calculadas de acuerdo a la ecuación de Jacobs, que para ácidos orgánicos tales como penicilina G ($pK_a = 2.8$) es la siguiente (Ziv, 1980a):

$$\text{Relación leche:plasma} = \frac{1 + 10^{\text{pH}_{\text{leche}} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH}_{\text{plasma}} - \text{p}K_a}} \quad \text{Ec. 2}$$

La ecuación de Jacobs aplicable en el caso de bases orgánicas, por ejemplo macrólidos ($pK_a = \text{entre } 8.2\text{-}8.8$) es la siguiente (Ziv, 1980a):

$$\text{Relación leche:plasma} = \frac{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}_{\text{leche}}}}{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}_{\text{plasma}}}} \quad \text{Ec. 3}$$

La sangre tiene un pH de 7.4 y la leche tiene un pH de 6.5-6.6 (el citosol 6.5 y el fagolisosoma 5). Las bases orgánicas administradas por la vía parenteral tienden a acumularse en los sitios más ácidos como la leche y permanecen allí en su forma ionizada

(atrapamiento iónico), alcanzando de esta manera concentraciones lácteas que superan a las plasmáticas. Por el contrario, las concentraciones de los ácidos débiles en la leche son inferiores a las concentraciones de los mismos en el plasma (Erskine, 2002, Mestorino y Errecalde, 2012).

Es decir que la mayoría de los fármacos pueden estar o no ionizados, de acuerdo a su pK_a y al pH del medio circundante. Los compuestos no ionizados tienen un coeficiente de partición lípido-agua mayor que los ionizados, y por ello difunden más fácilmente a través de la membrana (Ziv, 1980a).

Las moléculas anfotéricas, como por ejemplo danofloxacina ($pK_a = 6,2 - 9,4$), no dependen de la relación pK_a/pH y por lo tanto su distribución estará determinada fundamentalmente por el grado de liposolubilidad de la molécula y consecuentemente por el coeficiente de partición lípido-agua (Ziv, 1980a; Mestorino y Errecalde, 2012).

En la **Tabla 4** se presentan algunos antimicrobianos con sus relaciones leche:plasma teóricas y experimentales. Mediante la observación de la tabla se puede concluir que la difusión de los ácidos orgánicos hacia la leche es altamente predecible, pero que la difusión de las bases orgánicas puede predecirse sólo cuando éstas se encuentran mayormente no ionizadas en plasma y presentan un grado de liposolubilidad moderado (Ziv, 1980a).

Tabla 4: Partición de los antimicrobianos en plasma y leche en animales en periodo de lactancia.
Adaptado de Ziv G, 1980a

ANTIMICROBIANO	NATURALEZA QUÍMICA	PK _a	LIPOSOLUBILIDAD	LECHE:PLASMA (teórico- experimental)
Sulfanilamida	Ácido	10,4	Moderada	1,00 – 0,97
Sulfatiazol	Ácido	7,1	Moderada	0,37 – 0,35
Sulfadiazina	Ácido	6,5	Moderada	0,28 - 0,21
Penicilina G	Ácido	2,8	Moderada	0,16 – 0,20
Penicilina V	Ácido	2,8	Moderada	0,16 – 0,22
Cloxacilina	Ácido	2,8	Alta	0,16 – 0,22
Ampicilina	Ácido	2,8; 7,2	Alta	0,26 – 0,26
Amoxicilina	Ácido	2,8; 7,2	Alta	0,26 – 0,26
Cefacetril	Ácido	2,4	Moderada	0,12 – 0,15
Cefapirina	Ácido	2,6	Moderada	0,14 – 0,18
Rifamicina	Ácido	2,8; 6,7	Moderada	0,25 – 0,25
Rifampicina	Ácido	7,9	Alta	0,85 – 1,10
Novobiocina	Ácido	4,3	Alta	0,30 – 0,33
Penetamato	Base	8,5	Alta	5,7 – 6,1
Estreptomicina	Base	8,9	Baja	7,5 – 0,5
Polimixina	Base	10,0	Muy baja	8,0 – 0,3
Eritromicina	Base	8,8	Alta	6,5 – 8,5
Tilosina	Base	7,1	Alta	5,0 – 4,5
Espiramicina	Base	8,2	Alta	4,8 – 4,6
Lincomicina	Base	7,6	Alta	4,2 – 4,4
Cloranfenicol	Alcohol	-	Alta	1,0 – 1,0
Tetraciclina	Anfotérica	-	Moderada	0,4; 0,8 – 0,6; 1,4

En el caso de una base débil, tras su administración parenteral, por ejemplo por vía intramuscular (IM), se produce una rápida penetración desde la sangre hacia la leche caracterizada por una pronta aparición de concentraciones mensurables en este fluido, por una relación $C_{\text{máx (plasma)}} / C_{\text{máx (leche)}}$ menor o igual a 1, por un t - lag entre la $C_{\text{máx (plasma)}}$ y la $C_{\text{máx (leche)}}$ corto y por una relación $ABC_{\text{(plasma)}} / ABC_{\text{(leche)}}$ menor o igual a 1 (Ziv, 1980a).

Durante el proceso mastítico y a medida que aumenta el grado de inflamación, la composición química de la leche presenta cambios. Hay pasaje de iones, proteínas y células de la inflamación desde la sangre hacia la luz glandular por el aumento de la permeabilidad vascular. Las propiedades físicas de la leche también se ven afectadas y se produce un aumento del pH, de la conductividad y de la viscosidad; mientras que la densidad y el potencial de oxidación-reducción disminuyen (Korhonem y Kaartinen, 1985).

En la leche mastítica es esperable que el pasaje de las bases orgánicas se vea disminuido, pues el pH aumenta y esto va en detrimento del atrapamiento iónico de estos fármacos en la leche. Sin embargo, la liposolubilidad de este tipo de moléculas permite suponer que la relación leche:plasma será siempre mayor o igual a 1 (Ziv, 1980a).

En el caso de los ácidos orgánicos, la penetración se ve favorecida por el aumento del pH lácteo. Sin embargo, estos compuestos alcanzarán relaciones superiores a 1 tan solo cuando el pH lácteo sea superior a 7.4. Es por ello que las bases débiles son las más adecuadas para tratar la mastitis por la vía parenteral (Ziv, 1980a).

1.2.2. Tratamiento intramamario

La vía IMM es la ruta de administración más utilizada en el tratamiento antimicrobiano de la mastitis (Gruet *et al.*, 2001). Sin embargo, existen muchos productos que han sido lanzados al mercado sin el soporte científico necesario acerca de su comportamiento PK y su eficacia clínica y bacteriológica.

Las ventajas de la administración por la vía IMM son las altas concentraciones alcanzadas en la leche y la menor pérdida de principio activo debido a los procesos de absorción y transferencia a través de las membranas biológicas (Gruet *et al.*, 2001). Mientras que las desventajas de esta vía pueden ser la despareja distribución de varios compuestos en el interior de la ubre, el riesgo de contaminación por inoculación de bacterias a través del canal del pezón y la posible irritación del tejido mamario por el fármaco o la formulación utilizada (Gruet *et al.*, 2001). Incluso, estudios *in vitro* han demostrado que los antimicrobianos administrados por esta vía pueden afectar el proceso de fagocitosis a nivel intramamario (Nickerson 1998).

Luego de la administración de una infusión IMM, el contacto entre el agente antimicrobiano y el patógeno dentro de la glándula está supeditado a una serie de eventos sucesivos (Ziv, 1980c):

1. Fase farmacéutica: Es aquella que comienza luego de la administración del fármaco e incluye los siguientes pasos:
 - 1.1. Desintegración del formulado.
 - 1.2. Disolución del fármaco.
 - 1.3. Excreción del fármaco en la leche.
2. Fase farmacocinética: Presupone la presencia del fármaco disponible en la leche (disponibilidad farmacéutica) y comprende los siguientes eventos:
 - 2.1. Absorción (leche: plasma)
 - 2.2. Distribución (local y sistémica)
 - 2.3. Metabolismo (sistémico)
 - 2.4. Excreción (local y sistémica)
3. Fase farmacodinámica

El tipo de excipiente que contiene el formulado es el que determina la tasa de liberación del fármaco y la fase farmacéutica es la que gobierna la forma inicial de la curva de concentraciones versus tiempo del antimicrobiano en la leche (Ziv, 1980c; Mestorino, 1993; Mestorino y Errecalde, 2012).

Las formulaciones IMM utilizadas para el tratamiento de la mastitis durante el período de lactancia contienen excipientes de liberación rápida, pues el objetivo es erradicar la infección del tejido glandular y minimizar el período de descarte de la leche (Ziv, 1980c).

En los tratamientos IMM administrados al momento del secado, el proceso de liberación del principio activo se prolonga temporalmente y tiene mayor influencia sobre la forma inicial de la curva de concentración en función del tiempo (Ziv, 1980c). El excipiente utilizado puede estar compuesto por aceite vegetal o mineral. La ventaja de los excipientes que contienen aceite mineral, como por ejemplo los aceites de parafina o de glicerina, radica en que demoran la liberación del principio activo y prolongan su permanencia en el interior de la glándula (Nickerson 1998).

Luego de la administración de jeringas IMM, parte del formulado se perderá junto con la leche extraída en los primeros ordeños post-tratamiento. Esta pérdida es despreciable en el caso de los tratamientos efectuados al secado, pues las vacas son apartadas de la rutina de ordeño. Sin embargo, con la interrupción de la rutina de ordeño se desencadenan cambios fisiológicos en la glándula mamaria que pueden afectar a las fases farmacéutica y PK.

El inicio de la fase PK presupone la existencia del fármaco disponible en la secreción láctea y depende de la desintegración del formulado y la disolución del fármaco. Estos procesos determinan la disponibilidad farmacológica.

La cantidad de fármaco recuperado en la leche está influenciada por varios factores, entre los cuales se pueden nombrar el tipo de excipiente utilizado en la formulación, la tasa de pasaje leche:plasma, el tamaño de la ubre y la cantidad de leche que en ella está contenida (Ziv, 1980c).

El pasaje del antimicrobiano presente en leche implica el movimiento del fármaco a través de una membrana biológica ya sea por difusión pasiva o transporte especializado. Los factores que afectan el pasaje de los antimicrobianos desde la leche hacia el plasma o hacia el interior celular, son los mismos que afectan la transferencia de los mismos desde la sangre hacia la leche. Estos factores son el pK_a de la molécula, la liposolubilidad de la fracción no ionizada y el porcentaje de unión al tejido mamario (Ziv, 1980c; Mestorino y Errecalde, 2012). Los fármacos hidrosolubles atraviesan la membrana principalmente a través de los canales proteicos (poros). Los fármacos liposolubles (polares y no polares) atraviesan la membrana a través de la región lipoproteica y el pasaje de los mismos es directamente proporcional al gradiente de concentración y a la liposolubilidad de la molécula. La fracción no ionizada generalmente es más liposoluble que la ionizada y atraviesa la membrana lipídica con mayor facilidad.

La capacidad de atravesar la barrera leche:plasma es expresada como coeficiente de liposolubilidad por porcentaje de fracción no ionizada y la tasa de pasaje real puede ser cuantificada mediante la relación $C_{m\acute{a}x (plasma)} / C_{m\acute{a}x (leche)}$ o mediante la relación $ABC_{(plasma)} / ABC_{(leche)}$ (Ziv, 1980a).

El fenómeno de absorción leche:plasma trae como consecuencia la presencia del agente antimicrobiano en plasma sanguíneo. En la circulación sistémica, el fármaco seguirá los fenómenos PKs que se suceden luego de la absorción (distribución, metabolismo y excreción) (Ziv, 1980b; Mestorino y Errecalde, 2012).

El fenómeno de distribución del antimicrobiano en el interior de la glándula se produce por difusión pasiva de las moléculas a través de los componentes lipofílicos e hidrofílicos de la secreción glandular. Este fenómeno se ve afectado por la unión del fármaco al tejido mamario y/o a los componentes de la leche (Ziv, 1980c).

El proceso de excreción del antimicrobiano desde la glándula mamaria está gobernado por el tipo de base utilizada, la cantidad de leche producida, las características propias de la molécula, la salud de la glándula mamaria y el número de ordeños realizados (Ziv, 1980c; Mestorino, 1993; Lucas, 2009; Turic, 2010).

En el caso de tratamiento IMM de secado, la eliminación de los antimicrobianos desde la glándula mamaria puede ser expresada mediante una curva monoexponencial o biexponencial. La velocidad de eliminación se ve afectada por la dosis, la naturaleza del vehículo, las características propias del fármaco, el nivel de unión del antibacteriano al contenido de la glándula y al tejido glandular (Ziv, 1980c; Mattie *et al.*, 1997).

De manera que el fármaco seleccionado para el tratamiento de la mastitis deberá tener un espectro apropiado, alcanzar concentraciones antimicrobianas en el foco de infección (a nivel intracelular en el caso de mastitis por *Staphylococcus aureus*) sin afectar otros sistemas, ser altamente liposoluble para lograr una gran penetración a los sitios de difícil acceso en donde se encuentran los microorganismos, a su vez deberá abandonar rápidamente el sitio sin dejar residuos perjudiciales, y adicionalmente, deberá ser activo en presencia de leche, pus y fundamentalmente ser activo a nivel intracelular.

Es decir, para que obtengamos una buena respuesta al tratamiento, el microambiente del sitio de infección debe ser compatible con el fármaco elegido, por ejemplo, el sobrenadante de un absceso es ácido, hiperosmótico e hiperiónico con relativa baja concentración de sodio y cloro; y alta concentración de potasio y fosfato. Estas condiciones dificultan la acción de la mayoría de los antimicrobianos. Los fármacos que se

unen en gran proporción a las proteínas plasmáticas, también lo hacen a las proteínas del pus, por ejemplo, los aminoglucósidos y las polimixinas (Saran *et al.*, 1995). Por otra parte, los aminoglucósidos no son muy eficaces en un ambiente anaerobio debido a que dependen del oxígeno para su transporte al interior de la bacteria.

La actividad antimicrobiana de la gentamicina se ve reducida de 16 a 32 veces si el pH es ácido y se reduce aún más si hay fuerzas iónicas. De igual forma, los desechos de tejido pueden proveer el sustrato adecuado a la bacteria para enmascarar los efectos del trimetoprim y las sulfonamidas (Sumano *et al.*, 1996).

El tamaño y la pureza del inóculo, así como la cantidad de fármaco activo influyen en la actividad antimicrobiana. Muchas infecciones son polimicrobianas por lo que las complejas interacciones entre los microorganismos, el hésped y los antimicrobianos influyen sobre la actividad antimicrobiana en el sitio de infección. Estas condiciones no se hacen evidentes en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

1.3. PENETRACIÓN INTRACELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS

1.3.1. Parámetros físicoquímicos que controlan la penetración intracelular de antibióticos

La capacidad que puede o no tener un antimicrobiano para penetrar y acumularse en el interior de la célula es una cuestión compleja, que sigue en general los principios mencionados en el apartado anterior. Es decir, la capacidad de ingreso al ambiente intracelular depende de factores físicos (peso molecular, constante de disociación, liposolubilidad o unión a proteínas) y químicos (estructura básica, grupos radicales, estereoisometría, movilidad electrónica, etc.) (Brown y Percival, 1978).

La lipofilia determina la capacidad de una molécula de atravesar por difusión pasiva la bicapa lipídica de la célula. Los antimicrobianos muy hidrófilos, como los betalactámicos, tienen dificultado este paso, mientras que las quinolonas, que en general tienen una lipofilia moderada, son capaces de difundir a través de la bicapa lipídica. La mayor o menor lipofilia de las quinolonas determinará, en parte, su mayor o menor concentración intracelular.

Otro parámetro fundamental, es la naturaleza ácido-base de las moléculas, caracterizada por la constante de disociación K_a , cuya expresión logarítmica, es conocida como el pKa. Para entender su importancia en el proceso de penetración de un antimicrobiano hay que indicar primero que en el entorno fisiológico descrito existe un gradiente de pH, el pH del medio extracelular es de 7.0 a 7.4, en el interior de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) es de 6.5-6.98 y en el interior de los lisosomas es de 5.0-5.4 (Molski, 1980). Como hemos mencionado, las formas ionizadas de los ácidos y bases orgánicas débiles difunden más lentamente a través de las membranas biológicas que sus formas no ionizadas. Por ello, y por el gradiente de pH existente entre el exterior y el interior celular, las bases débiles suelen concentrarse y los ácidos débiles eluirse desde el interior celular, ya que los lisosomas son los compartimientos más ácidos de la célula, con un pH de alrededor de 5.0, el que es mantenido gracias a una bomba de protones. Entonces, nuevamente es lógico predecir que las bases débiles se acumularán en el interior de estos orgánulos, ya que se ionizarán y verán impedido su paso a través de la membrana del lisosoma; de la misma manera que se acumulaban más en leche que en el plasma sanguíneo. Por el contrario, los ácidos débiles difunden a través de la membrana plasmática en su forma no ionizada, y no se acumulan, porque al continuar neutros en el interior celular pueden difundir nuevamente hacia el exterior. Los betalactámicos son ácidos orgánicos, por lo que son capaces de atravesar la membrana plasmática, pero en el interior celular no son protonados y vuelven a salir, formando un equilibrio estable; por lo tanto son capaces de penetrar, pero no de acumularse. Esto fue demostrado por Renard *et als.*, en 1987, sintetizando un derivado básico de bencilpenicilina, que fue capaz de penetrar y acumularse en el interior celular a una concentración entre cuatro y cinco veces superior a la concentración extracelular.

En el caso de las quinolonas, son moléculas de naturaleza anfotérica, ya que todas ellas poseen un grupo carboxílico de carácter ácido y un grupo amino de carácter básico. Las constantes de disociación de las quinolonas pueden definirse molecularmente, por lo que obtendríamos dos macroconstantes (una para el grupo ácido y otra para el grupo básico), o de forma submolecular y obtendríamos cuatro microconstantes. Las macroconstantes de disociación cuantifican la característica básica global de la molécula, pero no pueden asignar

el protón a un lugar de unión determinado. Sin embargo, las microconstantes de disociación describen la capacidad de unión de un protón a un grupo funcional determinado, y son muy útiles para predecir las concentraciones de cada especie a un pH determinado.

Los estudios y revisiones realizados sobre el paso de las diferentes especies químicas de quinolonas a través de la bicapa lipídica llegan a conclusiones contradictorias. Algunos autores afirman que sólo las formas no ionizadas son capaces de atravesar la membrana plasmática, que en principio es esencialmente impermeable a los iones cargados (Nikaido y Thanassi, 1993). Mientras, otros autores afirman que los iones híbridos o "zwitteriones" también pueden atravesar membranas biológicas, ya que su carga neta es nula (Furet *et al.*, 1996), e incluso en sustancias de peso molecular elevado, la deslocalización de las cargas podría hacer que sustancias con suficiente lipofilia fueran capaces de difundir a través de las membranas biológicas (Reymond *et al.*, 1999). Takács-Nováck en 1990, realizó un estudio en el cual cuantificó el porcentaje de cada microespecie presente a diferentes pHs, y llegó a la conclusión de que la forma zwitteriónica siempre predomina sobre la neutra, aunque el valor del cociente zwitterión/neutra depende del tipo de fluoroquinolona. La forma dipolar es la predominante a pH fisiológico, y además a ese pH es cuando, en general, las fluoroquinolonas expresan su máxima actividad antimicrobiana. Así pues, a pesar de su carácter anfotérico, las quinolonas presentan a pH fisiológico una forma zwitteriónica que les permite difundir pasivamente a través de la membrana plasmática en mayor o menor grado. Quedaría también explicado por qué el pH extracelular es un factor fundamental a tener en cuenta en los estudios de incorporación al interior celular.

Otro factor que también influye en la acumulación de los antimicrobianos en el interior celular es la capacidad de unión a las proteínas. Esta unión, de naturaleza débil (enlaces electroquímicos), es reversible, pero adquiere la suficiente importancia para desplazar el equilibrio del antibiótico disuelto en el citosol y convertir a las proteínas en verdaderos depósitos de antimicrobiano (el antibiótico unido a proteínas es inactivo). Cuando la concentración de antibiótico libre en el citosol disminuye, el gradiente de concentraciones se modifica, el equilibrio se desplaza y parte del antibiótico unido a la proteína se libera. Esta acción es muy interesante al considerar la posibilidad de que las

células fagocíticas se conviertan en transportadores fisiológicos de antimicrobianos desde el torrente circulatorio hasta el lugar de la infección (Reymond *et al.*, 1999).

1.3.2. Mecanismos de penetración intracelular de los antibióticos

Los diferentes mecanismos por medio de los cuales los antimicrobianos pueden alcanzar el interior celular son: fagocitosis, difusión pasiva a través de la membrana o de poros acuosos y transporte activo.

Fagocitosis: a través de este mecanismo, el antimicrobiano es incluido en el interior del PMN cuando fagocita a las bacterias.

Difusión pasiva: el paso a través de la membrana plasmática por difusión pasiva es un mecanismo de transporte utilizado por aquellos antimicrobianos que a pH fisiológico se encuentran en forma electroquímica neutra y son lipofílicos. Como ejemplo tenemos a la rifampicina. En la determinación del mecanismo de difusión pasiva, las variables que se suelen estudiar son la viabilidad celular, la temperatura y la saturación del proceso de penetración.

En cuanto a las quinolonas, presentan un proceso de entrada que no es saturable en los intervalos de concentraciones terapéuticas, lo que abogaría por una difusión simple a través de la membrana plasmática. La baja temperatura disminuye, en general la penetración de las quinolonas (excepto para trovafloxacin), y puede atribuirse a una disminución del paso por difusión pasiva, ya que a 4 °C la membrana plasmática pierde fluidez por enfriamiento y rigidez de los fosfolípidos que conforman la bicapa (Jonson *et al.*, 1980).

Transporte activo: en los estudios para determinar el mecanismo de transporte activo se utilizan diversos inhibidores metabólicos; unos son inhibidores de fuentes de energía (NaCN, FNa, 2,4 dinitrofenol, iodoacetamida, carbonil cianida m-clorofenilhidrazona [CCCP]), otros son desacoplantes de potencial de membrana como la ouabaína, o ionóforos como el w-clorofenil hidrazona (CCP) y la gramicidina. Los inhibidores energéticos, en general, afectan el paso de las quinolonas al interior celular, lo que sugiere que estos

antimicrobianos pasan al espacio intracelular también por transporte activo (Nikaido y Thanassi, 1993).

También para caracterizar la penetración de los antibióticos se evalúa la estimulación de las células empleando diferentes principios como el forbol-miristato-acetato (PMA) que reestimula a la proteincinasa C dependiente de fosfolípidos; el formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) que estimula la producción de AMPc por una vía dependiente de Ca^{2+} ; o el zimosán que aumenta la actividad del NADPH por la vía de la fosfolipasa A_2 . En el caso de las quinolonas, la estimulación de los PMN con zimosán o PMA aumenta significativamente su paso al interior celular. En el caso de ciprofloxacina, Loo *et al.*, en 1997 demostraron que existe una relación estrecha entre el aumento de la incorporación de la quinolona al interior celular y la estimulación por PMA del sistema enzimático de una proteincinasa C dependiente de fosfolípidos. Pascual *et al.*, en 1990, también encontraron un aumento moderado (50%) en la penetración de ofloxacina y levofloxacina al interior del PMN previamente estimulado con PMA, aunque (Vazifeh *et al.*, 1999) no determinaron modificaciones en la incorporación de la levofloxacina tras estimular los leucocitos con PMA o FMLP. En los macrólidos de tipo cetólidos también se ha observado la influencia de estos y otros sustratos, como el verapamilo, que modifica los mecanismos de transducción del leucocito, disminuyendo la acumulación de todos los derivados de la eritromicina (Abdelghaffar *et al.*, 2001).

Igualmente se ha evaluado la influencia de determinados sustratos simples (aminoácidos, nucleótidos, azúcares) en la penetración de las quinolonas, para observar posibles fenómenos de competencia en los transportadores de membrana. Los resultados son contradictorios, ya que hay autores que encuentran que el paso de ofloxacina disminuye en presencia de aminoácidos (Pascual, 1989), mientras que otros no encuentran modificación alguna (Taira *et al.*, 1993). Parece que los nucleótidos, y en concreto la puromicina y la adenosina, afectan al paso de la mayoría de las quinolonas estudiadas, lo que nos inclinaría por un transportador común a todas ellas.

Es muy difícil, con estos datos, llegar a conclusiones claras sobre el mecanismo de transporte de las quinolonas a través de la membrana plasmática, pero parece ser que existiría más de un mecanismo implicado, aunque en las condiciones fisiológicas es la

difusión pasiva la que permite el paso mayoritario de las mismas; sin embargo, no hay que descartar un transporte activo adicional.

1.3.3. Penetración de los diferentes grupos antibióticos en el interior de los PMN

Betalactámicos: numerosos estudios han demostrado que, tanto las penicilinas como las cefalosporinas, se acumulan de manera escasa en el interior de los fagocitos, aunque ello no significa que sean incapaces de atravesar la membrana plasmática (muchos compuestos tienen lipofilia suficiente para difundir a través de la bicapa lipídica), sino que son incapaces de quedar retenidos en el interior celular (Jonson *et al.*, 1980, Turnidge, 1998). Todos los betalactámicos poseen en su estructura fundamental un grupo carboxílico libre, y por lo tanto se pueden considerar ácidos orgánicos. El pKa de este grupo se encuentra entre 3 y 5, por lo que cabe esperar que estas moléculas penetren pero sean excluidas del interior celular, al ser éste más ácido que el medio extracelular (Delcour, 2009). Es decir, los betalactámicos son capaces de penetrar en el interior de la célula, pero no son retenidos por ella. De hecho, un derivado básico de la bencilpenicilina, denominado dimetilaminopropil-bencilpenicilamida, cuyo grupo carboxílico está enmascarado por un radical básico, se acumula en el interior celular a una concentración de cuatro a cinco veces la extracelular (Renard *et al.*, 1987).

Aminoglucósidos: Muchos autores han mencionado que no penetran en la célula, pero estudios en fibroblastos y macrófagos han demostrado que cuando estas células se incuban durante varios días con aminoglucósidos, éstos antimicrobianos se acumulan, lentamente pero de forma estable, con valores de concentración intracelular/extracelular (I/E) de 2 a 4. La localización intracelular, aunque no homogénea, es mayoritariamente en los lisosomas, por lo que parece que la penetración de los mismos se produce por pinocitosis. Como los PMN tienen una vida media muy corta, y además no poseen la capacidad de incluir sustancias por pinocitosis, es improbable que los aminoglucósidos se acumulen en su interior (Van den Broek, 1989; Labro, 2000). Sin embargo, Hand y King-Thompson en 1980, hallaron que aunque la acumulación de gentamicina en el interior de los

PMN era escasa, este aminoglucósido era capaz de disminuir el número de *S. aureus* fagocitados.

Lincosaminas: presentan una gran capacidad de penetrar y acumularse en el interior de varios tipos celulares. En los PMN el cociente I/E alcanza valores de 40. El mecanismo de paso a través de la membrana plasmática es rápido, dependiente de energía, aumenta con la fagocitosis y parece mediado por transportadores de nucleótidos; se localiza intracelularmente en el citosol y los lisosomas (Koga, 1987; Iskandar y Walters, 2011). Sin embargo no hay correlación entre la buena penetración y la subsiguiente actividad de clindamicina frente a *S. aureus* fagocitado (Hand y Thompson, 1986). Se ha propuesto que podría deberse a que la clindamicina inactiva los sistemas bactericidas de producción de superóxido y peróxido de hidrógeno en el PMN, o que el antibiótico es inactivado por el pH del citosol o el lisosoma, donde se localiza el microorganismo (Hand, 1988).

Macrólidos: la mayoría de ellos presentan la capacidad de penetrar y acumularse en el interior de diferentes tipos celulares. En los PMN los valores de los cocientes I/E oscilan entre 20 para claritromicina, 30 para eritromicina y roxitromicina, 20 a 300 para azitromicina, y 200 a 400 para RU-64004. La penetración es rápida, parece ser dependiente de energía y mediada por transportadores de nucleótidos (Vazifehet *et al.*, 1997; Van Bambeke, 2014). Intracelularmente parecen asociados a los lisosomas en los macrófagos y a los gránulos azurófilos en los PMN (Vazifeh *et al.*, 1997). La actividad intracelular de la mayoría de los macrólidos es escasa (Hand. y, and King-Thompson 1986, Carrynet *et al.*, 2003; Van Bambeke, 2014). En la roxitromicina esta baja actividad parece estar asociada a la capacidad de inhibir en los PMN la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno (Mtairag *et al.*, 1995). En otros macrólidos parece asociarse a la inactivación debida al pH ácido del fagolisosoma donde se localizan (Pemán *et al.*, 1991). Sin embargo, los nuevos macrólidos como la azitromicina sí presentan actividad intracelular *in vivo* frente a *S. aureus* (Wildfeuer *et al.*, 1996, Carryn *et al.*, 2003; Van Bambeke, 2014).

Fluoroquinolonas: Las concentraciones celulares de fluoroquinolonas generalmente son 7 a 16 veces superiores a las extracelulares (Barcia-Macay *et al.*, 2006). Se acumulan rápidamente pero no hay, aún, una explicación convincente para su mecanismo. Se ha identificado una ruta específica del transporte en los leucocitos (PMN) para ciprofloxacina,

junto con un transportador del aminoácido activado por el acetato del miristato del forbol (Cao *et al.*, 1992, Walters *et al.*, 1999). Esta captación se podría regular, también, por la activación de la proteína kinasa C (Koichi Hotta *et al.*, 2002). La salida de la fluoroquinolona es más rápida que la captación y está mediada probablemente por un transportador del eflujo, que puede ser inhibido por el probenecid (Takahashi *et al.*, 1998). Las fluoroquinolonas intracelulares se han podido recuperar en el sobrenadante obtenido luego del fraccionamiento celular (Loo *et al.*, 1997, Prokesch y Hand, 1982). Esto se puede interpretar de dos diversas maneras: la salida o eflujo de un compartimiento subcelular específico es rápido; o las fluoroquinolonas originalmente se localizan en el citosol, pero probablemente sean capaces de difundir en varios compartimientos subcelulares como lo hacen en varios órganos del cuerpo.

1.4. BASES FARMACOLÓGICAS PARA HACER FRENTE A LA PROBLEMÁTICA

Históricamente un régimen de dosificación era determinado por parámetros farmacocinéticos (PK), sin embargo hoy se sabe que la farmacodinamia (PD) juega también, un rol muy importante. Es decir, la eficacia de los antimicrobianos *in vivo*, depende de su perfil PK como también de las propiedades PD de los mismos.

La farmacodinamia (PD) es el estudio de los efectos bioquímicos y patofisiológicos de los fármacos y sus metabolitos en el organismo (Benet *et al.*, 1996).

Las concentraciones tisulares y en los fluidos orgánicos determinan los efectos farmacológicos y toxicológicos, mientras que la concentración en el sitio de infección determina el efecto antimicrobiano (Hyatt *et al.*, 1995). De esta manera la interacción PK/PD permite relacionar los datos de la actividad microbiológica de un antimicrobiano con el perfil farmacocinético del mismo. La curva de concentración en función del tiempo del antimicrobiano se determina en función de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para la bacteria y los parámetros PKs son expresados en función de la misma. La CIM se define como la menor concentración del fármaco que es capaz de prevenir el crecimiento del microorganismo evaluado cuando se realiza la prueba de susceptibilidad por dilución en agar

o caldo. La CIM₅₀ es la concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir el 50% de los aislamientos evaluados, y la CIM₉₀ es aquella que inhibe el crecimiento del 90% (García Rodríguez *et al.*, 2000).

Así, se fijan las pautas posológicas para estos fármacos y los puntos de corte que determinan la sensibilidad o resistencia de los distintos patógenos (Van Bambeke, 1999).

Recordemos que la ocurrencia de un episodio infeccioso depende de las características del microorganismo causal, principalmente el volumen del inóculo y su patogenicidad; y de la condición inmunológica del huésped. Es decir, en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la correcta dosificación no depende solamente de las características del huésped.

En la Figura 7 se muestra la estrecha relación que existe entre el microorganismo, el huésped y el fármaco (Van Bambeke *et al.*, 1999)

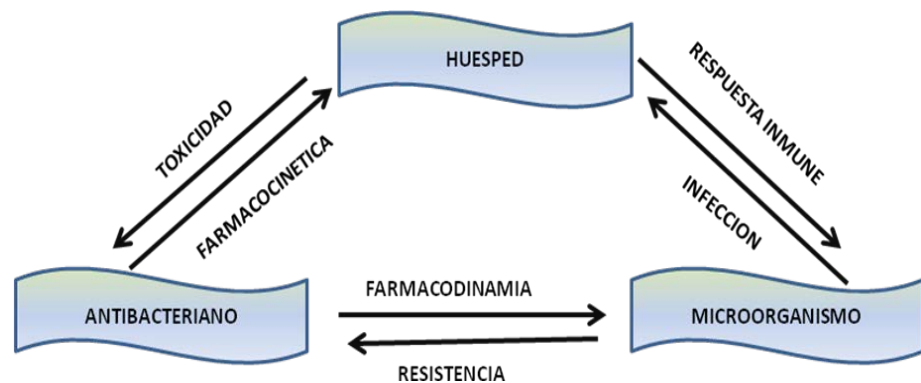


Figura 7: Triángulo de Davis: Interacción huésped-microorganismo-antimicrobiano.

Adaptado de Van Bambeke F, 1999.

El objetivo de la interacción PK/PD es establecer un protocolo terapéutico racional que permita optimizar la utilización de los antimicrobianos para maximizar la eficacia clínica y bacteriológica, minimizando la selección de cepas resistentes. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, *Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea de medicina (EMA, *European Medicine Agency*) consideran que la integración PK/PD tiene gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos y en la reevaluación de fármacos ya existentes (Van Bambeke *et al.*, 2001).

La Figura 8 muestra como la combinación de las propiedades PKs y PDs de los antimicrobianos gobierna la actividad de los mismos en el sitio de infección y son factores determinantes del resultado terapéutico.

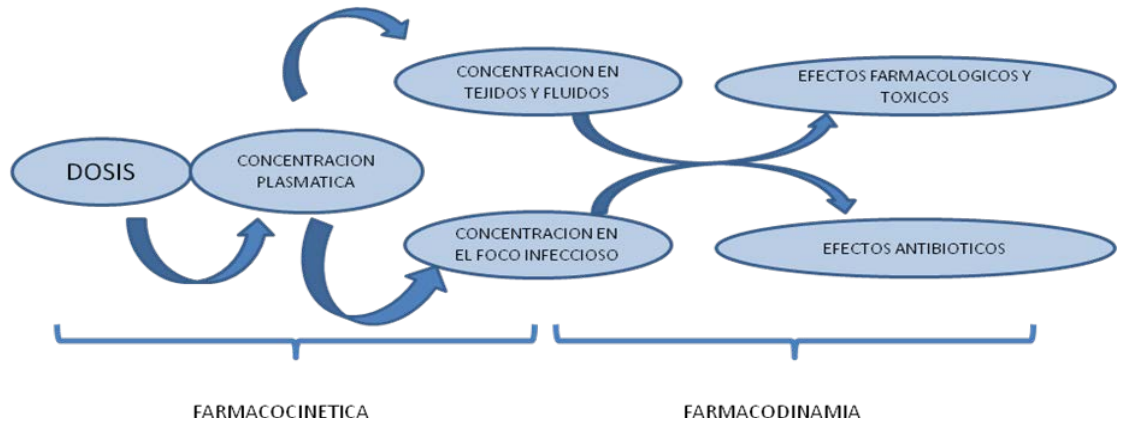


Figura 8: Factores determinantes de la actividad antimicrobiana. *Adaptado de Van Bambeke F, 1999.*

1.4.1. Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos

Los parámetros farmacocinéticos, área bajo la curva concentración en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 horas (ABC_{0-24h}) y la concentración máxima observada (C_{max}) han sido integrados con el parámetro farmacodinámico in vitro "CIM" para obtener las relaciones ABC/CIM (ABIC) y C_{max}/CIM . Un tercer predictor, es $T > CIM$ (porcentaje de tiempo sobre CIM). Estos parámetros PK/PD, esquematizados en la Figura 8, son considerados los principales determinantes de eficacia in vivo (Craig, 2001, Mouton *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que elevados valores de ABIC y C_{max}/CIM son importantes para aquellos antimicrobianos cuya actividad depende de la concentración lograda como son las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos. Algunos antimicrobianos como los betalactámicos, los macrólidos, glicopéptidos y otras drogas bacteriostáticas tienen efectos dependientes del tiempo de exposición, donde el lapso de tiempo durante el cual las concentraciones son mantenidas por encima de la CIM es importante; sin embargo, el aumentar la concentración

por arriba de cierto límite no incrementa el efecto bactericida o bacteriostático (Hyatt *et al.*, 1995; Renard *et al.*, 1996).

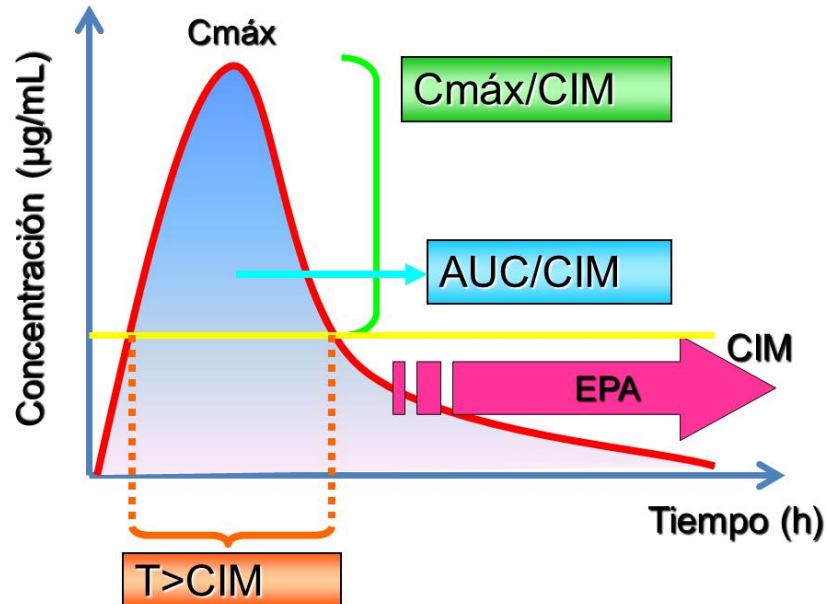


Figura 9: Parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos que gobiernan la eficacia antimicrobiana: $C_{\text{máx}}/\text{CIM}$, ABC/CIM y $\text{T} > \text{CIM}$

El mecanismo de acción de cada familia de antimicrobianos determina una cinética de acción específica. Por lo tanto y de acuerdo al criterio PD, los antimicrobianos se clasifican en agentes cuya actividad bacteriológica es tiempo-dependiente o concentración-dependiente.

Para los antimicrobianos cuya acción bacteriológica es tiempo-dependiente, el parámetro PK/PD que mejor se correlaciona con la eficacia es el $\text{T} > \text{CIM}$ (Craig, 1998; Mouton *et al.*, 2005), que corresponde al porcentaje (%) de tiempo interdosis durante el cual las concentraciones del antimicrobiano se encuentran por arriba de la CIM_{90} . Cuando se utiliza este tipo de compuestos la optimización del tratamiento se basa en ajustar los intervalos interdosis para lograr que la concentración antimicrobiana en el sitio de la infección no caiga por debajo de la CIM (Van Bambeke y Tulkens, 2001).

Para los compuestos cuya acción bacteriológica es concentración-dependiente, los parámetros $\text{ABC}_{0-24\text{h}}/\text{CIM}$ o $C_{\text{máx}}/\text{CIM}$ son los que mejor predicen la eficacia (Craig, 1998). La

optimización del ABC_{0-24h}/CIM , cuya unidad es horas, se basa esencialmente en adaptar la dosis diaria total, que es la que gobierna el ABC_{0-24h} . El parámetro $C_{m\acute{a}x}/CIM$ depende de la cantidad administrada en la primera dosis (Bambeke y Tulkens, 2001), no tiene unidad alguna, ya que es una relación. En el sitio de infección, la $C_{m\acute{a}x}$ depende a su vez de la cantidad relativa de la dosis administrada que alcanza el mismo y de la velocidad a la cual discurre su acceso.

Una clasificación más compleja involucra al efecto persistente y de esta manera divide a los antimicrobianos en compuestos acción tiempo-dependiente con nulo a mínimo efecto persistente, agentes acción tiempo-dependiente con prolongado efecto persistente y agentes acción concentración-dependiente que poseen efecto persistente prolongado (**Tabla 5**) (Jacobs, 2004).

El efecto persistente de los antimicrobianos puede ser de 3 tipos: el efecto post-antibiótico (PAE), el efecto sub-CIM (ESC) y el efecto de potenciación leucocitaria (EPL). Los antimicrobianos cuya acción es concentración-dependiente presentan generalmente PAE y ESC considerables.

La supresión persistente del crecimiento bacteriano que sigue a la exposición de las bacterias a los antimicrobianos se denomina efecto post-antibiótico (PAE) y es una de las características PDs más relevantes para la optimización de los regímenes terapéuticos (Craig, 1991). El PAE ha sido demostrado para un número de compuestos entre los cuáles se destacan los aminoglucósidos, la rifampicina, las fluoroquinolonas, los glucopéptidos y las tetraciclinas (Aeschlimann *et al.*, 1999; Boswell *et al.*, 1999). El fundamento del PAE es que la unión del antimicrobiano a las estructuras bacterianas desencadena una serie compleja de alteraciones ultraestructurales que afectan la morfología y funcionalidad enzimática normal. Como consecuencia de estos cambios, las bacterias supervivientes no recobran su funcionamiento normal hasta pasado un tiempo más o menos largo (Pastor, 1992).

El ESC es aquel por el cual las concentraciones inferiores a la CIM producen retrasos en el crecimiento de las bacterias y afectan la expresión de algunos de sus factores de virulencia (Shryock *et al.*, 1998). El ESC difícilmente puede integrarse al diseño de planes

terapéuticos ya que favorecería la exposición de los microorganismos a concentraciones subóptimas y con ello al desarrollo de cepas resistentes (Van Bambeke y Tulkens, 2001).

Por último, el EPL es aquel por el cual las bacterias tratadas con antimicrobianos son más sensibles a la fagocitosis y destrucción por parte del sistema inmune (Van Bambeke y Tulkens, 2001). Este efecto ha sido demostrado para varios antimicrobianos aunque aún no es de gran relevancia a la hora de diseñar los planes terapéuticos.

De acuerdo a esta nueva clasificación, la eficacia bacteriológica de los compuestos tiempo-dependiente con nulo a mínimo efecto persistente se correlaciona mejor con el $T > CIM$ y en el caso de los agentes con prolongado efecto persistente el parámetro a tener en cuenta es el ABC_{0-24h}/CIM (Jacobs, 2004).

Tabla 5: Clasificación de los agentes antimicrobianos desde el punto de vista PK/PD. Adaptado de Jacobs M, 2004.

ACTIVIDAD BACTERIOLÓGICA	PARÁMETRO PK/PD	EJEMPLOS
<i>Tiempo- dependiente con PAE nulo a mínimo</i>	<i>Porcentaje del intervalo inter-dosis durante el cual la concentración permanece sobre la CIM ($T > CIM$)</i>	<i>Cefalosporinas Macrólidos tradicionales^a Monobactams Oxazolidonas Penicilinas</i>
<i>Tiempo- dependiente con PAE prolongado</i>	<i>Área bajo la curva sobre la CIM en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 horas (ABC_{0-24h}/CIM)</i>	<i>Azitromicina^a Claritromicina^a Clindamicina Ketólidos^a Streptograminas Tetraciclinas Vancomicina</i>
<i>Concentración dependiente con PAE prolongado</i>	<i>Área bajo la curva sobre la CIM en función del tiempo desde la hora 0 hasta las 24 h (ABC_{0-24h}/CIM) Concentración máxima sobre la CIM ($C_{máx}/CIM$)</i>	<i>Aminoglucósidos Fluoroquinolonas Metronidazol</i>

^aExisten discusiones acerca de los parámetros apropiados y en los casos que corresponde, se discute más adelante

De esta manera, han sido establecidos los parámetros PK/PD que mejor predicen la eficacia clínica y la prevención de la selección de cepas resistentes para un gran número de antimicrobianos. Sin embargo, con el objetivo de unificar criterios se ha determinado que un

$ABC_{0-24h}/CIM_{90} > 100$ para cualquier tipo de antimicrobiano empleado, permitiría disminuir los riesgos de desarrollo de resistencia bacteriana (Ronald, 2000). Por lo tanto, sea cual fuere el grupo de antimicrobianos utilizados, el parámetro ABC_{0-24h}/CIM_{90} podría aplicarse para el control de la resistencia bacteriana.

Por otro lado existe una preocupación creciente dado que la selección de microorganismos patógenos de los animales constituye un riesgo para la eficacia de los antimicrobianos más utilizados en animales de consumo y es una amenaza para la salud humana, debido a la transmisión de estos microorganismos por los alimentos. Se sabe que las estrategias inapropiadas de administración pueden incrementar la velocidad con la cual las bacterias resistentes a antimicrobianos son seleccionadas. La relación farmacocinética-farmacodinamia que está asociada con el desarrollo de resistencia ha sido estudiada y para muchos antimicrobianos (cefalosporinas y fluoroquinolonas) el ABIC desde las 0 hasta las 24 h fue un importante indicador en el desarrollo de resistencia, lo cual mejoró cuando la exposición al antimicrobiano fue con un ABIC mayor a 100 (Thomas *et al.*, 1998).

Las diferencias en las especies tanto de hospedadores como de bacterias, el estado inmunitario y la localización de la bacteria (particularmente la localización intracelular) afectarán la relación farmacocinética-farmacodinamia. Las ABIC y las concentraciones usadas en la relación C_{max}/CIM en la literatura, obtenidas a partir de estudios en ratas neutropénicas han suministrado estimaciones conservadoras de éxito, cuando son trasladadas a animales domésticos inmunocompetentes. Más aún, la relación farmacocinética-farmacodinamia calculada con concentraciones plasmáticas no suministra predicciones precisas de eficacia en situaciones como en la mastitis estafilocócica. En esta situación, las concentraciones de antimicrobiano en el compartimiento mamario, y particularmente en la localización subcelular de las bacterias, son muy diferentes a las del plasma y la actividad de los antimicrobianos puede también ser afectada por el ambiente ácido del fagolisosoma.

Como concepto general, se acepta que en los sistemas farmacocinéticos lineales, las concentraciones plasmáticas del fármaco no unido a proteínas guardan una relación de tipo lineal con respecto a las concentraciones en el espacio extracelular (Toutain *et al.*, 2002).

Esto es relevante en el caso de infecciones bacterianas en las cuales el agente etiológico se ubica extracelularmente.

Sin embargo, la teoría de la relación lineal entre concentraciones plasmáticas y extracelulares periféricas no explica cual es la proporción que guardan estas concentraciones entre sí (Toutain y Lees, 2004).

Por otra parte, factores como el sitio o el órgano de ubicación del agente bacteriano y su irrigación sanguínea, conjuntamente con el grado de unión y afinidad del fármaco a las proteínas plasmáticas determinan que las concentraciones plasmáticas totales no siempre reflejen en forma directa la concentración libre del agente antibacteriano en el sitio de localización de la bacteria (Mueller *et al.*, 2004; Toutain y Bousquet-Melou, 2004).

Como se ha mencionado con anterioridad, es corriente que la selección de un agente antimicrobiano y su dosis sean seleccionados tomando en cuenta como parámetro farmacocinético (PK) los niveles de concentración plasmática total del mismo y un parámetro farmacodinámico (PD) estático *in vitro* como su concentración inhibitoria mínima (CIM) sobre un determinado tipo de microorganismo (Schentag, 1999).

Este parámetro farmacodinámico estático proveerá dentro del ámbito de la investigación solo una limitada información acerca de la actividad de un agente antibacteriano, ya que:

- La CIM no aporta ninguna información acerca de la velocidad de la actividad antibacteriana, como por ejemplo, si esta aumenta al incrementarse las concentraciones en el sitio de localización de la bacteria y viceversa (Craig, 1998).
- La CIM no provee ningún tipo de información acerca de la persistencia de la actividad antibacteriana luego que la exposición del microorganismo al antibiótico ha cesado (efecto posantibiótico) (Craig, 1998).
- La CIM, al referirse a una concentración constante de antimicrobiano solo aporta información farmacodinámica de tipo cualitativa, ya que hace referencia a una respuesta de tipo del todo (concentración mayor a CIM) o nada (concentración menor a CIM) (Craig, 1998).

De manera que la CIM no refleja totalmente el contexto *in vivo*, en donde las bacterias no están expuestas a una concentración constante de antibacteriano sino que esta cambia en función del tiempo transcurrido desde su administración, como consecuencia de los procesos de absorción, distribución, eliminación y excreción (Ping Liu *et al.*, 2005).

Una de las metodologías empleadas para estudiar *in vitro* el efecto de una concentración constante de fármacos antibacterianos o bactericidas sobre un número conocido de bacterias es el estudio de las curvas de muerte bacteriana. En estas la evolución de una población bacteriana en función del tiempo y en ausencia de antibacteriano son comparadas con las curvas obtenidas en presencia de un antibiótico (Craig, 2002).

La actividad de un antibiótico sobre una población de gérmenes también varía en función de factores tales como concentración y tiempo del agente antibacteriano en contacto con la bacteria; y variaciones del pH del medio (Errecalde 2004; Mestorino y Errecalde, 2012).

La velocidad de muerte bacteriana difiere según el tipo de mecanismo de acción de los antibióticos, existiendo diferencias notables entre la provocada por agentes bactericidas y bacteriostáticos (Drugeon *et al.*, 1990).

El tiempo de latencia (Tlag.) antes del inicio de la acción del principio químico en cuestión, varía también en función del antibacteriano seleccionado y de la concentración del mismo en el medio de cultivo (Drugeon *et al.*, 1990).

Así mismo, la duración del efecto posantibiótico varía en función del agente antibacteriano, su mecanismo de acción, la concentración estudiada y el tiempo de contacto de este con los gérmenes. También se ha reportado que la cinética de muerte bacteriana en condiciones *in vitro* es modificada (aumentada o disminuida) por variaciones del pH, siendo esta una variable que se debe considerar para simular las condiciones *in vivo*, ya que se establecen gradientes de pH entre el interior celular y el entorno extracelular (desde 5 en los fagolisosomas, 6.5 en el citosol o 7.4 en el espacio extracelular) o bien el medio en donde se encuentran las bacterias puede ser modificado a causa de diversas alteraciones tisulares (tejidos inflamados o presencia de material necrótico) provocadas por el mismo agente infeccioso.

Aunque las curvas experimentales de muerte bacteriana permiten realizar una interpretación dinámica de la interacción fármaco-bacteria, los alcances de este método no se llegan a explotar en su totalidad hasta que los datos experimentales son analizados por medio de modelos matemáticos.

En este sentido, la farmacodinamia ha evolucionado desde una concepción netamente empírica hasta una concepción cuantitativa, permitiendo describir y simular el efecto de un antibiótico sobre una población bacteriana en función del tiempo mediante la modelización matemática de los datos experimentales.

La principal ventaja del estudio farmacodinámico de antibióticos mediante la modelización matemática de las curvas de muerte bacteriana, radica en que se pueden analizar y comparar los efectos de diferentes perfiles de concentración del agente seleccionado, al tiempo que proporcionan información más detallada acerca del efecto antibacteriano en función del tiempo (Mueller, 2004).

Por lo tanto, la construcción de curvas de muerte bacteriana sería un procedimiento más racional para explicar la interacción fármaco-bacteria *in vivo* que el clásico parámetro estático de la MIC.

Es por todo lo mencionado con antelación que fundamentamos nuestro trabajo de investigación con el objetivo de realizar un aporte al conocimiento del comportamiento farmacocinético/farmacodinámico a nivel intracelular, de los procesos de acumulación y de la actividad intracelular de antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* aislados de bovinos portadores de mastitis subclínica.

2. HIPÓTESIS

2.1. Premisas

Consideramos que siguiendo los nuevos conocimientos generados durante las 2 últimas décadas, acerca de la terapia antibacteriana, ésta debe ser replanteada desde su base.

El incremento del conocimiento de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, permitirá desarrollar sistemas de administración que aseguren la eficacia antibacteriana y el control de la presencia de residuos en leche proveniente de animales tratados por mastitis subclínica, con mínima emergencia de cepas resistentes.

En un país como Argentina, con una enorme potencialidad ganadera y que debe volver a transformarse en proveedor internacional de alimentos al mundo globalizado, el aseguramiento de la calidad de los alimentos de origen animal es un problema insoslayable y la única forma de resolverlo es a través de la investigación, el desarrollo tecnológico y la extensión.

El uso irracional de los antimicrobianos se puede combatir mediante la implementación de esquemas terapéuticos racionales basado en los siguientes aspectos:

1. *Perfil microbiológico de la mastitis.* El diagnóstico clínico y de laboratorio (aislamiento, tipificación y antibiograma) es uno de los pilares fundamentales del uso racional de los agentes antimicrobianos.

2. *Farmacocinética/Farmacodinamia de antibióticos en animales productores de leche portadores de mastitis.* La comprensión de la relación de los parámetros farmacocinéticos con los parámetros farmacodinámicos, PK/PD, en estos animales redundará en un aumento de la eficacia antimicrobiana y en una disminución de la selección de cepas resistentes, aspectos fundamentales que hacen al éxito de la terapia.

3. *Diseño de formulaciones y de regímenes terapéuticos más eficaces y seguros.* El desarrollo de nuevos medicamentos debe involucrar más que el descubrimiento de una nueva sustancia, el aprovechamiento integral de sus efectos sobre el organismo, se debe

considerar como se transporta la molécula al sitio apropiado, y una vez allí lograr que esté disponible para su uso y sea eficaz.

4. *Establecimiento de los períodos de retirada adecuados* siguiendo los protocolos y métodos armonizados utilizados en los estados miembros de la comunidad europea.

2.2. Formulación de hipótesis

De acuerdo a las premisas mencionadas el presente trabajo se basó en las siguientes hipótesis:

- 1.- La penetración del antimicrobiano a sitios subcelulares es el primer requisito para generar eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.
- 2.- Las diferentes condiciones de pH a nivel subcelular afectan la potencia antimicrobiana de los compuestos utilizados frente a *Staphylococcus aureus*.
- 3.- El aumento del tiempo de contacto aumenta proporcionalmente la eficacia del antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*.
- 4.- Un antibacteriano concentración dependiente necesitará menos tiempo de contacto a nivel subcelular para eliminar la infección subclínica que un antibacteriano tiempo dependiente.
- 5.- Un bactericida rápido será el agente que genere mayor eficacia frente a la mastitis subclínica por *S. aureus*.
- 6.- Cuantificar la concentración de antibiótico a nivel subcelular permite desarrollar protocolos terapéuticos más racionales y eficientes.

En definitiva, el estudio del tratamiento antibacteriano de la mastitis subclínica basado en conocimientos farmacocinéticos/farmacodinámicos permitirá el diseño de planes de administración correctos, maximizando la eficacia terapéutica, repercutiendo en la producción de alimentos de origen animal libres de microorganismos patógenos y de residuos perjudiciales para la salud pública e industria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

Contribuir a una mejor comprensión de la farmacocinética/farmacodinamia de diversos antibióticos utilizados en mastitis bovina por *S. aureus*, como modelo de infección bacteriana intracelular, recurrente de difícil resolución.

Diseñar protocolos terapéuticos de máxima eficacia frente a este tipo de infecciones bacterias con mínima emergencia de cepas resistentes.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de animales portadores de mastitis subclínica.
2. Seleccionar mediante pruebas de susceptibilidad bacteriana, agentes antimicrobianos entre el siguiente menú: **β -lactámicos**: penicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cloxacilina, penetamato; **macrólidos**: azitromicina, claritromicina, espiramicina, tilmicosina; **fluoroquinolonas**: enrofloxacina, danofloxacina, marbofloxacina
3. Calcular la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los antibióticos seleccionados frente a las cepas aisladas.
4. Evaluar la incidencia del pH en la CIM
5. Construir curvas de muerte bacteriana mediante el método basado en la concentración constante de antibiótico.
6. Seleccionar el modelo farmacodinámico adecuado para explicar la interacción fármaco-bacteria en función del tiempo.
7. Calcular, si lo hubiere, la duración del efecto posantibiótico en función del microorganismo seleccionado, el antibiótico elegido, la concentración establecida y el tiempo de contacto fármaco-bacteria.
8. Estudiar “*in vitro*” los cambios farmacodinámicos producidos por variaciones del pH del medio.

9. Determinar la penetración celular de los antimicrobianos ensayados
10. Evaluar la actividad intracelular de los antimicrobianos ensayados mediante conteo de microorganismos viables
11. Seleccionar el antimicrobiano más adecuado para el tratamiento de *S. aureus*, con base en los datos previamente obtenidos.
12. Diseñar un régimen de dosificación racional para erradicar el *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Productos biológicos y materiales para microbiología

1. Cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 29213.
2. Cepa de referencia *Micrococcus luteus* ATCC 9341.
3. Discos de antibiograma: Penicilina (10UI); Ciprofloxacina (5µg); Gentamicina (10µg); Azitromicina (15µg); Tetraciclina (30µg); Eritromicina (15µg); Cefotaxima (30µg). Todos del Laboratorio Britania, Argentina. Amoxiciclina-Ácido clavulánico (20-10µg) (Pfizer Argentina).
4. Leche bovina cruda libre de antimicrobianos.
5. Medio de cultivo agar para antibióticos N° 1 (Laboratório Britania, Argentina).
6. Medios de cultivo agar Mueller Hinton (AMH) (Laboratorio Britania, Argentina).
7. Medio de cultivo caldo Mueller Hinton (CMH) (Laboratorio Britania, Argentina).
8. Medio de cultivo caldo tripticasa soya (Laboratorio Britania, Argentina).
9. Medio de cultivo agar nutritivo (Laboratorio Britania, Argentina).
10. Plasma de conejo.
11. EDTA
12. Plasma sanguíneo bovino libre de antimicrobianos.
13. Sangre bovina libre de antimicrobianos.
14. Ratonés de la cepa (C57/h3) (N=100).

4.1.2 Reactivos, solventes y diluyentes

1. Azitromicina, 84% p/p (Romikin, Argentina)
2. Danofloxacina mesilato, 75.27% p/p (Pfizer, USA)
3. Penicilina G, 1596 UI/mg (Sigma Aldrich)
4. Ciclofosfamida 200mg/mL (Criopharma)
5. Solución fisiológica estéril 0.86 g de NaCl en 100 mL de agua destilada

6. Agua tridestilada estéril
7. Agua bidestilada estéril
8. Alcohol etílico 96º
9. Metanol PA (Dorwil, Argentina)
10. Metanol calidad HPLC (Mallinckrodt Chemicals Works USA)
11. Acetonitrilo calidad HPLC (JT Backer USA)
12. Ácido fosfórico 85.1% (JT Backer USA)
13. Tetrahidrofurano (JT Backer USA)
14. Fosfato monobásico de sodio (Anhedra, Argentina)
15. Fosfato dibásico de sodio (Anhedra, Argentina)
16. Hidróxido de potasio (Anhedra, Argentina)
17. Heparina sódica (Abbot, Argentina)
18. Ficoll Hypaque 1077 (Sigma Aldrich)
19. Ficoll Hypaque 1119 (Sigma Aldrich)
20. Medio para cultivo celular RPMI 1640 (Sigma Aldrich)
21. Peróxido de hidrógeno 3%
22. Azul Tripán (Sigma Aldrich)
23. Glicerol (Anhedra, Argentina)
24. Ácido sulfúrico (UCB, Bélgica)
25. Acido Clorhídrico 1N (Anhedra, Argentina)
26. Cintas para medición de pH 5-10 (Merck KGaA, Alemania)

4.1.3 Material descartable y de laboratorio

1. Gradillas para tubos de ensayo de 10 y 16 mm de ancho (Deltalab, España)
2. Erlenmeyers graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
3. Probetas de vidrio de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
4. Matraces aforados de vidrio de 10, 100 y 250 mL (IVA, Argentina)
5. Jeringas descartables de 10, 20 y 60 mL (Prexajet, Argentina)
6. Agujas hipodérmicas estériles 18G 40 x 1.2 mm y 20G 25 x 0.9 mm (Prexajet, Argentina)

7. Bolsas para extracción de sangre estéril con anticoagulante a base de citrato de sodio (Rivero, Argentina)
8. Filtros de membrana de 0.45 μm de diámetro de poro (GE Osmonics USA)
9. Puntas para micropipetas de 5-200 μL y 100-1000 μL (Deltalab, España)
10. Pipetas de vidrio estériles de 1, 2, 5, 10 y 20 mL (IVA, Argentina)
11. Pipetas Pasteur de plástico estériles descartables (IVA, Argentina)
12. Tubos de vidrio borosilicato cónicos de 16 x 100 y 10 x 70 mm (IVA, Argentina)
13. Tubos cónicos de polipropileno autoclavables de 15 mL y tapa a rosca (Tecnon, Argentina)
14. Crioviales estériles, autoclavables, de 3 mL con tapa a rosca (Simport, Canadá)
15. Tapones de goma (Monojet, Sherwood Medical USA)
16. Tapones de polipropileno (Deltalab, España)
17. Tapones de algodón estériles
18. Placas de Petri estériles descartables de 10 cm de diámetro (Massobact, Argentina)
19. Placas de vidrio estériles (25 cm x 25 cm x 2.5 cm de altura)
20. Cilindros de acero inoxidable estériles (10 mm de alto, 6 mm de diámetro interno y 8 mm de diámetro externo)
21. Cuchara espátula de acero inoxidable
22. Calibre Vernier
23. Termómetro de laboratorio 0-100 $^{\circ}\text{C}$ (IVA, Argentina)
24. Anza de platino (Britania, Argentina)
25. Hisopos estériles
26. Pinzas anatómicas
27. Varillas de vidrio
28. Esferas de vidrio
29. Espátulas de plástico descartables
30. Algodón hidrófilo
31. Cinta adhesiva 15 mm de diámetro
32. Fibra indeleble
33. Bandas elásticas de látex

34. Planilla de distribución de muestras y patrones en los cilindros
35. Diagrama guía para la ubicación de números y cilindros
36. Jaulas metálicas estériles, con cama de aserrín estéril.

4.1.4 Instrumental

1. Micropipetas automáticas de 20-200 μ L y 100-1000 μ L (High Tech Lab, Poland)
2. Balanza de precisión (Sartorius, Germany)
3. Balanza granataria (Acculab USA)
4. Baño termostático modelo Masson (Vicking S.R.L., Argentina)
5. Baño ultrasónico modelo 250 (Acuasonic, VWR Scientific products, USA)
6. Evaporador concentrador de muestras (CHRIST CT 02 – 60 SR, Alemania)
7. Agitador multitubo (Genie, 2 Scientific Industries Inc., USA)
8. Centrifuga (Presvac, Argentina)
9. Centrifuga refrigerada RC 5B PLUS con rotor SLA3000 (Sorvall USA)
10. Equipo de filtración por vacío (Millipore USA)
11. Bomba de vacío
12. Autoclave
13. Estufa de cultivo modelo SL70C (Sanjor, Argentina)
14. Estufa de secado (Elibet, Argentina)
15. Mecheros de Bunsen
16. Espectrofotómetro UV – 2100 PC. (BIOTECK Italia)
17. Freezers -20°C (Whirlpool, Argentina)
18. Heladera con freezer (Whirlpool, Argentina)
19. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) integrado por:
 - 19.1. Autoinyector Gilson Modelo 234.(Gilson Inc., France)
 - 19.2. Bomba isocrática modelo 307 (Gilson Inc., France)
 - 19.3. Detector fluorescente (Thermo sPAEration products Fluoromonitor IM III)
 - 19.4. Software Uni Point System (Gilson Inc., france)
 - 19.5. Columna cromatográfica Phenomenex Luna 5 μ m, 1.50 x 4 mm C₁₈
(Phenomenex)

19.6. Pre-columnas Guard filter RP-C₁₈ (Phenomenex)

4.1.5 Equipamiento Informático

1. Computador personal Toshiba A 105
2. Impresora Epson TX 105
3. Software para análisis farmacocinético y estadístico WinNonlin Professional 6.3 (Scientific consulting Inc., Cary, N.C.)
4. Software estadístico Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Inc.)

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Selección de cepas y pruebas bioquímicas

El laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) de la Cátedra de Farmacología, cuenta con un importante cepario implementado a lo largo de los últimos años a partir de aislamientos realizados de muestras de leche procedentes de vacas portadoras de mastitis subclínica. Estas muestras fueron obtenidas siguiendo los procedimientos descritos por el Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos (NMC, *National Mastitis Council 1981*).

Un total de 220 cepas fueron repicadas en agar Mueller Hinton (AMH) suplementado con 5% de sangre bovina estéril, y llevadas a incubación durante 24 horas a 35°C. Posteriormente se realizó una observación macroscópica con el fin de evaluar en cada una de ellas características como color, tamaño de las colonias, aspecto general y presencia o ausencia de hemólisis.

El *S. aureus* en agar sangre presenta óptimo crecimiento a temperaturas entre 34-37°C. Tras 18 a 24 horas de incubación, se observan colonias de 1-3 mm de diámetro, de color blanco amarillento, debido a la producción de carotenoides.

En general el aspecto macroscópico de las colonias corresponde a colonias grandes, cremosas, convexas y de bordes lisos.

Las cepas fueron mantenidas en caldo tripticasa soya con 15% de glicerol a -70°C en crioviales autoclavables de 2.5 mL de capacidad. Una vez obtenidos los cultivos de cada aislamiento, procedimos a realizar las pruebas bioquímicas de rutina encaminadas a confirmar el diagnóstico bacteriológico de género y especie para *S. aureus*:

- Coloración de Gram
- Prueba de catalasa en placa
- Prueba de coagulasa en tubo.

4.2.1.1. Tinción de Gram

Esta tinción es denominada así en honor al bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844 (Bergey *et al.*, 1994). Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en Gram-positivas y Gram-negativas.

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared bacteriana es la responsable de la forma y tamaño que caracteriza a cada microorganismo y previene la lisis celular en medios osmóticamente adversos para el mismo. El material que confiere rigidez a la pared bacteriana es un peptidoglicano, siendo gruesa en bacterias Gram-positivas debido a que está constituida por varias capas interconectadas de peptidoglicano con algo de ácido teicoico. Generalmente, el 80%-90% de la pared de la célula Gram-positiva es peptidoglicano.

Mientras que la pared de las bacterias Gram-negativas, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo el 10% - 20% de la pared de la célula Gram-negativa es peptidoglicano.

En la Figura 10 se presentan las diferencias estructurales entre bacterias Gram+ y Gram-.

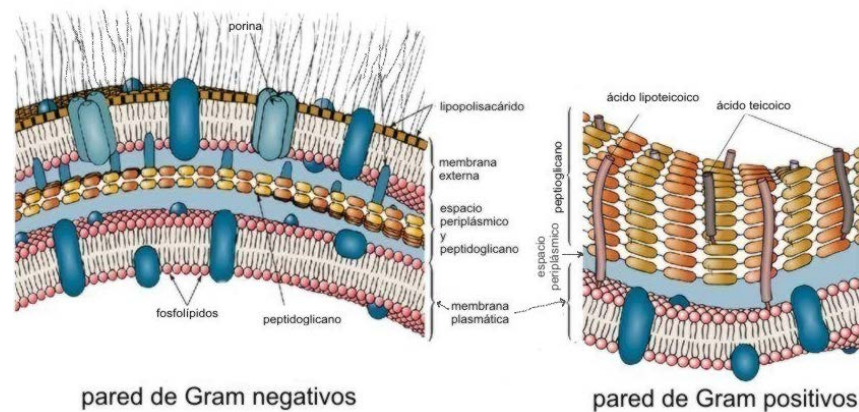


Figura 10. Diferencias estructurales entre bacterias Gram+ y Gram- (<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>).

Procedimiento

Sobre un portaobjetos y con la ayuda de un ansa de platino, correctamente desinfectada con el mechero de Bunsen, extendemos una gota de la suspensión bacteriana en caldo nutritivo con 10 % de glicerol. El portaobjetos es pasado varias veces sobre la flama del mechero hasta secarlo completamente, luego añadimos una gota del colorante cristal violeta, lo dejamos secar durante un minuto y lo lavamos con agua. Se vuelve a secar, colocamos sobre la muestra una gota de tinte Gram iodine y secamos nuevamente por un minuto. Lavamos la lámina con agua directamente de la canilla y la dejamos secar. Añadimos una gota de alcohol 70%, secamos durante un minuto, y lavamos con agua nuevamente. Una vez está seca la lámina, añadimos una gota de safranina y dejamos secar por un minuto, volvemos a lavar con agua, esperamos a que seque y observamos al microscopio.

Interpretación

Las bacterias Gram-positivas tienen una gruesa capa de péptidoglicano y gran cantidad de ácidos teicóicos que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona reteniendo el colorante inicial acompañado con iodo y visualizándose en distintos grados de tonos desde el violeta al azul claro, dependiendo de si la naturaleza de su pared celular está intacta o dañada (por tratamientos antibióticos, edad celular, etc). En contraste, las bacterias Gram-negativas tienen en su pared celular una delgada capa de peptidoglicano ligada a una membrana externa formada por moléculas de lipopolisacáridos. Esta membrana

externa es dañada por el alcohol y/o acetona de la decoloración, permitiendo que el primer colorante acomplejado con iodo escape y sea reemplazado por el contracolorante, por lo cual presentan una coloración final de rosa a rojo (Bergey *et al.*, 1994).

4.2.1.2. Prueba de catalasa

La prueba de la catalasa se usa para diferenciar miembros de la familia *Micrococcaceae* de miembros de la familia *Streptococcaceae*.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto, porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado (Fe^{3+}), en lugar del estado reducido (Fe^{2+}). Cabe recordar que, exceptuando los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (desprendimiento de burbujas).

Procedimiento

Alistamos una lámina portaobjetos sobre la cual realizamos la prueba y desinfectamos correctamente el ansa de siembra con el mechero de Bunsen. Obtenemos una colonia a partir de un cultivo de 24 h en AMH suplementado con 5% de sangre bovina. Posteriormente sobre esta muestra agregamos una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observamos la formación o no de burbujas.

Interpretación

Se considera que la aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva. Debido a que algunas bacterias poseen enzimas distintas a

la catalasa que pueden descomponer también el peróxido de hidrógeno, la observación de unas pocas pequeñas burbujas después de 20 a 30 segundos no se considera resultado positivo. Además, los eritrocitos poseen catalasa, por lo cual se debe tener el cuidado de no tomar eritrocitos junto con el material de la colonia.

4.2.1.3. Prueba de coagulasa

La coagulasa es una enzima de composición química desconocida con actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que da como resultado la formación de un coágulo visible en sistemas apropiados. *In vivo* la coagulasa produce una barrera de fibrina alrededor de la localización de la infección estafilocócica, impidiendo la fagocitosis del agente patógeno. En el laboratorio, la prueba de coagulasa se utiliza para identificar *S. aureus* y diferenciarlo de otras especies de *Staphylococcus spp.*

Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa con una sustancia de suero (factor de reacción con la coagulasa), se forma un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

Procedimiento

Con un ansa de siembra estéril colectamos una colonia a partir del centro de un cultivo en AMH. Esta muestra la emulsionamos en un tubo conteniendo 0.5mL de plasma de conejo, la llevamos a incubación a 35°C durante 4 horas, y una vez pasado este tiempo, procedemos a observar la formación del coágulo inclinando ligeramente el tubo. Como cepa control para la prueba de coagulasa se utilizó *S. aureus* ATCC 25923.

Los tubos en los cuales se notó una leve formación de coágulo, fueron reincubados a temperatura ambiente para leer nuevamente los resultados después de 18 horas.

Interpretación

La prueba de coagulasa en tubo se consideró positiva si se detectaba cualquier grado de formación de coágulos. Al inclinar el tubo con suavidad se tuvo en cuenta no agitar, debido a que la agitación puede deshacer los coágulos parcialmente formados. La fibrinólisis producida por los microorganismos también puede disolver los coágulos poco después de su formación.

4.2.2. Estudio de susceptibilidad por antibiograma

El procedimiento utilizado para evaluar la susceptibilidad bacteriana fue el método de difusión en agar, ya que 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*) (CLSI, 2009). Este procedimiento es una adaptación de lo que se detalla en el documento *M2-Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test* (NCCLS, 2000), originalmente descrito por Bauer, Kirby y colaboradores en 1966.

Consiste en depositar en la superficie del agar, previamente inoculado con el aislamiento a evaluar, discos de papel impregnados con diferentes antimicrobianos. Al entrar en contacto con la superficie húmeda del agar, cada disco absorbe agua y el antimicrobiano difunde radialmente a través del espesor del medio de cultivo. De esta manera se forma un gradiente de concentración alrededor de cada disco y, luego de 18 – 24 horas de incubación, eventualmente se definen zonas de inhibición. 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).

La concentración de antimicrobiano en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CIM (García Rodríguez *et al.*, 2000).

4.2.2.1. Medio de cultivo

El agar Mueller Hinton (AMH) es el medio adecuado para utilizar en las pruebas de susceptibilidad (CLSI 2008). Entre las ventajas de este medio de cultivo podemos mencionar: el correcto desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas, las escasas diferencias entre los lotes comerciales y la ausencia en su fórmula de timina o timidina, sustancias inhibidoras de las sulfamidas y del trimetoprim (García Rodríguez *et al.*, 2000; CLSI 2008; 2009).

El medio de cultivo fue preparado siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego de ser esterilizado por autoclave, se mantuvo en baño termostático hasta alcanzar una temperatura de 48 - 50 °C.

Utilizando una pipeta de vidrio estéril, 25 mL del medio de cultivo fueron trasvasados a cada una de las placas de Petri. Las mismas se ubicaron sobre una superficie horizontal y nivelada, con el fin de lograr una capa de agar uniforme de 4 mm de profundidad en toda su superficie.

Las placas preparadas fueron mantenidas a temperatura ambiente y una vez gelificado el agar, se llevaron a 4 °C para su utilización al día siguiente. Para comprobar la esterilidad del medio de cultivo, 2 placas preparadas con el agar proveniente de cada matraz utilizado fueron incubadas durante 24 h a 35 °C.

El control del pH del medio de cultivo gelificado y a temperatura ambiente se realizó con cintas para control de pH (Merck KGaA, Germany). De esta manera se comprobó que el medio de cultivo tuviera siempre el pH adecuado: 7.2 – 7.4.

Previo a su utilización, las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 2 h.

4.2.2.2. Inóculo bacteriano

El método utilizado para la preparación de los inóculos fue el de suspensión directa de colonias (CLSI 2008).

El día anterior a la realización del antibiograma, todos los aislamientos a evaluar y un repique de la cepa de referencia (*S. aureus* ATCC 25923) fueron sembrados en placas con

agar sangre. Las cuales fueron incubadas durante 20 h a una temperatura de 37 °C. Transcurrido el período de incubación y utilizando un ansa estéril, se tomaron 2 a 4 colonias de cada aislamiento y cada uno de ellos fue inoculado en 5 mL de caldo tripticosa soya estéril. Luego de agitar durante unos minutos, se incubó en estufa a 35°C durante 2 h, se comparó el inóculo con una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland en solución fisiológica (que equivale aproximadamente a 1×10^7 UFC/mL). Cuando la turbidez fue superior se ajustó con solución fisiológica estéril y cuando fue necesario se agregaron más colonias del aislamiento correspondiente (CLSI 2008).

A partir de cada aislamiento inoculado en caldo y en el transcurso de los 15 min posteriores a la preparación, fueron sembradas 2 placas utilizando en cada caso 1 hisopo estéril y atóxico. El hisopo fue introducido dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Para obtener un crecimiento uniforme en la placa de Petri, el hisopo fue deslizado por toda la superficie de la misma en 3 repeticiones rotando la placa 60° cada vez y por último fue deslizado por la periferia del agar. Luego de 3 - 5 min de secado, pero no más de 15 min, se procedió a depositar los discos (CLSI 2008).

4.2.2.3 Discos de antibiograma

Los frascos o contenedores de los discos de papel se mantuvieron almacenados en freezer a -20 °C y libres de humedad (CLSI 2008, 2009).

Una hora antes de su utilización, fueron llevados a temperatura ambiente. Una vez atemperados y utilizando pinzas estériles, los discos se colocaron sobre la superficie del agar inoculado ejerciendo una leve presión para asegurar el perfecto contacto con el medio de cultivo. Con el objetivo de evitar la superposición de los halos de inhibición, y siguiendo las recomendaciones del CLSI 2008, no se colocaron más de 5 discos en cada placa de Petri de 10 cm de diámetro.

Los discos incluidos en la prueba fueron: penicilina (10 UI), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ciprofloxacina (5 µg), azitromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg) y cefotaxime (30 µg).

4.2.2.4. Incubación de las placas

Las placas fueron llevadas a la estufa de cultivo antes de que transcurrieran 15 min post-colocación de los discos de antimicrobianos. Dentro de la estufa se colocaron en posición invertida y apiladas en grupos de no más de 5 placas (García Rodríguez, 2000). La incubación se realizó a 35 °C y en atmósfera aerobia durante 18 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a la observación y medición inmediata de los halos de inhibición.

4.2.2.5. Lectura de los halos de inhibición

Todas las placas fueron leídas por la misma persona y utilizando el mismo calibre de Vernier. Como corresponde cuando se utilizan medios traslúcidos, las placas fueron observadas sobre el reverso y con luz transmitida (CLSI 2008).

Se consideró como zona de inhibición al área circundante a un disco que mostró ausencia de crecimiento visible a simple vista. Las colonias pequeñas que aparecieron dentro de los halos no fueron consideradas.

La figura N°11 muestra la apariencia de la prueba de antibiograma al momento de su lectura.



Figura 11: Antibiograma correspondiente a un aislamiento de *S. aureus* causante de mastitis subclínica

4.2.2.6. Controles de calidad

La cepa de referencia utilizada para supervisar la exactitud del método fue *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI 2002). Al igual que las cepas problema, esta fue mantenida a una temperatura de -70 °C en crioviales con caldo tripticasa soya y 15% de glicerol.

Cada vez que se realizaron estudios de antibiograma, se incluyó a la cepa de referencia entre los aislamientos evaluados. Dos días antes de realizar los antibiogramas, la cepa fue sembrada en una placa de agar sangre e incubada a 37°C, durante 18 - 20 h. A partir de este cultivo puro se realizó un repique de 24 h de incubación que fue utilizado para preparar la suspensión empleada en la placa para antibiograma (CLSI 2008).

Los halos de inhibición de la cepa de referencia fueron comparados con los intervalos que el CLSI 2009 (Tabla 2, documento M31-A3) determina como aceptables (**Tabla 6**).

Tabla 6: Valores de referencia establecidos por el CLSI para los diámetros de los halos de inhibición de la cepa *S. aureus* ATCC 25923

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO ACEPTABLE (mm) <i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Penicilina</i>	10 UI	28-29 ^b
<i>Gentamicina</i>	10 µg	19-27 ^a
<i>Azitromicina</i>	15 µg	21-26 ^b
<i>Eritromicina</i>	15 µg	21-27 ^b
<i>Tetraciclina</i>	30 µg	24-30 ^a

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-S23.

Dentro de las novedades más relevantes publicadas en enero de 2013 en el documento M100-S23 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para *Staphylococcus spp.* se eliminaron los criterios de interpretación (puntos de corte) de todos los β- lactámicos a excepción de: penicilina, oxacilina y cefoxitina. Entre los β-lactámicos ahora disponibles, penicilina: representa a todas las penicilinas lábiles a penicilinasa - oxacilina: representa a todas las penicilinas estables a penicilinasa - cefoxitina: representa el marcador sustituto de oxacilina.

Para el control de los inóculos se preparó una dilución correspondiente a la turbidez 0.5 de la escala de MacFarland. Para lo cual se diluyeron 0.5 mL de cloruro de bario 0.048 M

(1.173 g de cloruro de bario dihidrato, 1.175% m/v) en 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.18 M (0.36 N, 1% v/v) con agitación constante. La solución obtenida se dividió en alícuotas de 6 mL que fueron distribuidas en tubos con tapa a rosca y almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente (CLSI 2008). Mensualmente se controló la absorción a 625 nm, la debía estar entre 0.08 y 0.10.

4.2.2.7. Interpretación de resultados

Una vez leídas las placas, se procedió a la interpretación de los resultados según los puntos de corte que establece el CLSI (**Tabla 7**). La mayoría de los valores de referencia utilizados corresponden al documento M31-A3 - *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals* (CLSI 2008). Los halos producidos por ciprofloxacina y azitromicina fueron comparados con los puntos de corte que establece el documento M100-S19 - *Disk diffusion supplemental tables* (CLSI, 2009).

Tabla 7: Valores de referencia utilizados para la interpretación de los resultados obtenidos a partir de los estudios de susceptibilidad por antibiograma frente a *S. aureus*

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACION DEL DISCO	DIÁMETRO (mm)			OBSERVACIONES
		S	I	R	
Penicilina^a	10 UI	≥ 29		≤ 28	
Gentamicina^a	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	
Azitromicina^b	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	
Eritromicina	15 µg	≥ 21		≤ 16	
Tetraciclina^a	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	Para todas las tetraciclinas

^aValores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3

^bValores de referencia tomados del documento CLSI M100-S23

El término sensible (S) indica que la infección ocasionada por la cepa evaluada podría tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales del antimicrobiano (García Rodríguez, 2000).

El término intermedio (I) o de sensibilidad intermedia indica que el halo de inhibición, traducido en valores de CIM, se aproxima a la concentración antimicrobiana alcanzable en la sangre y/o los tejidos. En estos casos podría esperarse buena eficacia clínica cuando el antimicrobiano utilizado alcanza altas concentraciones en el sitio de infección o cuando la

dosis empleada es superior a la habitual (García Rodríguez, 2000). Se incluye en esta categoría a aquellos antimicrobianos cuyos márgenes de toxicidad son estrechos (CLSI 2008).

El término resistente (R) hace referencia a los microorganismos que no serán inhibidos por las concentraciones que el antimicrobiano alcanza en la sangre y/o en los tejidos. También son resistentes aquellos microorganismos que poseen mecanismos de resistencia específicos frente al antimicrobiano evaluado (García Rodríguez, 2000).

4.2.2.8. Conservación de las cepas

Luego de la realización de los antibiogramas, los aislamientos fueron acondicionados para su conservación a -70 °C. Para lo cual, se preparó un caldo tripticasa soya al que se le agregó un 15% de glicerol. Una vez esterilizado, el caldo fue dispensado en crioviales (2 mL/criovial) y estos fueron sometidos nuevamente a esterilización por autoclave. Posteriormente, cada aislamiento fue inoculado en 2 crioviales para su conservación por duplicado.

Antes de su utilización, todos los aislamientos fueron sembrados en placas de agar sangre e incubados a 37 °C durante 24 h.

4.2.2.9. Selección de los antimicrobianos a evaluar

De la totalidad de las cepas evaluadas por la prueba de susceptibilidad por antibiograma, se seleccionaron un total de 10 al azar, las cuales fueron susceptibles a macrólidos, penicilina G y fluoroquinolonas, para continuar con los ensayos encaminados a cumplir los objetivos de esta tesis. Los antimicrobianos seleccionados para realizar las pruebas posteriores fueron: **Penicilina G, Azitromicina y Danofloxacina**. Estos tres antimicrobianos fueron seleccionados como representantes de cada uno de los tres grupos de antimicrobianos según la clasificación basada en pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas:

1. Antibióticos acción ***Tiempo dependientes con escaso/nulo efecto postantibiótico***:
β-lactámicos: **Penicilina G**,
2. Antibióticos acción ***Tiempo dependientes con prolongado efecto postantibiótico***:
Macrólidos azálidos: **Azitromicina**,
3. Antibióticos acción ***Concentración dependientes con prolongado efecto postantibiótico***: Fluoroquinolonas: **Danofloxacina**.

4.2.3. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Con las 10 cepas seleccionadas se procedió a determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a través de la prueba cuantitativa de macrodilución en caldo, basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano (García Rodríguez *et al.*, 2000; CLSI 2008). Tradicionalmente estos métodos cuantitativos se han usado para la determinación de la CIM y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2, utilizando un medio de cultivo adecuado. Posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación, para permitir el crecimiento del microorganismo, se realiza la lectura determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido.

De esta forma se determinan los valores de CIM para las cepas destinadas al estudio. Además de evaluar la sensibilidad de los microorganismos a cada antimicrobiano seleccionado a pH 7.4, que es el habitual del medio reconstituido, se evaluó la modificación o no de la sensibilidad antimicrobiana a pH 6.5 y 5.0, con el fin de emular las condiciones de

acidez a nivel subcelular a las cuales se encuentra enfrentado frecuentemente el *S. aureus*, una vez que ha ingresado al interior celular. Como así también se evaluó el comportamiento bacteriano en presencia de suero bovino (SB) y en leche.

El SB fue obtenido a partir de sangre venosa de bovinos adultos que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los últimos seis meses. La esterilidad de las muestras de suero fue corroborada por ausencia de desarrollo bacteriano mediante pruebas bacteriológicas clásicas.

La leche fue obtenida a partir de vacas Holando Argentino en producción, sanas que tampoco habían recibido tratamiento antibiótico alguno. Fue sometida a a 100 °C por 30 segundos con la finalidad de destruir los inhibidores naturales, fundamentalmente aquellos termorresistentes como son lisozimas y ribonucleasas. Posteriormente fue comprobada su esterilidad por ausencia de desarrollo mediante pruebas bacteriológicas al igual que el SB.

4.2.3.1. Modificación del pH del medio de cultivo.

El CMH, se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante. Para acidificarlo, una vez preparado, se agregó 1 mL de HCl 1N a un litro de medio de cultivo para llevar a pH 6.5 y 1.25 mL de HCl 1N a igual volumen de medio de cultivo para obtener un pH 5.

Se realizaron 3 repeticiones para cada pH y para cada antimicrobiano frente a cada cepa en estudio, siguiendo el protocolo estandarizado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (García Rodríguez *et al.*, 2000).

Procedimiento

Diluciones de los antimicrobianos.

Para la preparación de la solución madre de cada antimicrobiano, la droga pura, valorada por el fabricante, fue pesada en una balanza analítica y diluida en el volumen necesario del solvente recomendado por la CLSI (2008).

Para el cálculo de la concentración se consideró la pureza de la sustancia, con el fin de ajustar la masa de activo a pesar. Aplicamos alguna de las siguientes fórmulas propuestas por la CLSI:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}} \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{Volumen (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}} \quad \text{Ec. 5}$$

Como regla general, la solución stock se prepara a una concentración 10 veces superior a la concentración mayor que se desea evaluar.

A partir de la solución madre, realizamos diluciones seriadas utilizando los diluyentes recomendados hasta obtener una solución stock de trabajo a una concentración 4 veces superior a la mayor 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 (CLSI 2008).

Todas las soluciones que contenían antimicrobianos fueron empleadas el mismo día de su preparación y no fue necesario esterilizarlas debido a que la contaminación de las mismas es infrecuente (García Rodríguez *et al.*, 2000). A continuación se mencionan los solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock y diluciones seriadas de los antimicrobianos utilizados en la determinación de las CIMs.

Tabla 8. Solventes y diluyentes empleados para la preparación de las soluciones stock de Azitromicina, Danofloxacina y Penicilina G.

ANTIMICROBIANO	SOLVENTE	DILUYENTE
AZITROMICINA	ETANOL 95%	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
DANOFLOXACINA	AGUA	MEDIO DE CULTIVO/AGUA
PENICILINA G	ETANOL 95%	MEDIO DE CULTIVO/AGUA

Selección y preparación del medio de cultivo.

El CMH es el medio de cultivo recomendado para las pruebas de susceptibilidad (CLSI 2008). Este medio ha demostrado muy buena reproducibilidad entre los lotes, posee baja cantidad de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas; y permite buen crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos (CLSI 2008).

El medio de cultivo se preparó, siguiendo las recomendaciones del fabricante y fue distribuido en los tubos de vidrio borosilicato para posteriormente ser esterilizado en autoclave.

Se empleó una batería de 8 tubos con 1 mL de CMH por cada combinación microorganismo-antimicrobiano y un tubo sin antimicrobiano como control positivo del crecimiento bacteriano.

Preparación del inóculo.

Los inóculos bacterianos ajustados a 0.5 de la escala de Mcfarland (como mencionamos anteriormente), fueron diluidos 1 en 100, es decir 100 μ L del inóculo inicial en 9.9 mL de caldo Tripticasa Soya. Estas suspensiones fueron las que se añadieron a la batería de tubos (que contenían 1 mL de caldo con antimicrobiano) y de esta manera se obtuvieron concentraciones bacterianas de 5×10^5 UFC/ml. Los inóculos diluidos 1:100 fueron utilizados dentro de los 15 min posteriores a su preparación, tal como lo indica el (CLSI 2008).

Preparación de las diluciones seriadas e inoculación de los tubos

Antes de preparar los inóculos, se dispuso una batería de 9 tubos con 1mL de CMH estéril y sin antimicrobiano, por cada aislamiento que se deseaba probar frente a cada uno de los antimicrobianos seleccionados.

Para preparar las diluciones seriadas, utilizamos una micropipeta P1000 y puntas desechables estériles, añadimos al tubo número 1 de la batería 1 mL de la solución stock del antimicrobiano correspondiente. Este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución stock. Tras mezclar adecuadamente transferimos 1 mL al siguiente tubo, proceso

que se repitió hasta llegar al octavo tubo, del cual se eliminó 1 mL de medio con antimicrobiano para mantener el volumen final de 1 mL.

El noveno tubo contenía, en todos los casos, 1 mL de caldo de cultivo sin antimicrobiano para evaluar el crecimiento normal del microorganismo a modo de control positivo (García Rodríguez *et al.*, 2000; CLSI, 2008).

Es importante tener en cuenta que antes de inocular cada tubo con la suspensión bacteriana, las concentraciones en la batería de diluciones debían ser el doble de las concentraciones finales a evaluar. De esta manera, al ser inoculados los tubos con 1 mL de suspensión bacteriana, se lograba nuevamente una dilución 1:1 de las concentraciones pre-existentes en los mismos (García Rodríguez *et al.*, 2000; CLSI, 2008).

Este mismo procedimiento se repitió para los diferentes pHs (7.4; 6.5 y 5) y para CMH enriquecido con suero bovino estéril (SB).

En el siguiente esquema (Figura 12), se presenta la forma en la cual se realizaron las diluciones seriadas de los antimicrobianos para la determinación de la CIM.

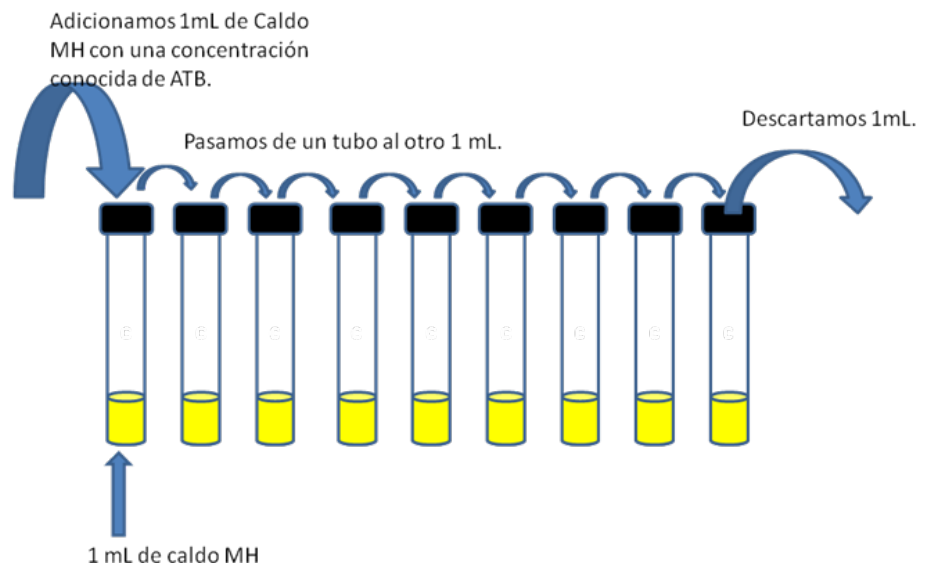


Figura 12. Preparación de diluciones seriadas de los antimicrobianos para la determinación de la CIM por el método de macrodilución en caldo

Diluciones seriadas de azitromicina.

El solvente utilizado para preparar la solución madre de azitromicina (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue etanol al 95%. Posteriormente utilizamos CMH estéril como diluyente para realizar las diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la misma se realizaron las diluciones seriadas para obtener un rango de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El rango final, luego de agregar 1 mL de inóculo bacteriano fue de: 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Diluciones seriadas de Danofloxacina

Se preparó una solución madre de danofloxacina en agua tridestilada estéril a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente utilizamos CMH estéril como diluyente para realizar las diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la cual se obtuvo un rango de diluciones inicial de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El rango final, luego agregar 1 mL de inóculo bacteriano a cada tubo fue: 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Diluciones seriadas de Penicilina G

El solvente de la solución madre de Penicilina G (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue agua tridestilada estéril. Posteriormente utilizamos CMH estéril como diluyente para realizar las diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de ésta, se realizaron nuevas diluciones seriadas hasta obtener un rango inicial de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un rango final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Incubación de las diluciones

Una vez inoculados con la suspensión bacteriana correspondiente, los tubos fueron incubados en estufa de cultivo a 35 °C durante 18 h (CLSI, 2008).

4.2.3.2. Lectura e interpretación

La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez) tras pasadas las 18 horas de incubación, se expresa en $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente y teniendo en cuenta el valor de CIM obtenido para esa cepa, se recurrió a las tablas (CLSI, 2008) para definir según los valores que en ellas aparecen, si las cepas en estudio eran sensibles o resistentes a cada antibiótico determinado.

En la Figura 13 se esquematiza la determinación de la CIM por el método de macrodilución.

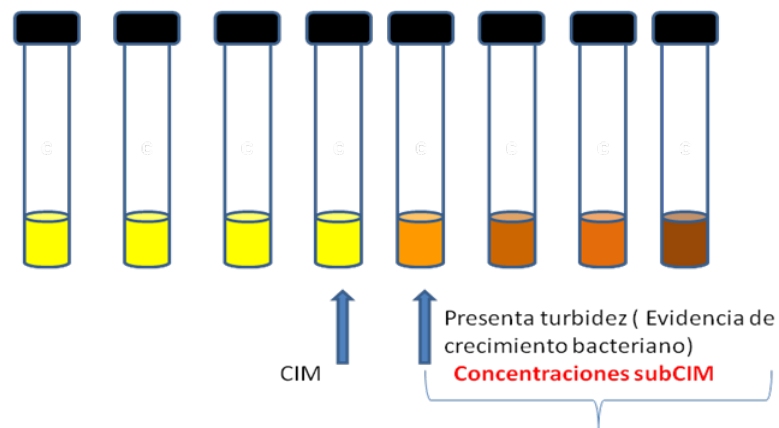


Figura 13: Lectura y determinación de la CIM

Controles de calidad

La cepa de referencia recomendada cuando se realizan estudios de susceptibilidad de estafilococos por métodos de dilución es *S. aureus* ATCC 29213 (CLSI, 2008). La misma se mantuvo a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en crioviales con caldo tripticasa soya y 15% de glicerol.

Cada vez que se realizaron estudios de susceptibilidad por el método de dilución, la cepa de referencia fue incluida entre los aislamientos evaluados. Dos días antes, la cepa se sembró en una placa de agar sangre y luego de su incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 20 h, se resembró para obtener un repique de 24 h. Este nuevo repique fue el que se utilizó para preparar la suspensión empleada en la determinación de la CIM de referencia (CLSI, 2008).

Tabla 9 rangos aceptables establecidos por CLSI (2008) como CIMs de *S. aureus* ATCC 29213.

ANTIMICROBIANOS	RANGOS ACEPTABLES ($\mu\text{g/mL}$) <i>S. aureus</i> ATCC 29213
<i>Azitromicina</i>	0.5 a 2 (<i>Azitromicina</i>) ^a
<i>Penicilina G</i>	0.25 a 2 (<i>Penicilina G</i>) ^b
<i>Danofloxacina</i>	0.06-0,25 ^b

^a Valores de referencia tomados del documento CLSI M100-S17

^b Valores de referencia tomados del documento CLSI M31-A3.

4.2.4. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

La concentración bactericida mínima (CBM), se define como la mínima concentración de antimicrobiano capaz de producir la muerte de la mayoría de los organismos viables (> 99.9%) después de 24 hs de incubación bajo condiciones estandarizadas (CLSI, 2008). Se la utiliza como un complemento de la CIM, debido a que está sujeta a variables metodológicas. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo, como vimos anteriormente. Se parte por lo tanto, del mismo método que utilizamos para obtener la CIM, para comprobar en los tubos sin crecimiento, qué concentración de antimicrobiano ha matado, no sólo inhibido, el cultivo bacteriano.

En general la CIM y la CBM, en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas, habitualmente difieren en una o dos diluciones.

El método de macrodilución en tubo es el preferido, porque el inóculo es mayor y se controlan mejor las variables técnicas.

Procedimiento

Partimos de los tubos sin crecimiento de la batería empleada para determinar la CIM (es decir del tubo correspondiente a la CIM y de los posteriores en una escala doble de menor a mayor concentración de antimicrobiano). Tomamos los tubos sembrados sin crecimiento, los agitamos suavemente y sembramos 100 μL de cada uno de ellos en placas de Petri con AMH. Para lograr una distribución homogénea en la placa empleamos perlas de

vidrio. Incubamos a 35°C. Se realizó la lectura de las colonias que habían crecido a las 24 h y se calculó qué número de colonias representaba el 0.1% del inóculo inicial.

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.

Control de calidad

Se empleó, como para la determinación de la CIM, *S. aureus* ATCC 29213 (CLSI, 2008).

4.2.5. Curvas de letalidad bacteriana (CLB)

Los efectos ejercidos por los antimicrobianos pueden ser medidos “*in vitro*” e “*in vivo*” a través de la exposición de cultivos de microorganismos a distintas concentraciones fijas de antibióticos, tomando muestras en diferentes tiempos durante un período de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias en cada muestra (Vogelman y Craig, 1986). Es decir, se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. En este sentido, es un proceso complementario de la concentración bactericida mínima (CBM). La curva de letalidad o muerte, es un método cinético de determinación del poder bactericida.

Consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo de cultivo, contando con un control sin antibiótico (curva de crecimiento control). Se hace un recuento bacteriano a diferentes tiempos. Así nos permite determinar el porcentaje de muerte bacteriana alcanzado por una concentración fija de antimicrobiano bajo condiciones controladas. Este porcentaje de muerte se determina midiendo el número de células viables (unidades formadoras de colonias –UFC-) a diferentes intervalos de tiempo como mencionamos.

El poder bactericida se establece cuando se produce una disminución de las UFC en 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado. Con esta técnica también se pueden valorar los fenómenos de persistencia, paradójico y de tolerancia. Utilizando este método se ha comprobado que los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas son rápidamente bactericidas y concentración dependiente. Es imprescindible previamente haber realizado el cálculo de la CIM, preferentemente por el método de dilución en caldo (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2001; CLSI 2008).

El “fenómeno paradójico o de Eagle” consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CBM.

La “tolerancia” es la desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado aislamiento o especie. Su significado clínico es dudoso aunque puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con otro. Esta situación ha sido comprobada en infecciones estafilocócicas que no responden al tratamiento con un antibiótico.

La “persistencia” se da cuando una pequeña población resiste a la acción bactericida, suele ser menor del 0.1% y por esto, la definición de CBM se refiere a la muerte del 99.9% del inóculo. Aparece generalmente con los β -lactámicos.

Procedimiento

Para cada combinación microorganismo/antimicrobiano, empleamos una batería de tubos; que se preparó adicionando a cada uno 1mL de CMH, leche o suero bovino, con cada una de las concentraciones de antimicrobiano a evaluar, según se describe a continuación.

El procedimiento seguido para la CLB se realizó empleando cinco baterías de tubos por cada cepa analizada para cada antimicrobiano en cuestión. En la primera batería, se determinó la curva de muerte a pH 7.4, en la segunda a pH 6.5, en la tercera a pH 5, la cuarta se realizó utilizando leche esterilizada por ebullición como caldo de cultivo y finalmente en la quinta batería el CMH fue adicionado con 40% de suero bovino estéril y libre de antimicrobianos.

Cada una de estas baterías estuvo conformada por 7 tubos de vidrio conteniendo concentraciones del antimicrobiano en cuestión, correspondientes a 0.25 CIM, 0.5 CIM, 1 CIM, 2 CIM, 4 CIM y 8 veces la CIM. Un octavo 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, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h). 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 AMH.

Cada placa se incubó a 35°C durante 24 hs. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la lectura con el consiguiente conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) a fin de observar el efecto del antimicrobiano sobre la cepa analizada. El límite de detección para esta prueba fue de 10 UFC/mL de muestra.

4.2.5.1. Preparación de las diluciones seriadas de los antimicrobianos

Se prepararon diluciones para azitromicina, danofloxacina y penicilina G. Las concentraciones de los antimicrobianos fueron calculadas individualmente en base a los valores de las CIMs de los antimicrobianos frente a cada cepa analizada en cada condición de pH evaluado.

Azitromicina

La solución madre de azitromicina (1000 µg/mL), se elaboró utilizando como solvente etanol al 95%. Posteriormente y utilizando CMH estéril como diluyente, realizamos diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 32 µg/mL.

A partir de esta solución de trabajo, se efectuaron diluciones seriadas para lograr el rango final de estudio para cada uno de los pH analizados. Así para pH 7.4, donde la CIM fue de 1 µg/mL, trabajamos con un rango de diluciones desde los 8 µg/mL hasta 0.125 µg/mL, las cuales corresponden a 8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM.

Para pH 6.5, donde la CIM fue de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales corresponden nuevamente a 8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM.

Para pH 5.0, donde la CIM fue de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales corresponden a 4 veces la CIM hasta 1/8 de la CIM.

Para realizar las CLB en leche y suero utilizamos las diluciones correspondientes a pH 6.5 y 5, respectivamente.

Danofloxacin

La solución madre de Danofloxacin (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se elaboró utilizando como solvente agua tridestilada estéril. Posteriormente y utilizando CMH estéril como diluyente, realizamos diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A partir de esta solución de trabajo, se realizaron diluciones seriadas para lograr un rango final de estudio para cada uno de los pH analizados, según se presenta a continuación:

Para pH 7.4, donde la CIM fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es decir se trabajó con concentraciones a 8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM.

Para pH 6.5, donde la CIM fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.1251 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (entre 8 veces la CIM a 1/8 de CIM).

Para pH 5.0, donde la CIM fue de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM).

Para realizar las CLBs en leche y suero utilizamos las diluciones correspondientes a pH 6.5 y 5, respectivamente.

Penicilina G

La solución madre de Penicilina G (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se elaboró utilizando como solvente agua tridestilada estéril. Posteriormente y utilizando CMH estéril como diluyente, realizamos diluciones seriadas, hasta obtener una solución stock de trabajo de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A partir de esta solución de trabajo, se realizaron diluciones seriadas para cada uno de los pHs analizados:

Para pH 7.4, donde la CIM fue de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM).

Para pH 6.5, donde la CIM fue de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde el 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.0156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM).

Para pH 5.0, donde la CIM fue de 0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$, trabajamos con un rango de diluciones desde los 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8 veces la CIM hasta 1/8 de CIM).

La modificación del pH en el medio de cultivo se llevó a cabo una vez estos fueron preparados según las indicaciones del fabricante, en ese momento, se adicionó 1mL de HCl 1N por litro de medio de cultivo para lograr un pH 6.5; y para obtener un pH 5.0 se le adicionó 1.25 mL de HCl 1N a igual volumen de medio de cultivo.

Los rangos de diluciones utilizados para la realización de las curvas de muerte bacteriana en leche y suero bovino, fueron las mismas que para pH 6.5 y 7.4 respectivamente, ya que el pH de estas 2 matrices es similar.

4.2.5.2. Inoculación

El inóculo bacteriano, tanto de las cepas problema (N = 6) como del *S. aureus* ATCC fue preparado siguiendo las recomendaciones de documento M26-A *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents* (NCCLS, 1999a), adicionando a cada tubo de las baterías mencionadas una concentración constante de UFC/mL. Partimos de cultivos en AMH de 24 hs. Tomamos de 2 a 4 colonias de cada uno y las resuspendimos en CMH hasta obtener una suspensión equivalente a 0.5 de la escala de MacFarland (que equivale aproximadamente a 1×10^7 UFC/mL). Posteriormente se realizó una dilución 1:100

con CMH, de modo tal que la dilución final, una vez que se agregó 1 mL de la suspensión a los tubos con 1 mL de medio de cultivo con antimicrobiano, fue de 5×10^5 UFC/mL.

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

Para cada cepa y cada antimicrobiano, considerando cada variable (pH, suero, leche) la prueba fue realizada por duplicado. El inóculo diluido se utilizó antes de 15 minutos tras su preparación. Los tubos una vez inoculados, se incubaron a 35°C en estufa de cultivo. A horas predeterminadas (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h) fueron retiradas alícuotas de 100 µL o diluciones de éstas preparadas en CMH (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) para facilitar el posterior recuento de UFC, de cada uno de los tubos. Estas submuestras, obtenidas a partir de los tubos de cada batería, fueron sembradas en placas de Petri con 10 mL de AMH, por medio de esferas de vidrio estéril para asegurar que el inóculo se extendiera por toda la placa. Las placas ya sembradas, fueron llevadas a incubación por 24 horas a 35°C.

4.2.5.3. Recuentos e interpretación

Tras haber transcurrido las 24 horas de incubación, realizamos el conteo manual del número de UFC presentes en cada placa, corrigiendo por el factor de dilución.

Con los datos obtenidos se graficó el logaritmo de las UFC en función del tiempo. Se consideró efecto bactericida del antimicrobiano cuando se logró una disminución de $3 \log_{10}$ (99.9 % de muerte bacteriana) de UFC en el tiempo evaluado. De esta forma pudimos determinar la existencia o no de actividad bactericida, así como la concentración a la cual se produjo y en el tiempo en que se presentó.

Además de la determinación de la actividad bactericida, por medio de la elaboración de las curvas de muerte bacteriana también podemos valorar, como mencionamos, los fenómenos de persistencia, paradójico y de tolerancia.

4.2.5.4. Modelización matemática de las curvas de crecimiento y de muerte bacteriana

En primer lugar realizamos la modelización de las curvas de crecimiento del *S. aureus* frente a diversas variables: pH (7.4, 6.5, 5), en leche y en suero.

La microbiología predictiva es una poderosa herramienta para cuantificar y predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo diversas condiciones ambientales. Entre los muchos factores que afectan el crecimiento microbiano, en nuestro caso evaluamos el pH del medio, la acción de químicos (los tres antimicrobianos seleccionados frente a diversas concentraciones en función del tiempo), y el tiempo de exposición a los mismos.

Estos modelos matemáticos se construyen midiendo la respuesta de los microorganismos en función de los principales factores de control, tales como pH, antimicrobianos, ya sea que actúen solos o combinados. Los modelos, por consiguiente, se pueden utilizar para predecir el crecimiento microbiano bajo condiciones modificadas que distan bastante de las específicamente probadas inicialmente.

La aplicación de modelos matemáticos se realiza en dos etapas principales:

- 1) Modelado de la curva de crecimiento del microorganismo.
- 2) Descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan a dicha curva.

Los modelos se pueden clasificar en tres niveles:

Modelos de nivel primario: Describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo. Los modelos se pueden cuantificar por ejemplo en UFC/mL. Ejemplos de estos modelos son la ecuación de Gompertz, la ecuación exponencial y el modelo logístico. La ecuación de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Zwietering *et al.*, 1990) determinando la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores. Permite estimar parámetros tales como tiempo de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima concentración de células (MPD) de los microorganismos en esas condiciones.

Modelos de nivel secundario: describen las respuestas de los parámetros del modelo primario al cambiar determinadas condiciones de desarrollo tales como el pH. Ejemplo: modelo de la raíz cuadrada.

Modelos de nivel terciario: utilizan un software que transforma a los modelos de nivel primario y secundario en programas más confiables. Estos permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos.

Estos modelos pueden ser caracterizados como puramente descriptivos o probabilísticos (empíricos) o basarse en criterios microbiológicos (cinéticos). En estos últimos se determina toda la curva de desarrollo de los microorganismos presentes. En los primeros se determinan, si para un determinado microorganismo, las condiciones del medio son óptimas para su desarrollo o presenta bajas o nulas probabilidades de sobrevivir. Los modelos cinéticos y los probabilísticos pueden ser relacionados, ya que la probabilidad de detectar el desarrollo de un microorganismo durante un determinado periodo de tiempo depende de la germinación, de la fase logarítmica y del tiempo de generación microbiana, o sea de parámetros cinéticos.

Los modelos matemáticos también pueden ser lineales, no lineales, segregados (población de células heterogéneas) o no segregados, estructurados (multicomponentes) o no estructurados (Whiting, 1995).

Para analizar las curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, en ausencia de antibióticos, aplicamos primero modelos primarios, el modelo de Gompertz, cuya expresión matemática es:

$$\text{Log } N = a + c \cdot \exp(-\exp(-b(t-m))) \quad \text{Ec. 6}$$

Donde: **Log N** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (Log UFC/mL) al tiempo **t**, dado en horas; **a** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al Log de los niveles iniciales de bacterias) (Log UFC/mL); **c** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos Log de crecimiento) (Log UFC/mL); **m** es el tiempo

requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (horas); **b** es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m** (h^{-1}).

De estos parámetros, se derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) (Log UFC/mL*horas), (con $e = 2,7182$), la duración de la fase de latencia (LPD = m^{-1}/b) (horas) y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares (MPD = $a + c$) (Log UFC/mL).

Estos parámetros son específicos para cada microorganismo y su ambiente. La ecuación fue ajustada a los datos del desarrollo microbiano mediante una regresión no lineal con el programa Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011), ya que los parámetros de la curva de Gompertz son no lineales.

El programa ajusta los datos a la curva, es decir calcula los parámetros de acuerdo a un determinado criterio. Los parámetros a, c, b y m son estimados, para obtener un modelo matemático completo del cual una curva de crecimiento podría ser predicha para cualquier combinación de condiciones dentro de los límites del experimento. Otros parámetros de interés como la fase de latencia, pueden derivarse entonces de la curva de predicción.

También los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo en ausencia de antibiótico pueden ser ajustados con un modelo de crecimiento exponencial:

$$N = N_0 \cdot \exp^{(Kc \cdot T)} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde N es el número de UFC/mL a un tiempo determinado, N_0 es la concentración del inóculo inicial (10^6 UFC/mL), Kc es la constante de crecimiento de orden uno (h^{-1}) y T es el tiempo (h).

Luego evaluamos las curvas de muerte bacteriana, es decir en presencia de antibiótico, para lo cual los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo fueron ajustados con un modelo sigmoideo menos base:

$$N = N_0 - \frac{N_{max} \cdot T^Y}{T_{iso}^Y + T^Y} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde N es el número de UFC/mL a un tiempo determinado, N_0 es la concentración del inóculo inicial (10^6 UFC/mL), N_{max} es la población bacteriana final, T_{150} es el tiempo necesario para que se alcance 50% de la inhibición bacteriana máxima, γ es el coeficiente de sigmoidicidad y T es el tiempo. Los datos experimentales fueron ajustados con los modelos de regresión no lineal de mínimos cuadrados empleando el programa informático Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011).

También empleamos el modelo de regresión lineal, ya que es el modelo indicado principalmente cuando el número de microorganismos se mantiene constante o decrece durante el tratamiento. La ecuación, en ese caso se expresa como:

$$\text{Log } N_t = \text{log } N_0 + a t \quad \text{Ec. 9}$$

Donde: **Log N_t** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos finales (Log UFC/mL) al cabo del tiempo t , dado en horas; **Log N_0** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos iniciales (Log UFC/mL); **a** corresponde a la pendiente de la regresión ($(\text{UFC/ml})^{-1}\text{h}^{-1}$) (Whiting, 1995) que es negativa cuando hay efecto bactericida.

De manera que los análisis farmacodinámicos de los datos obtenidos a partir de las curvas de crecimiento y de muerte bacteriana de los aislados de *Staphylococcus aureus* y de Referencia nos permitieron estimar

1. La velocidad de crecimiento bacteriano en función del tiempo en ausencia de antibiótico.
2. La evolución de la población bacteriana en función del tiempo respecto de una concentración fija de antimicrobiano.
3. La relación efecto antibacteriano versus concentración antibiótica
4. Los valores de las constantes de muerte bacteriana.

Posteriormente evaluamos el índice de actividad antibacteriana (E), que se cuantificó como la diferencia entre los valores Log_{10} del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (n_{t-0}) y al final del ensayo (n_{t-24}) según la siguiente ecuación:

$$E = n_{t-24} - n_{t-0} \quad \text{Ec. 10}$$

Para evaluar E , se aplicaron tres puntos de corte teóricos (Sidhu *et al.*, 2011):

- a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en valor de n_{t-0} :
- b) Efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ de n_{t-0} y
- c): Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \text{ Log}_{10}$ (99.99%) respecto del Log de n_{t-0} .

Cada parámetro farmacodinámico obtenido con un antibiótico a pH 7.4 fue comparado con su homólogo obtenido a diferentes valores de pH (6.5, 5.0), como así también con su homólogo en suero y en leche.

4.2.6. Determinación del Efecto Posantibiótico (PAE)

4.2.6.1. Método in vitro

La interacción de los microorganismos y los antimicrobianos es un tema complejo que actualmente está siendo estudiado con detalle. La unión del antimicrobiano a las estructuras bacterianas, desencadena una compleja serie de alteraciones y modificaciones tanto fisiológicas como morfológicas, haciendo que la bacteria sobreviviente no recobre su funcionamiento normal hasta pasado un tiempo más o menos largo, en comparación con aquellas bacterias que no han sido tratadas. Así, las células expuestas a la acción del antimicrobiano pierden su capacidad de multiplicación durante varias horas después que el antimicrobiano haya sido eliminado, a la vez que experimentan una serie de alteraciones ultraestructurales que afectan a su morfología y funcionalidad enzimática normal. La recuperación de estas funciones dependerá de varios factores, siendo los más importantes la concentración de antimicrobiano y el tiempo de exposición (Pastor *et al.*, 1992).

El estudio de las interacciones entre las bacterias y los antimicrobianos no es nuevo; las primeras observaciones de este fenómeno datan de los años 1940. Bigger, en 1944, fue el primero en demostrar que las bacterias Gram-positivas, tras ser expuestas a la acción de la penicilina, no recobraban su crecimiento normal hasta transcurridas algunas horas después de haber sido eliminado el antibiótico. Posteriormente, Bundtzen en 1981, lo denominó

efecto postantibiótico (PAE), definiéndolo como el retraso del crecimiento bacteriano que se manifiesta después de una breve exposición de la bacteria a un antimicrobiano. Durante los años siguientes al descubrimiento del PAE, ésta fue la definición clásica y su determinación se realizaba mediante el recuento de células viables descrito por Bundtzen, utilizándose como método de referencia.

Posteriormente, otros autores desarrollaron distintos métodos para la determinación del PAE (Hanberger *et al.*, 1990; Isaksson *et al.*, 1998). Básicamente todos consisten en medir el recrecimiento bacteriano una vez que se ha eliminado el antimicrobiano, diferenciándose entre ellos en la forma de medir dicho crecimiento. Generalmente estas técnicas se pueden englobar en tres grupos:

1) Las basadas en la medida del crecimiento en sí por distintos procedimientos: recuento de células viables, bioluminiscencia (Isaksson *et al.*, 1998; Mattie, 1981), espectrofotometría (Shahet *et al.*, 1978), conductancia eléctrica (Gouldet *et al.*, 1989), producción de CO₂ en el medio (Gottfredsson *et al.*, 1991) o por incorporación de isótopos radiactivos (Odenholt *et al.*, 1989).

2) Las basadas en la observación de los cambios morfológicos (forma de las bacterias, grosor de la pared celular) (Gottfredsson *et al.*, 1991).

3) Las basadas en cambios fisiológicos de la célula (producción de enzimas, betalactamasas, hemolisina, etc.) (Zhanelet *et al.*, 1991).

Cuando la técnica se basa en los cambios morfológicos, se utiliza el término PAE morfológico, y en este caso el PAE es el tiempo que tarda la bacteria en recuperar su forma habitual una vez se ha eliminado el antimicrobiano (Gottfredsson *et al.*, 1991). Cuando la determinación está basada en los cambios fisiológicos o en la inhibición de la actividad enzimática recibe distintos nombres, dependiendo del parámetro que se éste midiendo: disminución en la producción de betalactamasas (Post-beta-Lactamase Inhibitor Effect, PLIE), aumento de la sensibilidad a la acción de los leucocitos polimorfonucleares humanos (Post-Antibiotic Leucocyte Enhancement, PALE) (Ramadan *et al.*, 1993) o aumento de la sensibilidad bacteriana a la acción de concentraciones subinhibitorias (Post-Antibiotic Sub-MIC Effect, PASME) (Odenholt-Torqvist *et al.*, 1993).

Procedimiento

Tomamos 4 tubos de vidrio borosilicato estériles, en dos de ellos, depositamos 10mL de CMH con una cepa de campo de *S. aureus* en fase logarítmica de crecimiento a una concentración inicial de 1.5×10^7 UFC/mL. En los otros 2 depositamos la cepa de referencia de *S.aureus* ATCC 29213 en las mismas condiciones de medio de cultivo y concentración.

De cada pareja de tubos (cepa problema y cepa de referencia), seleccionamos uno, y lo expusimos a la acción de uno de los diferentes antimicrobianos en ensayo (Azitromicina, Danofloxacina y Penicilina G). Empleamos una concentración terapéutica, teniendo en cuenta los predictores de eficacia definidos por las características farmacocinéticas y farmacodinámicas (PK/PD) de los diferentes antimicrobianos tal como se documentó en el apartado 4.2.2.9. (Selección de los antimicrobianos a evaluar). De manera que las concentraciones utilizadas para la determinación del PAE in vitro para cada antimicrobiano, fueron:

- Danofloxacina: 10 µg/mL que corresponde a 10 veces la CIM a pH 7.4
- Azitromicina: 5 µg/mL que corresponde a 5 veces la CIM a pH 7.4
- Penicilina G: 1 µg/mL que corresponde a 4 veces la CIM a pH 7.4

Control del número de microorganismos al tiempo 0

Los tubos tratados con antimicrobiano y los tubos control, fueron incubados por un periodo de 2 horas a 37°C en baño con agitación constante. Una vez finalizado este periodo de tiempo, se realizó el control del número de microorganismos en los dos cultivos (control y tratado) mediante recuento en placa. Para ello retiramos una alícuota de 100µL de cada tubo y los sembramos con perlas de vidrio en una placa de Petri descartable de 10 cm con 10 mL de AMH. Las placas, fueron incubadas a 37° durante 24 horas, para una vez transcurrido este tiempo, realizar el conteo manual del número de UFC presente en cada uno de los cultivos.

Retirada del Antimicrobiano

Transcurridas las dos primeras horas y realizado el control del número de UFC en cada cultivo, procedimos a retirar el antimicrobiano del cultivo tratado (considerando este momento como tiempo cero del ensayo). El antimicrobiano fue retirado mediante la técnica de dilución del cultivo descrita por Isaksson en 1998, la cual consiste en diluir el cultivo con los microorganismos y el antimicrobiano. La dilución depende de la concentración de antimicrobiano, utilizándose normalmente 10^{-3} . Para ello se tomaron 100µL de cada cultivo (control y tratado) y los diluimos en 9.9 mL de CMH. Posteriormente se extrajeron 2 mL de cada suspensión diluida y los resuspendimos en 18 mL de CMH. Así, finalmente obtuvimos 2 tubos con 20 mL de CMH (Control y tratado) tanto para la cepa de referencia como para la cepa problema. El procedimiento completo, lo realizamos por triplicado.

Los 4 tubos, fueron llevados nuevamente a incubación durante 6 horas a 37°C en baño con agitación constante. A cada hora hasta las 6 horas retiramos de cada uno de los tubos, una alícuota de 100µL para realizar el conteo de UFC, sembrando en placas de Petri con 10mL de AMH. Incubamos a 37°C durante 24 horas, para posteriormente efectuar la lectura manual de las UFC en cada una de las placas. El procedimiento se realizó por duplicado.

Interpretación

Todas las curvas de crecimiento y de PAE se elaboraron a partir de recuentos bacterianos que se hicieron cada hora desde el tiempo t^{-2} (adición del antimicrobiano) hasta la hora 6.

El cálculo de la duración del PAE se efectuó utilizando la fórmula descrita por Mc. Donald (1977).

$$PAE = T - C$$

Ec. 12

Donde T es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar 1 logaritmo su concentración a partir del tiempo 0 (dilución del

antimicrobiano); **C** es tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 logaritmo su concentración a partir del tiempo 0.

Este procedimiento se realizó en CMH y en leche, teniendo en cuenta las variaciones en la CIM al pH de la leche, que fue tomado como 6.5.

4.2.6.2. Método in vivo

4.2.6.2.1. Modelo de infección en muslo de ratón neutropénico

Aunque el modelo de infección en muslo de ratón neutropénico ha adquirido importancia en las últimas décadas, este había sido empleado previamente, en la década del 50, con ratones sin inmunodeprimir (Eagle *et al.*, 1950).

El modelo actual de esta técnica conserva la mayoría de las características originales, más algunas variaciones importantes efectuadas especialmente por Craig *et al.*, 1993.

La modificación metodológica más importante del modelo de infección en muslo de ratón fue implementada por Craig *et al.*, en 1993. Inquietos por las fallas terapéuticas observadas en los pacientes leucopénicos infectados por *P. aeruginosa* y tratados con aminoglucósidos, postularon que dicho fenómeno obedecía a la selección, durante el tratamiento, de subpoblaciones bacterianas resistentes no detectadas por las pruebas de susceptibilidad in vitro. Normalmente, dichas subpoblaciones son erradicadas por la respuesta bactericida del sistema inmune, pero ese no es el caso en pacientes inmunocomprometidos; sólo un modelo neutropénico permitiría acercarse al comportamiento microbiológico de este último grupo de pacientes.

En nuestro caso, decidimos comprobar la existencia del PAE in vivo de danofloxacina, puesto que se trata de un antimicrobiano acción bactericida dependiente de la concentración. Para lo cual, determinamos las concentraciones de danofloxacina en suero y muslo de ratones (cepa C57/h3) inmunodeprimidos expuestos a concentraciones terapéuticas del antimicrobiano e infectados experimentalmente con *S. aureus* ATCC 29213. Se relacionaron las concentraciones de danofloxacina en los tejidos con las UFC presentes en el muslo a diferentes horas de exposición.

Entre las ventajas de este modelo podemos mencionar que el efecto del sistema inmune queda anulado, el muslo del ratón puede extraerse fácilmente, cuantificar el número de UFC en el homogenizado de muslo no presenta grandes dificultades y nos permite comprobar la posible actividad subinhibitoria del antimicrobiano.

Procedimiento.

Selección del antimicrobiano

Para la determinación del PAE in vivo, frente a *S. aureus* seleccionamos Danofloxacina, teniendo en cuenta que presentó un PAE in vitro más prolongado que los otros dos antimicrobianos, no mostró variaciones significativas en las pruebas de susceptibilidad a los diferentes pH y fue el antimicrobiano que arrojó los mejores resultados a nivel de eficacia farmacológica en las curvas de muerte bacteriana.

Animales experimentales

Utilizamos 100 ratones (cepa C57/h3) de seis semanas de edad, sanos, de ambos sexos, con un peso promedio de 23 a 27 g. Los animales (libres de patógenos específicos (SPF)) fueron comprados al Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata. El manejo de los mismos se realizó según las normas internacionales estipuladas por los comités de ética profesional para el manejo y uso de animales de experimentación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition, 2010).

Mantenimiento de los animales

Los animales experimentales fueron alojados en grupos de 6 individuos en jaulas metálicas estériles de 25cm de alto, 30cm de ancho y 30 cm de frente, con cama de aserrín estéril. Durante el tiempo del experimento, se mantuvieron a temperatura ambiente, con aporte de comida, mediante comederos metálicos tipo canasto y agua, mediante chupete, estériles y “ad libitum”. Como alimento se utilizó balanceado seco sin coccidiostático, para

que no interfiriera con el tratamiento antibiótico. Diariamente se recambió el aserrín a todas las jaulas y se chequeó el correcto estado sanitario de los animales.

Neutropenia

Los 100 ratones recibieron una terapia inmunosupresora, siguiendo la técnica descrita por Craig en 1993. Para lo cual se aplicó a cada ratón, ciclofosfamida por la vía intraperitoneal, a razón de dos dosis de 150 y 100 mg/kg, los días 0 y 3 respectivamente. Este esquema de dosificación logra un porcentaje de reducción de leucocitos del 70-84% (<100 neutrófilos/mm³) en el día del inicio del ensayo del PAE (día 4). De manera que, prácticamente se anula el sistema inmunológico, evitando una posible interferencia en la infección bacteriana.

Infección

El día 4 del experimento, se inyectó intramuscularmente en el muslo 0.1 mL de CMH enriquecido con *S. aureus* ATCC 25923 en fase de crecimiento exponencial a una concentración de 1×10^7 UFC/mL. Este tiempo fue considerado como T^2 . Paralelamente, se realizó el control del número de microorganismos en el CMH, mediante recuento en placa. Para ello retiramos una alícuota de 100 μ L y la sembramos con perlas de vidrio en una placa de Petri descartable de 10 cm con 10 mL de AMH. Las placas, fueron incubadas a 37° durante 24 horas, para una vez transcurrido este tiempo, realizar el conteo manual del número de UFC presente en cada uno de los cultivos.

Tratamiento antimicrobiano

Al cabo de 2 horas de realizada la infección, momento considerado tiempo 0 del ensayo (T^0), los ratones fueron separados en 2 grupos:

Grupo 1: Integrado por 44 ratones, que recibieron 0.2 mL de solución salina conteniendo 0.3 mg de danofloxacina (10 mg/kg) por la vía intramuscular (IM), a nivel del muslo.

Para preparar la solución de danofloxacin, partimos de una solución conteniendo 6 mg/mL del antimicrobiano disuelto en agua tridestilada estéril. A partir de esta solución realizamos diluciones en solución salina fisiológica estéril hasta obtener una solución final de 1.5 mg/mL (lo que equivale a 0.3 mg en 0.2 mL de solución).

Grupo 2: Fue el grupo control o testigo, 22 ratones fueron inoculados por la vía IM a nivel del muslo con 0.2 mL de solución salina sin antimicrobiano. A estos individuos, se les realizó una marca en el extremo caudal de la cola con azul de metileno con la finalidad de diferenciarlos del grupo tratado.

Sacrificio de los animales y extracción de los muslos.

Los animales del Grupo 1 (Tratados) fueron sacrificados en lotes de 4 individuos a los siguientes tiempos: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 horas. Y los animales del Grupo 2 (Control) fueron sacrificados de a pares a los mismos tiempos que el Grupo 1.

Todos los animales fueron alocaos y sacrificados, siguiendo la normativa dispuesta por el AVMA en su guía para la eutanasia de animales 2013. Se eligió la técnica de dislocación cervical, ya que ésta es apropiada para aves, ratones, conejos o ratas inmaduras, o especies pequeñas similares. Consiste en separar el cráneo y el cerebro de la médula espinal aplicando presión a la base posterior del cráneo (Clifford, 1984). Cuando la separación de la médula ocurre, el SNC deja de estimular la respiración y el corazón, conduciendo a la muerte.

Inmediatamente después del sacrificio de cada animal experimental y con ayuda de material quirúrgico (pinzas, bisturí y tijeras estériles) se extrajo el muslo infectado, separándolo de la piel.

Cada uno de los muslos fue pesado y homogeneizado correctamente con la ayuda de un homogeneizador T25 (Ultra Turrax) en solución salina estéril en relación 1:10 p/v. El homogenato obtenido fue envasado en tubos estériles y perfectamente identificados. Una alícuota del homogenato fue utilizada como se describe a continuación y el resto fue almacenado a -20°C hasta su ensayo cromatográfico.

A partir de los homogenatos obtenidos para cada tiempo de sacrificio, se sembraron 100 μ L en placas de Petri conteniendo 10mL de AMH y tras 24 horas de incubación a 37°C, se procedió al recuento de las UFC. Se obtuvieron así, las concentraciones de microorganismos por cada gramo de muslo en los distintos tiempos.

Niveles séricos y tisulares de danofloxacin en ratones inmunosuprimidos

Al momento del sacrificio de cada ratón, además de extraer el muslo infectado, se extrajo sangre con el fin de determinar las concentraciones séricas de danofloxacin (DAN) en ratones que recibieron una dosis de 10 mg/kg.

La cuantificación de danofloxacin en suero y en el homogenato de músculo de ratón, tras su extracción en fase líquida, fue realizada por cromatografía líquida de alta presión con detección por fluorescencia; siguiendo una metodología analítica validada en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) (Mestorino et al., 2009).

Extracción del analito

En un tubo cónico borosiliconado, se diluyeron 0.2 mL de la muestra con 0.3 mL de acetonitrilo, esta solución se mezcló en vortex durante 1 minuto y luego se centrifugó durante 15 minutos a 2.195 g. Retiramos suavemente el sobrenadante obtenido y lo trasvasamos a otro tubo cónico de vidrio para diluirlo con 0.3 mL de agua deionizada. La dilución se mezcló con vortex durante 1 minuto y 200 μ L del sobrenadante fueron inyectados directamente en el cromatógrafo.

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones: Columna Phenomenex Luna C18 5 μ m (150 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA); Guarda columna: C18 Phenomenex. Se empleó una fase móvil compuesta por 950 mL de fosfato de sodio 0.05 M ajustado a pH 3.5 (con ácido fosfórico 85%), 50 mL de acetonitrilo y 30 mL de tetrahidrofurano, bombeada a un flujo de 1.5 mL/min. Se trabajó a temperatura ambiente con detección por fluorescencia (280 nm de excitación y 440 nm de emisión). El tiempo de corrida para cada muestra fue de 10 min.

Las concentraciones de danofloxacin fueron determinadas por interpolaci3n de 3reas en la curva de calibraci3n est3andar obtenida de fortificar suero blanco con concentraciones conocidas de analito.

El m3todo anal3tico fue validado evaluando los siguientes par3metros: linealidad, precisi3n, exactitud y especificidad.

Adecuabilidad del sistema

Se prepar3 una soluci3n est3andar de danofloxacin y se determin3 la precisi3n del sistema cromatogr3fico mediante la colocaci3n de veinte (20) inyecciones. De esta manera se evalu3 la eficiencia de la columna y del sistema, a trav3s del conocimiento del coeficiente de variaci3n existente.

Linealidad

Se prepar3 por duplicado una bater3a de 6 diluciones stock del analito en un rango de concentraciones preestablecidas. Las cuales fueron inyectadas en el HPLC a los efectos de obtener curvas de calibraci3n en las que se pudo evaluar: coeficiente de variaci3n, coeficiente de correlaci3n, medias y desviaci3n est3andar de cada concentraci3n.

L3mite de detecci3n (LOD)

Se denomina LOD a la menor cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Este fue estimado a trav3s del an3lisis de 20 al3cuotas de suero control, libre de antimicrobiano. Fue medido el ruido de la l3nea de base; y fueron calculados los promedios y desv3os est3andares (DS), correspondi3ndose el LOD con 3 DS (signo/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 sueros 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 % (Mestorino *et al.*, 2009).

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.

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 suero blanco y 6 muestras de suero cargado con el estándar de danofloxacina, 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.

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

4.2.6.2.2. Estimación del PAE *In Vivo*

A partir de la determinación de los niveles de danofloxacina en suero, se registró el tiempo en que los niveles de antimicrobiano en sangre cayeron por debajo de la CIM₉₀ de danofloxacina para *S. aureus*. Las constantes PK para danofloxacina (semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$), área bajo la curva de concentración en función del tiempo –ABC- y concentración máxima –C_{max}-), se calcularon utilizando un modelo no compartimental.

A partir de las curvas de crecimiento bacteriano (homogenatos de los muslos control) y de las curvas de muerte bacteriana (homogenatos de los muslos tratados); aplicando la *EC.12* ($PAE = T - C$) se determinó el PAE in vivo. Donde en este caso, **T** es el tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones tratados aumente 1 log₁₀ a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en sangre descendieron por debajo de la CIM y **C** es el tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones controles aumenten 1 log₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

4.2.7. Captación y actividad intracelular de los antimicrobianos seleccionados.

4.2.7.1. Preparación del inóculo bacteriano

Se procedió según se explicó en el apartado 4.2.2.2., es decir, preparación del inóculo por suspensión directa de colonias (CLSI 2008). Para lo cual, se repicó el *S. aureus* ATCC 29213 en placas de Petri con AMH. Al día siguiente, se tomaron 2-3 colonias con un anza estéril y se resuspendieron, pero en este caso, en medio RPMI 1640, hasta ajustarlo a una concentración de 0.5 de la escala de Mac Farland ($0.5-1 \times 10^{7-8}$ UFC/mL).

4.2.7.2. Preparación de las células

Se aislaron polimorfonucleares (PMNs) a partir de sangre y de leche bovina, los cuales fueron resuspendidos en medio RPMI 1640, hasta alcanzar una concentración de 5×10^6 /mL.

4.2.7.2.1. Separación de PMNs de sangre bovina

En un tubo cónico de polipropileno estéril, se colocaron 3 mL de histopaque 1119 y 3 mL de histopaque 1077, teniendo cuidado de no mezclar los reactivos. Luego sobre este último, se agregaron 6 mL de sangre bovina completa, heparinizada, teniendo cuidado de no mezclar la sangre con los reactivos. La sangre se obtuvo de bovinos sanos que no hubiesen recibido tratamiento antimicrobiano alguno durante los últimos 3 meses antes del inicio del ensayo.

Centrifugamos durante 40 min a 600 g, así las células de la serie granulocítica se ubican entre el histopaque 1077 y el histopaque 1119, mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se ubican en la zona entre el plasma y el 1077.

Retiramos suavemente con una pipeta Pasteur estéril la zona correspondiente a los PMNs y los trasvasamos a otro tubo cónico de polipropileno. Agregamos 10 mL de PBS pH

7.4 estéril, centrifugamos durante 15 min a 1600 rpm, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet celular en 5 mL de medio RPMI 1640.

Luego de tener las células aisladas en el medio, efectuamos el conteo celular para observar cantidad y evaluar la viabilidad de los PMNs utilizando una cámara de Neubauer.

Conteo y evaluación de la viabilidad celular

Tomamos una alícuota de 10 μ L de la suspensión celular y le adicionamos 10 μ L de colorante azul de tripán para realizar el recuento de las células en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

El azul tripán, es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas, para ensayos de viabilidad, permitiendo diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con membrana celular intacta no se colorean, debido a que dicha membrana es selectivamente permeable respecto a los compuestos que pueden atravesarla, de ahí que las células viables, es decir, con membrana intacta, no permiten la incorporación del colorante azul de tripán. Por el contrario, sí este colorante atraviesa la membrana de las células, indica que la misma no está intacta y por tanto las células no son viables, apareciendo de un distintivo color azul bajo el microscopio.

Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama **método de tinción por exclusión**.

La lectura de las células viables y no viables fue realizada en microscopio óptico y el cálculo del número de células/mL fue determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$V \times FN \times FT / \#Q. \qquad \qquad \qquad EC.13$$

Donde: **V** corresponde al número de células viables contadas; **FN** es el factor de la cámara de Neubauer (10^4); **FT** es el factor de dilución del azul de tripán y **#Q**, el número de cuadrantes de la cámara utilizados para el recuento.

La viabilidad se determinó por la técnica de exclusión vital, o sea, exclusión de las células no teñidas por el azul de tripán, como anteriormente se describió.

La viabilidad celular se expresó como porcentaje aplicando la ecuación:

$$V \times 100/NT$$

EC.14

En la que, **NT** es el número total de células (viables y no viables) contadas en la cámara. Con este método obtuvimos un 90% de células vivas en todos los casos.

4.2.7.2.2. Separación de PMNs de leche bovina

Se obtuvieron 150 mL de leche bovina, extraída de forma estéril, y se separaron en alícuotas en tubos Falcon estériles de 50 mL. Se mantuvieron a 4°C hasta el momento de realizar el procedimiento.

La leche fue filtrada a través de un filtro de nylon de 50 μ m de porosidad. El filtrado fue diluido al 50% v/v con una solución amortiguadora 0.01 M de fosfato (PBS).

La solución de leche diluida en buffer fue centrifugada durante 15 minutos a 2500 rpm, removimos la capa de crema superficial y descartamos la leche descremada, quedándonos solo con el pellet celular, que fue suspendido en 80 mL de PBS.

Esta suspensión se llevó a una segunda centrifugación durante 15 min a 1600 rpm, descartamos de nuevo el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 80 mL de PBS. Este procedimiento lo repetimos 2 veces más para realizar el lavado de las células, tras el último lavado, el pellet celular fue resuspendido en 20mL de medio RPMI 1640.

Posteriormente, procedimos a determinar la cantidad y viabilidad celular por observación al microscopio óptico con azul tripán. En promedio, un 60% de las células aisladas corresponde a PMNs, y de estos aproximadamente el 60% son células viables.

Por último, realizamos la dilución requerida, para ajustar la concentración a 5×10^6 células por mL de medio RPMI 1640.

4.2.7.3. Fagocitosis

Una Alícuota de 1.9 mL del cultivo de PMNs fue vertida en cada uno de los pocillos de la placa para cultivo celular (cada placa contiene 6 pocillos), posteriormente en cada uno de

los pocillos, se adicionó 0.1 mL de la suspensión bacteriana a la concentración previamente establecida, con lo cual, en cada pocillo obtenemos un volumen final de 2 mL, con una relación aproximada de 10 bacterias por cada leucocito PMN.

Esta suspensión fue llevada a incubación durante 90 minutos a 37°C con 5% CO₂ y agitación constante con la finalidad de permitir el proceso de fagocitosis.

4.2.7.3.1. Eliminación de las bacterias no fagocitadas

El contenido de cada uno de los pocillos fue colocado en tubos Falcon estériles de 15 mL, se centrifugó a 327g durante 10 minutos a 20 °C. Se eliminó el sobrenadante suavemente y se resuspendió el pellet celular en 5 mL de PBS suplementado con 50 µg/mL de gentamicina, para eliminar las bacterias que pudiesen haber quedado en el fluido extracelular.

Llevamos los tubos a incubación por 45 minutos a 37°C con 5% CO₂ y agitación constante, luego fueron centrifugados a 327g durante 10 minutos a 20°C. Retiramos suavemente el sobrenadante, y resuspendimos las células en 5 mL de PBS estéril sin gentamicina. Se centrifugó nuevamente a 327g y a 20 °C por 10 minutos.

Finalmente, las células fueron resuspendidas en 2mL de medio RPMI 1640.

4.2.7.3.2. conteo del número de UFC fagocitadas.

Una alícuota de 100 µL del pellet celular resuspendido en medio RPMI 1640, se diluyó en 100 µL de agua destilada estéril, para ocasionar la lisis celular y así permitir la liberación de las bacterias fagocitadas. Posteriormente esta solución se agitó en vortex y 100 µL se sembraron en placas de Petri de 10 cm con 10 mL de AMH. La evaluación del número de UFC se realizó por conteo manual tras 24 horas de incubación a 37°C, siendo el límite de detección 10 UFC.

4.2.7.4. Exposición al Antimicrobiano

La penetración intracelular de cada uno de los diferentes antibacterianos ensayados en este estudio (Azitromicina, Danofloxacin y Penicilina G) fue evaluada por separado. Para ello, adicionamos, al cultivo celular en un volumen no superior a los 100 μ L, el antibacteriano a la concentración terapéutica definida para cada uno de ellos, teniendo en cuenta sus características PK/PD:

- Danofloxacin 10 μ g/mL, que corresponde 10 veces la CIM a pH 7.4.
- Azitromicina 2.5 μ g/mL, que corresponde a 5 veces la CIM a pH 7.4.
- Penicilina G 1 μ g/mL, que corresponde a 4 veces la CIM a pH 7.4.

Siempre mantuvimos uno de los pocillos sin agregar antimicrobiano, solo contuvo la mezcla cultivo celular: *S aureus*, es decir fue el control negativo.

La placa se incubó durante 5 horas a 37°C con 5% CO₂ en agitación constante. Inmediatamente después de cumplido el tiempo de incubación, el contenido de cada pocillo se pasó a un tubo cónico de polipropileno, para centrifugar la suspensión a 1600 RPM durante 15 minutos. Se retiró suavemente el sobrenadante, el que fue analizado posteriormente por HPLC para el caso de danofloxacin y por método microbiológico para azitromicina y penicilina G; con el fin de cuantificar la cantidad de antimicrobiano que no penetró al interior celular (concentración de antimicrobiano a nivel extracelular –EC-).

El pellet celular, fue resuspendido en 10 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugó a 1600 RPM durante 15 minutos. Descartamos suavemente el sobrenadante y resuspendimos el pellet celular en 1mL de solución salina fisiológica estéril, posteriormente todos los tubos fueron llevados al sonicador durante 15 minutos para ocasionar la lisis de las membranas celulares y permitir la liberación del antibacteriano intracelular. Este procedimiento nos permitió cuantificar la concentración de antimicrobiano a nivel intracelular –IC-.

4.2.7.5. Evaluación de la actividad antibacteriana a nivel intracelular

Una vez puesta a punto la metodología para evaluar la fagocitosis bacteriana y la captación celular de cada antimicrobiano por separado, procedimos a analizar la actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus* a nivel intracelular.

Para lo cual repetimos los protocolos detallados en los puntos 4.2.7.3, 4.2.7.3.1 y 4.2.7.4.

Así, las células en suspensión fueron llevadas a agitación en vortex durante 5 minutos. Posteriormente procedimos a sembrar, por medio de sembradores estériles de vidrio, 100µL en placas de Petri de 10 cm con 10 mL de AMH. La evaluación del número de UFC, se realizó por conteo manual tras 24 horas de incubación a 37°C.

De esta forma determinamos la eficacia del antimicrobiano a nivel intracelular frente a la cepa de *S. aureus* que había sido anteriormente fagocitada.

4.2.7.8. Cuantificación intra y extracelular de las concentraciones de antimicrobianos

Tanto el sobrenadante de la primera centrifugación, como la suspensión celular, fueron analizados para determinar las concentraciones de antimicrobiano presentes.

4.2.7.8.1. Cuantificación de Danofloxacina a nivel intracelular por HPLC

La cuantificación de Danofloxacina se realizó por HPLC con detección fluorométrica, según se describió en el apartado 4.2.6.2.2.

El procedimiento utilizado para la extracción de las muestras fue el mismo para las células como para el sobrenadante.

Preparación de soluciones estándares

Se preparó una solución madre de danofloxacina conteniendo 1mg/mL utilizando como solvente ácido fosfórico 0.05M. Esta solución se mantiene estable a -20°C durante 6 meses. A partir de la solución madre se prepararon diluciones seriadas de trabajo, utilizando

el mismo solvente (ácido fosfórico 0.05M), en las siguientes concentraciones: 500ng/ml, 300ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 20ng/ml, 10ng/ml.

Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las aplicadas en el apartado 4.2.6.2.2.

Nuevamente en este ensayo realizamos una revalidación de la metodología analítica. A tal fin se determinaron especificidad, linealidad, exactitud y repetibilidad (precisión) del método y se calculó el límite de cuantificación (LOQ) correspondiente.

4.2.7.8.2. Cuantificación de Azitromicina y Penicilina G por método microbiológico

La cuantificación intra y extracelular de Azitromicina y Penicilina G fue realizada por método microbiológico empleando *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*Sarcina lútea*) como microorganismo testigo, técnica cilindro placa validada en nuestro laboratorio.

El método microbiológico consiste en la determinación de concentraciones desconocidas de un antibacteriano en muestras biológicas por comparación con patrones de concentración conocida de dicho antibacteriano. Para ello se utiliza un medio de cultivo estándar (agar para antibióticos) en el que se inocula una cantidad fija y determinada del microorganismo sensible al antibacteriano. Una vez homogeneizado, el medio de cultivo se vuelca dentro de placas de vidrio de 25 x 25 cm de lado y 2.5 cm de altura. Posteriormente, sobre la superficie del agar gelificado, se colocan cilindros dentro de los cuales se siembran las muestras problema y los patrones. La placa es incubada durante 18 h, periodo luego del cual se miden los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. A partir de los halos producidos por las concentraciones patrones se traza una línea de regresión lineal. De esta manera, por interpolación de los diámetros de los halos producidos por las muestras problema, se extrapolan las concentraciones correspondientes.

Las muestras problema fueron sembradas por duplicado. Se utilizó una placa de cultivo por antimicrobiano, cada una con sus correspondientes estándares. Este procedimiento se realizó en el mismo día, disminuyendo así la variabilidad inter-placa e inter-día.

Previamente al análisis de las muestras se validó el método analítico utilizado. A tal fin se determinaron especificidad, linealidad, exactitud y repetibilidad (precisión) del método y se calculó el límite de cuantificación (LOQ) correspondiente.

4.2.7.8.2.1. Cuantificación de Azitromicina

Se preparó una solución stock madre de azitromicina de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 10 mL de metanol calidad cromatográfica. Dicha solución, almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantiene su potencia durante 6 meses.

A partir de la solución madre se prepararon diluciones seriadas estándares utilizando como diluyentes además del buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 8 estéril, solución fisiológica y RPMI para contar con estándares preparados en las soluciones empleadas para emular el fluido extracelular e intracelular.

Para preparar el buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 8 se mezclaron 5.3 mL de solución estéril de fosfato monobásico de sodio 0.2 M (solución A) con 94.7 mL de solución estéril de fosfato dibásico de sodio 0.2 M (solución B) y se llevó la mezcla a 200 mL con de agua destilada estéril. Para preparar la solución A se diluyeron 27.8 g de fosfato monobásico de sodio en 1000 mL de agua destilada estéril y para la solución B se diluyeron 53.65 g de fosfato dibásico de sodio en 1000 mL de agua destilada estéril (Lucas, 2009). Después de esterilizar el buffer en autoclave, se realizó el control del pH. El buffer se mantuvo refrigerado y el pH fue periódicamente controlado para asegurar la estabilidad del mismo.

El rango de concentraciones incluido en la recta de calibración fue 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2.7.8.2.2. Cuantificación de Penicilina G

Se preparó una solución madre conteniendo 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Penicilina G en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 6 estéril. A una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ la solución mantuvo su potencia durante 6 meses. A partir de la solución madre se prepararon las diluciones seriadas estándares utilizando como diluyente buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 6 estéril,

solución fisiológica y RPMI para contar con estándares preparados en las soluciones empleadas para emular el fluido extracelular e intracelular.

El buffer fosfato 0.1 M pH 6 se preparó mezclando 87.7 mL de solución de fosfato monobásico de sodio 0.2 M (solución A) con 12.3 mL de solución de fosfato dibásico de sodio 0.2 M (solución B) y llevando a 200 mL con de agua destilada estéril. El buffer fue esterilizado en autoclave, se controló su pH final y se mantuvo refrigerado a 4 °C realizando controles periódicos de pH para determinar su estabilidad (Lucas, 2009).

El rango de concentraciones incluido en la recta de calibración de Penicilina G fue de 0.0156, 0.033, 0.066, 0.125, 0.25 y 0.5 µg/mL.

Inóculo bacteriano

El microorganismo test utilizado fue *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*Sarcina lútea*), el que se mantuvo en picos de flauta de AMH e incubación a 35 °C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, a partir de los picos de flauta se realizaron repiques (con el mismo medio y también en picos de flauta) de 24 h de incubación para la preparación del inóculo del día de la siembra. Estos cultivos se lavaron con 1.5 mL de solución fisiológica estéril cada uno.

La solución obtenida fue diluida nuevamente con solución fisiológica estéril hasta alcanzar un 75% de transmisión, medida por espectrofotometría a 670 nm de longitud de onda que corresponde a una concentración de $2 - 2.6 \times 10^7$ UFC/mL, para el caso de Azitromicina. Mientras que la suspensión bacteriana utilizada para cuantificar Penicilina G, tuvo un 50% de transmisión a 670 nm de longitud de onda, que corresponde a una concentración de $3 - 7 \times 10^8$ UFC/mL (Lucas, 2009).

A partir de estas suspensiones, según se ensayara Azitromicina o Penicilina G, se tomó 1 mL para inocular el medio de cultivo para antibióticos N° 1, cuyo volumen fue de 120 mL por placa.

Preparación de las placas

Para la preparación de las placas se utilizaron 120 mL de medio de cultivo para antibióticos N° 1 a una temperatura de 45-50 °C. El mismo fue preparado el día de la

siembra siguiendo las instrucciones del fabricante y fue esterilizado en autoclave a 120 °C y a 1 atmósfera de presión durante 20 min. Una vez retirado de la autoclave fue colocado en baño de María a 50 °C, temperatura a la cual se le adicionó 1 mL del inóculo bacteriano. Se mezcló bien para tener una correcta distribución del inóculo en la totalidad del medio de cultivo, con la precaución de evitar la formación de burbujas.

La placa de vidrio (previamente numerada en la cara externa de la base para poder saber la ubicación de los cilindros) y atemperada a 35°C, se ubicó sobre una superficie correctamente nivelada.

El medio de cultivo inoculado fue vertido dentro de la placa de vidrio. Una vez solidificado el agar se colocaron los 49 cilindros de acero inoxidable de acuerdo al mapa guía, y se ejerció sobre los mismos una ligera presión para lograr una correcta coaptación entre éstos y la superficie del medio.

Siembra de las placas

Se sembraron por cuadruplicado 200 μ L de cada solución estándar (preparada con buffer, solución fisiológica o RPMI) en cada cilindro colocando su ubicación en la planilla (Nº de cilindro que recibió determinada muestra).

Las placas fueron incubadas en estufa a 35 °C durante 18 h. Transcurrido el periodo de incubación y utilizando un calibre Vernier se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

A partir de los diámetros de los halos de inhibición se trazaron las líneas de regresión lineal entre estos y las concentraciones antimicrobianas presentes en los estándares. A partir de estas líneas de regresión se determinaron los correspondientes valores de intersección, pendiente y los coeficientes de correlación (r).

Linealidad de la respuesta

La linealidad fue determinada a través de curvas de calibración de las concentraciones calculadas del antimicrobiano (μ g/mL) y las concentraciones teóricas, a

diferentes concentraciones de cada antimicrobiano ensayado. A partir de estas curvas fueron calculados coeficiente de correlación lineal (r), pendiente e intercepción (Gil-Alegre, 1995).

Las rectas de calibración fueron realizadas en 3 ocasiones distintas y cada una contenía 5 concentraciones y 4 repeticiones por cada concentración.

Especificidad de la técnica

La especificidad se evaluó sembrando en cada placa y por cuadruplicado buffer, solución fisiológica o RPMI y cultivos celulares libres de antimicrobianos (diluyentes y muestras control). El objetivo fue corroborar la ausencia de sustancias con actividad inhibitoria intrínseca que pudieran interferir con la actividad inhibitoria del antimicrobiano a ensayar (Gil-Alegre, 1995).

Exactitud de la técnica

La exactitud en la determinación de las concentraciones fue expresada como porcentaje de recuperación y se obtuvo a partir de comparar la concentración calculada en base a la recta de calibración (cultivo celular), con la concentración real y conocida del estándar.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_c \cdot 100}{C_r} \quad \text{Ec. 15}$$

Donde C_c es la concentración calculada y C_r es la concentración real. Se consideró adecuado un valor de recuperación comprendido entre 60% y 110%.

Precisión de la técnica

Para evaluar la precisión de la técnica se determinó el grado de repetibilidad, el cual está relacionado con la dispersión de una serie de mediciones de una misma muestra sobre un valor promedio, el cual corresponde a la varianza de la población y es estimada por el

desvío estándar (DE). Para comparar la dispersión de 2 series de mediciones se utiliza el desvío estándar relativo o coeficiente de variación (CV) que es expresado como porcentaje.

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \quad \text{Ec. 16}$$

Donde \bar{X} es el valor promedio de una serie de mediciones y el estimador de la media poblacional (μ).

La evaluación de la precisión se realizó mediante la estimación de los CV de los halos de inhibición obtenidos a partir de los estándares en buffer, en solución fisiológica y en RPMI. Cada concentración fue sembrada por cuadruplicado en una misma placa y durante 3 ocasiones, a partir de lo cual se pudieron calcular los CV intra-día e inter-día. Los valores de los CV aceptables debieron ser inferiores al 20%.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor concentración para la cual la reproducibilidad de los análisis no excede un CV del 20%.

Análisis de las muestras problema

Para evitar la variabilidad inter-placa, se incluyó en cada placa sembrada con muestras problema tres baterías de diluciones patrones, del antimicrobiano en estudio, preparadas en buffer, solución fisiológica y RPMI.

A través de la medición de la actividad inhibitoria en los patrones, se construyeron las rectas de regresión lineal:

$$y = b + a x \quad \text{Ec. 17}$$

Donde y es la concentración del antimicrobiano, b es el punto de intersección con el eje de la abscisa, a es la pendiente de la recta y x es el halo de inhibición.

Los estimadores de a y b fueron calculados de la siguiente manera:

$$a = \frac{\sum X_i - b \sum Y_i}{n} \quad \text{Ec. 18}$$

$$b = \frac{\sum Y_i X_i - (\sum Y_i \sum X_i) / n}{\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2 / n} \quad \text{Ec. 19}$$

Donde Y_i es la concentración del antimicrobiano, X_i es el diámetro del halo de inhibición y n es el número de mediciones.

El estimador del ajuste fue el coeficiente de correlación (r) que se calculó como:

$$r = \frac{n \sum (Y_i X_i) - \sum Y_i \sum X_i}{\sqrt{[n \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2][n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2]}} \quad \text{Ec. 20}$$

Los r considerados aceptables debieron ser superiores a 0.9 en todas las placas.

La concentración del antimicrobiano en las muestras problema se expresó en $\mu\text{g/mL}$ y se calculó en función del diámetro del halo de inhibición medido utilizando la ecuación de la recta de regresión, es decir:

$$\text{"Concentración"} = b + a \text{"diámetro del halo"} \quad \text{Ec.21}$$

4.2.8. Cinética intracelular

En este experimento, evaluamos nuevamente la acción intracelular de cada antimicrobiano pero en función del tiempo. Para ello, utilizamos 2 placas para cultivo celular de 6 pocillos por cada antimicrobiano. De la misma manera que explicamos anteriormente, sembramos 1.9 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 5×10^6 PMNs/mL en cada pocillo, agregamos 0.1 mL de inóculo bacteriano ($5 \times 10^{7-8}$ ufc/mL) y lo expusimos a la concentración terapéutica de cada antibacteriano (Danofloxacina, 10 xCIM; Azitromicina, 5xCIM y Penicilina G, 4xCIM). Siempre se dejó uno de los pocillos de cada placa, con 1.9 mL de medio RPMI 1640 con PMNs y 0.1 mL de inóculo (control negativo).

Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% CO2 en agitación constante y a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas de incubación, el contenido de 2 pocillos (uno de cada placa) fue transferido

cada uno a tubos cónicos de polipropileno. Se centrifugaron a 1600 RPM durante 15 minutos, luego retiramos suavemente el sobrenadante. A partir del sobrenadante realizamos la cuantificación de antibacteriano que no penetró al interior celular mediante las técnicas explicadas previamente.

El pellet celular fue resuspendido en 10 mL de PBS pH 7.4 y centrifugado nuevamente a 1600 RPM durante 15 minutos, posteriormente descartamos suavemente el sobrenadante y resuspendimos las células en 1 mL de solución salina fisiológica y lo llevamos al aquasonic por 15 minutos para ocasionar la lisis de las membranas celulares para permitir la salida del antibacteriano intracelular. Simultáneamente, 100 μ L se sembraron en placas de Petri de 10 cm con 10 mL de AMH para proceder a la evaluación del número de UFC por conteo manual tras 24 horas de incubación a 37°C, siendo el límite de detección 10 UFC.

La cuantificación de cada antimicrobiano, tanto a nivel intra como extracelular se realizó según lo detallado en el apartado 4.2.7.8.

4.2.9. Diseño y corroboración a campo de un régimen de dosificación racional

Con los resultados obtenidos se seleccionará el antimicrobiano que presente mejor actividad bactericida a nivel intracelular. Esto significa que logre a nivel celular la concentración y/o el tiempo de contacto adecuado para atacar al *Staphylococcus aureus* según pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas.

Se integrará toda la información obtenida con los datos farmacocinéticos disponibles en la cátedra de farmacología. Con esta integración se podrá diseñar el régimen posológico más adecuado.

5. RESULTADOS

5.1. SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*

El total de las 220 cepas de *S. aureus* existentes en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) fueron nuevamente incubadas a 37°C en AMH con 5% de sangre bovina por un periodo de 24 horas. Todas dieron lugar a la formación de colonias circulares de entre 1 y 3 mm de diámetro, de apariencia lisa, cremosa con un perfil convexo, bordes netos y coloración blanco amarillenta. Solamente 102 cepas presentaron hemólisis, de las cuales 32 presentaron α y β hemólisis, 51 solamente α hemólisis y 19 cepas presentaron β hemólisis. La diferenciación del tipo de hemólisis, se hizo por observación directa, tomando en cuenta que la α hemólisis corresponde a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina); y la β hemólisis se expresa como un halo de hemólisis completamente claro. En la Figura 14 se muestra la apariencia característica de las colonias de *Staphylococcus aureus* crecidas en AMH con 5% de sangre bovina y en la Figura 15 se observa la presencia de hemólisis.



Figura 14. *Staphylococcus aureus* cultivado en agar sangre.



Figura 15. Presencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias de *S. aureus* en agar sangre

Mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas se realizó la tipificación bioquímica de los 220 aislamientos, de los cuales 218 resultaron ser Gram positivos, cuya apariencia se presenta en la figura 16.

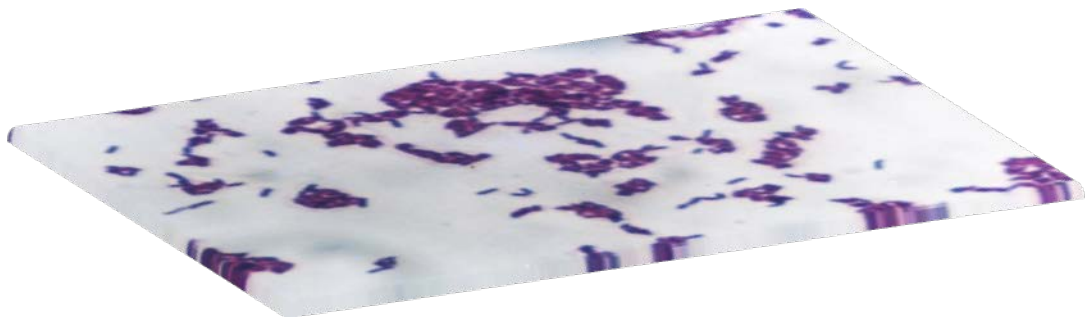


Figura 16. Coloración de Gram de los aislamientos de *S. aureus*

Luego, al efectuar la prueba de la catalasa (Figura 17), de las 220 cepas analizadas, 173 fueron positivas. De las cuales, 18 mostraron una reacción muy débil a la prueba, por lo que se las excluyó automáticamente del estudio. Se buscaba seleccionar aquellas cepas que exhibiesen con mayor claridad las características propias del *Staphylococcus aureus*.



Figura 17. Comparación entre una prueba catalasa positiva y una negativa, la emisión de burbujas (B) indica positividad en la prueba. Fuente: http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/743/Bacteriologia/Pruebas_de_laboratorio/Prueba_de_catalasa.html

Frente a la prueba de coagulasa (Figura 18), 79 cepas presentaron reacción positiva, de las cuales 11, aún siendo Gram-positivas y catalasa positivas, no presentaron hemólisis por lo cual también fueron excluidas del estudio.

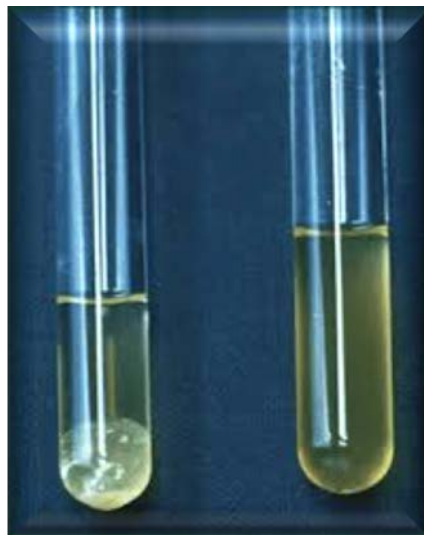


Figura 18. Prueba de coagulasa en tubo, la formación del coagulo en el tubo de la izquierda determina la positividad de la prueba. Fuente: <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-coagulasa-para-staphylococcus/>

Finalmente, un total de 68 cepas que resultaron positivas a todas las pruebas bioquímicas y que además presentaron hemólisis, fueron seleccionadas. Se realizó el estudio de susceptibilidad por difusión en agar método de Kirby Bauer (antibiograma). En la Tabla 10 se presentan los porcentajes de aislamientos sensibles, los que presentan sensibilidad intermedia y los resistentes de las 68 cepas de *S. aureus* evaluadas.

Tabla 10. Resultados de la prueba de susceptibilidad por antibiograma efectuado frente a las 68 cepas de *S.aureus*.

ANTIMICROBIANO	PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS		
	SENSIBLES	INTERMEDIOS	RESISTENTES
Penicilina	66.18%	-	33.82%
Amoxicilina-Ac.Clavulánico	91.16%		8.84%
Cefotaxime	91.16%		8.84%
Eritromicina	73.96%	8.40%	17.64%
Azitromicina	91.16%		8.84%
Tetraciclina	96.60%	-	3.40%
Ciprofloxacina	90.36%	7.60%	2.04%
Gentamicina	99.32%		0.68%

Penicilina G fue el antimicrobiano frente al cual se encontró el mayor número de microorganismos resistentes, un 34% del total de las muestras. Mientras que se encontró baja resistencia a aminoglucósidos (0.68%), solo un aislamiento de los 68 analizados fue resistente a gentamicina.

En general, de los 68 aislamientos seleccionados encontramos 27 que presentaron resistencia a por lo menos un (1) antimicrobiano. Estas cepas quedaron excluidas del estudio, ya que nuestro objetivo era seleccionar aquellas con alta susceptibilidad a todos los antimicrobianos probados. Por lo tanto, solo 41 aislamientos cumplieron con esta condición, de las cuales seleccionamos 10 cepas al azar para realizar los diversos estudios.

También mediante esta prueba de susceptibilidad por difusión (Antibiograma) pudimos seleccionar los tres antimicrobianos a ensayar: Azitromicina, danofloxacina y penicilina G. Estos agentes fueron elegidos como representantes de cada uno de los tres

grandes grupos establecidos según la clasificación basada en pautas PK/PD, y de acuerdo a lo detallado anteriormente:

<i>ANTIMICROBIANOS CON ACCIÓN:</i>	<i>ANTIMICROBIANO SELECCIONADO</i>
Tiempo- dependiente, con PAE nulo a moderado	Penicilinas (penicilina G)
Tiempo- dependiente con PAE prolongado	Azólidos (azitromicina)
Concentración dependiente con PAE prolongado	Fluoroquinolonas (danofloxacina)

5.2. PRUEBA CUANTITATIVA PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

Según mencionamos en el apartado Materiales y Métodos, se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a través de la prueba de macrodilución en caldo (Figura 19).

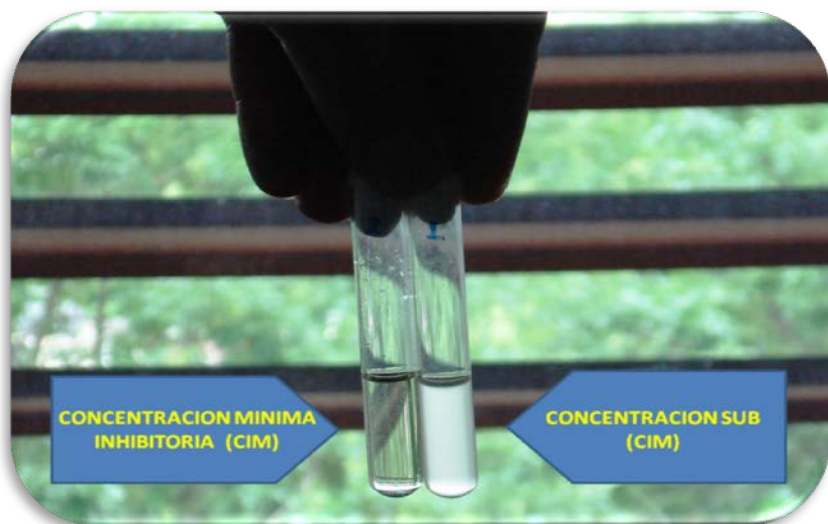


Figura 19. Resultado de la prueba de determinación de la CIM por el método de macrodilución

Se determinó la CIM₅₀ y la CIM₉₀ analizando cada uno de los tres antimicrobianos mencionados frente a cada uno de los 10 aislamientos a campo de *S. aureus* seleccionados.

Se evaluó la incidencia del pH en la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos, determinando la CIM a pH 7.4, 6.5 y pH 5.0. Se realizaron 3 repeticiones para cada pH y para cada antimicrobiano.

La tabla 11 presenta los valores generales de CIM₅₀ y CIM₉₀ para los diferentes antimicrobianos ensayados, frente a *S. aureus* (N= 10).

Tabla 11. CIM₅₀ Y CIM₉₀ de los diferentes antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus* a diferentes pHs.

ANTIMICROBIANO	pH	CIM₅₀µg/mL	CIM₉₀µg/mL
AZITROMICINA	7.4	1	1.5
	6.5	8	12
	5.0	64	95
DANOFLOXACINA	7.4	0.5	1
	6.5	0.5	1
	5.0	1	2
PENICILINA G	7.4	0.125	0.25
	6.5	0.125	0.125
	5.0	0.066	0.066

En las tablas 12, 13 y 14 se presentan los valores de CIM obtenidos frente a cada uno de los 10 aislamientos a campo de *S. aureus* evaluados para los tres antibacterianos a los distintos pHs, conjuntamente con la cepa ATCC.

Tabla 12. CIM de azitromicina (expresada en µg/mL) a pH 7.4, 6.5 y 5.0

CEPA	CIM (µg/mL) pH 5.0	CIM (µg/mL) pH 6.5	CIM (µg/mL) pH 7.4
7	64	16-8	1
12	64	8	2-1
16	64	8	2-1
25	64	8	1
31	64	8	1
35	125	8	1
43	125	16-8	1
48	64	8	2-1
53	64	16-8	1
65	125	8	2-1
ATCC	64	16	2-1

En la Tabla 12, azitromicina muestra un aumento significativo en el valor de la CIM a medida que se acidifica el medio, presentando un incremento de 8 veces la CIM entre el pH 7.4 y el pH 6.5; y de 64 a 125 veces la CIM entre el pH 7.4 y el pH 5.0.

Realizamos un test de anova de 1 vía, a los grupos entre si, el cual arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las CIMs obtenidas a pH 5 vs pH 7.4 y pH 5 vs pH 6.5, pero no entre CIMs obtenidas. El test no paramétrico (Kruskal-Wallis análisis de varianza de una sola vía sobre rangos), arrojó diferencias estadísticamente significativas ($P = < 0.001$) entre los grupos, por efecto del pH al comparar a pH 6.5 vs pH 7.4. Los resultados del análisis se presentan en la Figura 20.

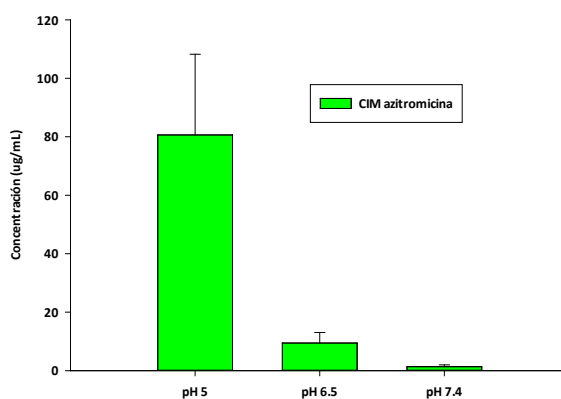


Figura 20. CIM de azitromicina frente a *S. aureus* a diferentes pHs.

Tabla 13. CIM de danofloxacina (expresada en µg/mL) a pH 7.4, 6.5 y 5.0

CEPA	CIM (µg/mL) pH 5.0	CIM (µg/mL) pH 6.5	CIM (µg/mL) pH 7.4
7	2	1	0.5
12	2-1	1	1-0.5
16	2-1	1	1-0.5
25	2-1	1-0.5	1-0.5
31	2-1	1	1-0.5
35	2-1	1-0.5	1-0.5
43	2	1-0.5	1-0.5
48	2-1	1-0.5	1-0.5
53	2-1	1-0.5	1-0.5
65	2	1-0.5	1
ATCC	2-1	1-0.5	0.5

Los valores de CIM de danofloxacin a pH 7.4 y 6.5 fueron similares (en el orden del $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se presentó un aumento de 1 vez la CIM a pH 5.0, en el cual se incrementó a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Realizamos la estadística descriptiva, y en este caso tampoco paso el Test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov, por lo cual se procedió a analizar por Kruskal-Wallis, arrojando una $P = 0.004$, es decir existe entre los grupos diferencia estadísticamente significativas por efecto del pH (Figura 21).

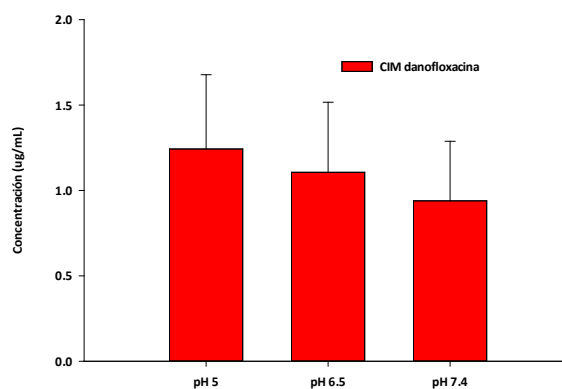


Figura 21. CIM de danofloxacin frente a *S. aureus* a diferentes pHs.

Al aplicar el Test de Bonferroni entre los grupos, se obtuvo diferencias significativas entre las CIMs obtenidas a pH 5 vs pH 7.4, pero no entre CIMs obtenidas pH 5 vs pH 6.5 ni a pH 6.5 vs pH 7.4 (Figura 20).

En el caso de Penicilina G, se observó una disminución significativa en el valor de la CIM a medida que el pH es más ácido, disminuyendo 4 veces entre pH 7.4 y 6.5; y 8 veces entre pH 7.4 y 5.0 (Tabla 14).

Tabla 14. CIM de Penicilina G frente a *Staphylococcus aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.0

CEPA	CIM ($\mu\text{g/mL}$) pH 5.0	CIM ($\mu\text{g/mL}$) pH 6.5	CIM ($\mu\text{g/mL}$) pH 7.4
7	0.066	0.125	0.5-0.25
12	0.066	0.125	0.5
16	0.066	0.125-0.066	0.5-0.25
25	0.066	0.125-0.066	0.5-0.25
31	0.125-0.066	0.125	0.5-0.25
35	0.066	0.125-0.066	0.25-0.125
43	0.066	0.125-0.066	0.5-0.25
48	0.125	0.125	0.5-0.25
53	0.125-0.066	0.125	0.25-0.125
65	0.125-0.066	0.125	0.5-0.25
ATCC	0.066	0.25-0.125	0.5-0.25

Nuevamente tras realizar la estadística descriptiva, no pasó el Test de Normalidad. Kruskal-Wallis arrojó una $P = < 0.001$, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos por efecto del pH (Figura 22), lo cual también coincidió con el Test de Bonferroni.

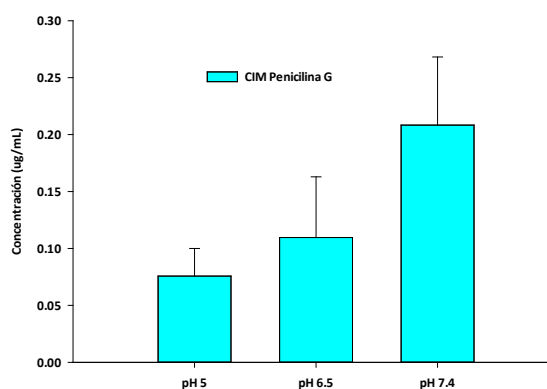


Figura 22. CIMs de penicilina G frente a *S. aureus* a diferentes pH.

La Tabla 15, presenta la estadística descriptiva de los datos obtenidos para los tres antimicrobianos bajo las diferentes condiciones de pH. Puede apreciarse claramente la existencia de cambios en los valores de CIM al modificarse las condiciones del medio de cultivo.

Estos cambios en los valores de CIM, en algunas ocasiones, se traducen estadísticamente en diferencias altamente significativas, que pueden llegar a determinar diferencias en la eficacia de los tratamientos antibacterianos implementados.

Tabla 15. Estadística descriptiva para la concentración inhibitoria mínima (CIM) de azitromicina, danofloxacin y penicilina G frente a *S. aureus* a diferentes pHs del medio de cultivo.

ANTIMICROBIANO	pH	N	Media µg/mL	SD µg/mL	Min µg/mL	Max µg/mL	K-S (P)	Bonferroni
AZITROMICINA ^a	5	33	80.64	27.59	64	125	<0.001	^{ac} <0.001
AZITROMICINA ^b	6.5	33	9.46	3.58	4	16	<0.001	^{ab} <0.001
AZITROMICINA ^c	7.4	33	1.36	0.62	0.5	2	<0.001	^{bc} 0.131
DANOFLOXACINA ^d	5	33	1.24	0.44	1	2	<0.001	^{df} 0.008
DANOFLOXACINA ^e	6.5	33	1.11	0.41	0.5	2	<0.001	^{de} 0.506
DANOFLOXACINA ^f	7.4	33	0.94	0.35	0.5	2	<0.001	^{ef} 0.280
PENICILINA G ^g	5	33	0.08	0.02	0.033	0.125	<0.001	^{gi} <0.001
PENICILINA G ^h	6,5	33	0.11	0.05	0.066	0.25	<0.001	^{gh} 0.017
PENICILINA G ⁱ	7.4	33	0.21	0.06	0.125	0.25	<0.001	^{hi} <0.001

5.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Determinamos la Concentración Mínima Bactericida (CMB), es decir la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir al 99.9% del inóculo inicial.

Utilizamos la técnica de dilución en CMH como fue previamente explicado en el apartado 4.2.4 de Métodos. Se sembró una cantidad conocida de inóculo, de cada uno de los tubos sin turbidez, en placas de agar. El número de colonias que creció en estos subcultivos, fue comparado con el número de UFC/mL del cultivo original. La mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1 % del inóculo original se denomina concentración bactericida mínima (CBM).

En las Tablas 16 a 18 se presenta el efecto del pH sobre las CIMs, CBMs y la relación entre ambas para los tres antimicrobianos bajo estudio.

Tabla 16. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Azitromicina frente a *Staphylococcus aureus*

CEPA	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM
	(µg/mL)			(µg/mL)			(µg/mL)		
	pH 5.0			pH 6.5			pH 7.4		
7	64	250	4	16-8	64	4-8	1	16	16
12	64	250	4	8	64	8	2-1	16	8-16
16	64	250	4	8	64	8	2-1	16	8-16
25	64	250	4	8	64	8	1	16	16
31	64	250	4	8	64	8	1	16	16
35	125	250	2	8	64	8	1	16	16
43	125	250	2	16-8	64	4-8	1	16	16
48	64	250	4	8	64	8	2-1	16	8-16
53	64	250	4	16-8	64	4-8	1	16	16
65	125	250	2	8	64	8	2-1	16	8-16
ATCC	64	250	4	16	64	8	2-1	16	8-16

CIM: concentración inhibitoria mínima; CMB: concentración bactericida mínima

Tabla 17. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Danofloxacina frente a *Staphylococcus aureus*

CEPA	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM
	(µg/mL)			(µg/mL)			(µg/mL)		
	pH 5.0			pH 6.5			pH 7.4		
7	2	8	4	1	2	2	0.5	0.5	1
12	2-1	8-4	4	1	2	2	1-0.5	1-0.5	1
16	2-1	8-4	4	1	2	2	1-0.5	1-0.5	1
25	2-1	8-4	4	1-0.5	2-1	2	1-0.5	1-0.5	1
31	2-1	8-4	4	1	2	2	1-0.5	1-0.5	1
35	2-1	8-4	4	1-0.5	2	2	1-0.5	1-0.5	1
43	2	8	4	1-0.5	2	2	1-0.5	1-0.5	1
48	2-1	8-4	4	1-0.5	2	2	1-0.5	1-0.5	1
53	2-1	8-4	4	1-0.5	2	2	1-0.5	1-0.5	1
65	2	8	4	1-0.5	2	2	1	1	1
ATCC	2-1	8-4	4	1-0.5	2	2	0.5	0.5	1

Tabla 18. Efecto del pH sobre la CIM y la CMB de Penicilina G frente a *Staphylococcus aureus*

CEPA	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM	CIM	CMB	CMB:CIM
	(µg/mL)			(µg/mL)			(µg/mL)		
	pH 5			pH 6.5			pH 7.4		
7	0.066	2	16	0.125	4	16	0.5-0.25	4	4-8
12	0.066	2	16	0.125	4	16	0.5	4	4
16	0.066	2	16	0.125-0.066	4	16	0.5-0.25	4	4-8
25	0.066	2	16	0.125-0.066	4	16	0.5-0.25	4	4-8
31	0.125-0.066	2	8 - 16	0.125	4	16	0.5-0.25	4	4-8
35	0.066	1	16	0.125-0.066	4	16	0.25-0.125	4	8-16
43	0.066	2	16	0.125-0.066	4	16	0.5-0.25	4	4-8
48	0.125	2	8	0.125	4	16	0.5-0.25	4	4-8
53	0.125-0.066	1	8 - 16	0.125	4	16	0.25-0.125	4	8-16
65	0.125-0.066	2	8 - 16	0.125	4	16	0.5-0.25	4	4-8
ATCC	0.066	2	16	0.25-0.125	4	8-16	0.5-0.25	4	4-8

5.4. CURVAS DE LETALIDAD O MUERTE BACTERIANA

Posteriormente realizamos curvas de letalidad o muerte bacteriana (CLB), método cinético que permite evidenciar el poder bactericida del antibacteriano. Se valoró la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de los antimicrobianos en estudio. La curva de muerte bacteriana es un método complementario de la CMB.

Se enfrentó un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en caldo. Las concentraciones fueron 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM; más un control sin antibiótico. Se realizó recuento de colonias a los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas, los que fueron expresados 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.

Cuando una población microbiana se expone a un agente letal, la cinética de la muerte es casi siempre exponencial ya que el número de sobrevivientes disminuye de forma geométrica con el tiempo. Si representamos gráficamente el logaritmo del número de sobrevivientes frente al tiempo se obtiene una línea recta cuya pendiente negativa define la tasa de mortalidad. Esta tasa de mortalidad nos da una idea de la fracción de la población inicial que sobrevive durante un determinado período de tratamiento. Para determinar el número real de sobrevivientes es necesario conocer además el tamaño inicial de la población.

Como los microorganismos difieren ampliamente en su resistencia a los agentes antimicrobianos, los factores que se hacen significativos son el tamaño de la población inicial y la tasa de mortalidad de los miembros más resistentes de la población.

Las cepas N° **7**, **12**, **25**, **35**, **53** y **63** fueron seleccionadas para realizar curvas de muerte bacteriana frente a concentraciones ascendentes de los 3 antimicrobianos en estudio y bajo diferentes condiciones de pH (7.4, 6.5 y 5.0), como así también en presencia de leche y de suero bovino.

A continuación se presentan los análisis de las curvas de muerte bacteriana realizadas a las cepas de *S. aureus* (n= 6) aisladas a campo a partir de bovinos portadores de mastitis subclínica en comparación con *S.aureus* ATCC 29213 (cepa de referencia), frente a cada uno de los tres antimicrobianos en estudio.

5.4.1. AZITROMICINA

Las Figuras 22 a 51 presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de bovinos portadores de mastitis subclínica (promedio de seis cepas salvajes), como así también de la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs de azitromicina en CMH a pH 7.4, 6.5 y 5.0; en leche y en CMH suplementado con 40% suero bovino.

5.4.1.1. Azitromicina a pH 7.4

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de azitromicina en CMH pH 7.4. La CIM de azitromicina a pH 7.4 fue 1 µg/mL, obsérvese en las figuras 22 y 23 que su actividad frente a *S. aureus* no se vio aumentada al aumentar las concentraciones del antimicrobiano, prácticamente a 1, 2, 4 y 8 veces la CIM presentó similar cinética de muerte. Este comportamiento fue luego corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 24 y 25 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (24 A y 25 A). Las curvas en ausencia de azitromicina fueron analizadas por el modelo de Gompertz. En este grupo también se incorporaron las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.125, 0.25 y 0.5 CIM de azitromicina, ya que, como se puede observar en las gráficas, a esas concentraciones no existió inhibición del crecimiento bacteriano, aunque sí se vio afectada la magnitud de crecimiento.

En las Figuras 23 y 24 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de

letalidad bacteriana en presencia de azitromicina (1xCIM, 2xCIM, 4xCIM y 8xCIM) a pH 7.4, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A las cuatro concentraciones, tanto las cepas salvajes como la de referencia, presentaron similar cinética de muerte.

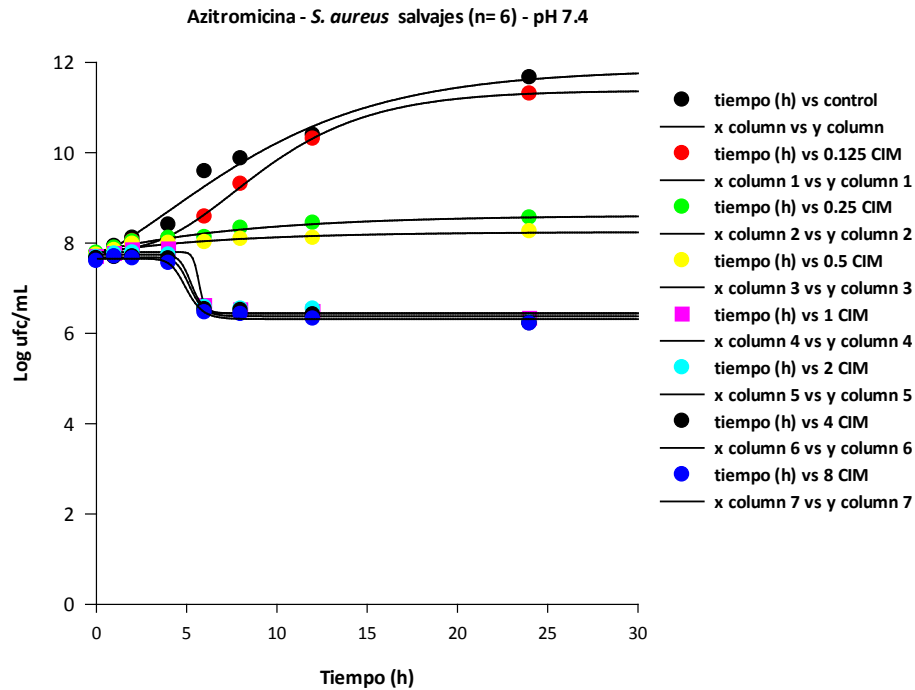


Figura 23. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 7.4

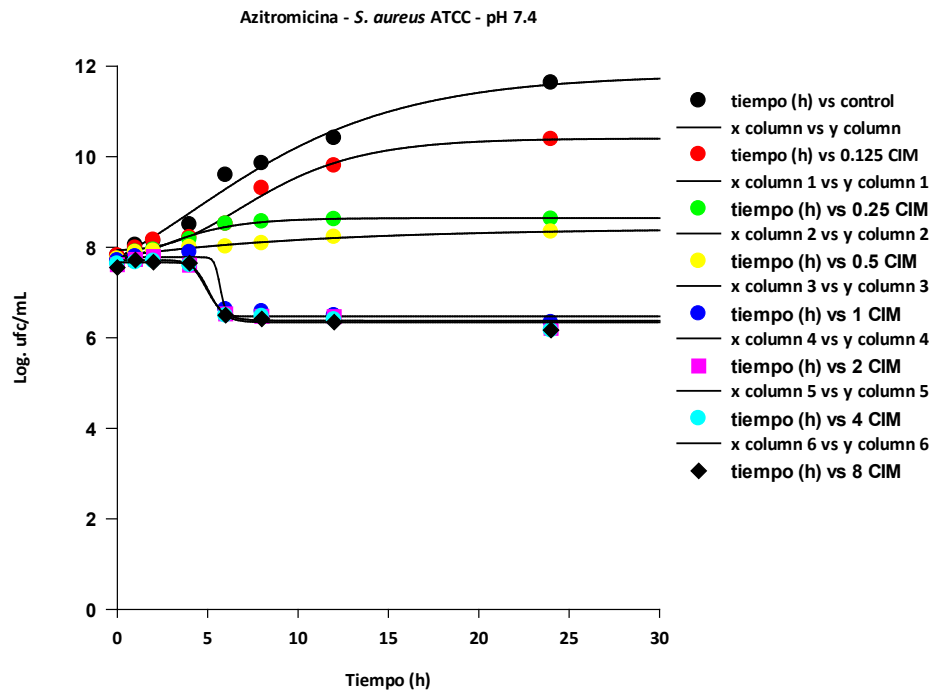


Figura 24. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH a pH 7.4.

AZT- *S. aureus* salvajes (n= 6)-pH 7.4

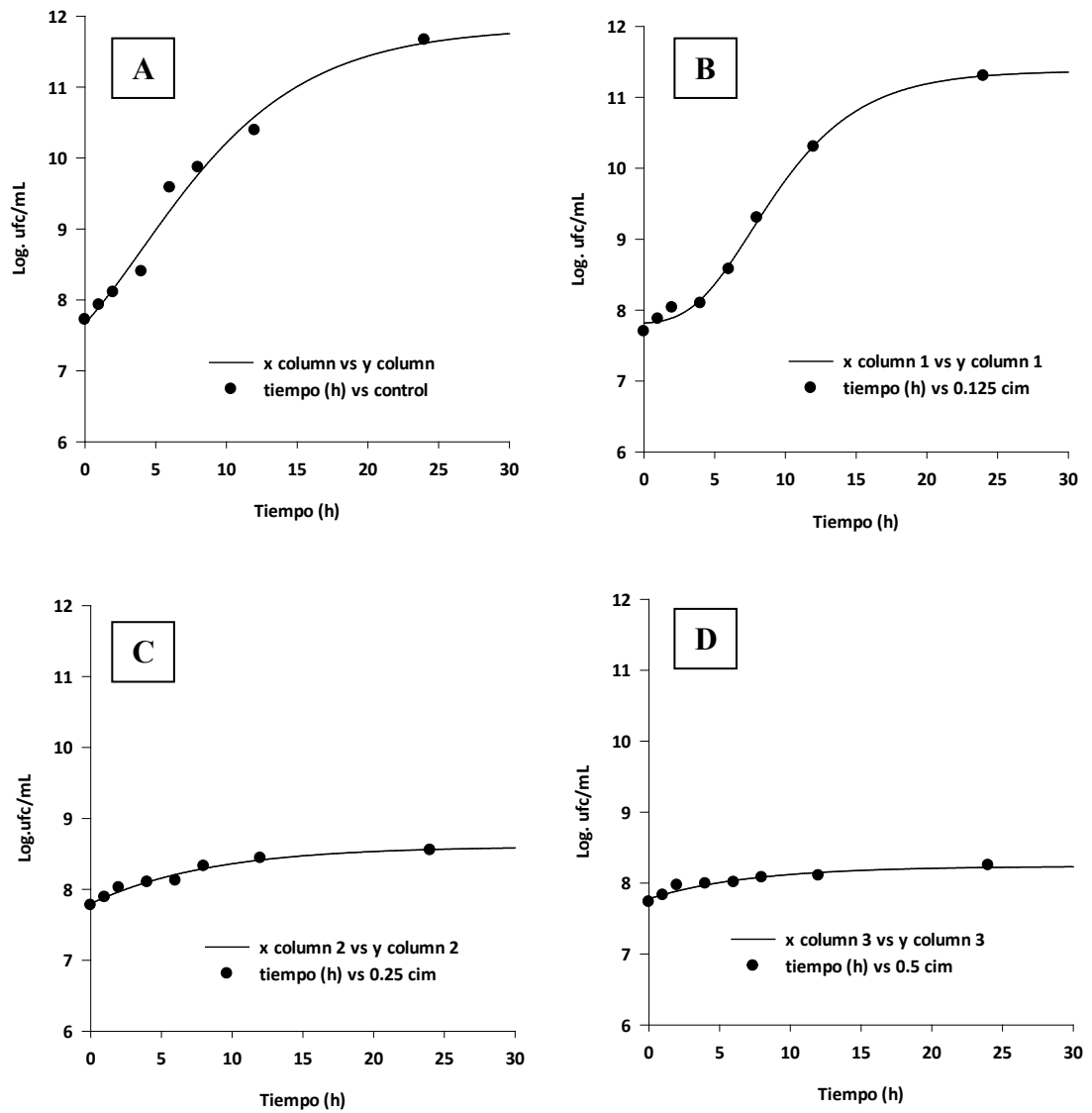


Figura 25. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (0.25 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 µg/mL), D: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM (1 µg/mL).

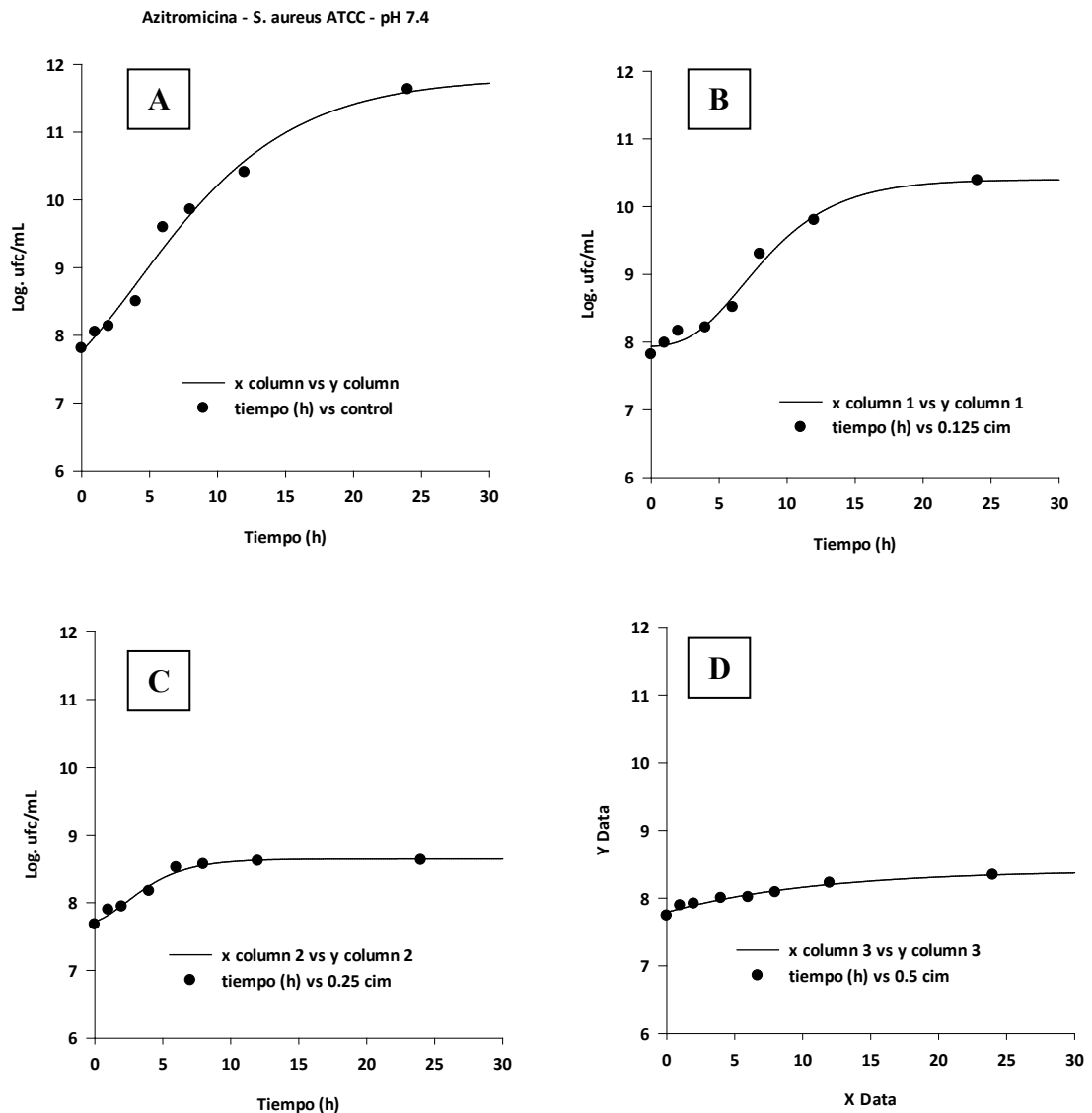


Figura 26. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (0.25 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 µg/mL), D: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM (1 µg/mL).

En la Tabla 19 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos), cuya expresión matemática es:

$$\text{Log } N = a + C \cdot \exp(-\exp(-b(t - m))) \quad \text{Ec. 6}$$

Recordemos que **Log N** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (Log UFC/mL) al tiempo **t** (h); **a** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (equivale aproximadamente al Log de los niveles iniciales de bacterias) (Log

UFC/mL); **c** es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos Log de crecimiento) (Log UFC/mL); **m** es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h); **b** es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m** (h^{-1}). Con estos parámetros obtuvimos la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) (Log UFC/mL*h) ($e = 2.7182$), la duración de la fase de latencia (**LPD** = $m - 1/b$) (h) y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares (**MPD** = $a + c$) (Log UFC/mL).

A medida que se aumentó la concentración de azitromicina (0.125, 0.25 y 0.5 CIM), disminuyó MPD y se mantuvo el microorganismo durante mayor tiempo en fase de latencia.

Aunque estos efectos ocasionados por la presencia de concentraciones subinhibitorias de azitromicina fueron más evidentes al analizar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo en ausencia de azitromicina y en presencia de concentraciones sub-CIM mediante un modelo de crecimiento exponencial:

$$N = N_0 \cdot \exp^{(Kc \cdot T)} \quad \text{Ec. 7}$$

Donde la pendiente de crecimiento se hace más suave en presencia de concentraciones sub-CIM, arrojando por lo tanto una semivida de crecimiento más lenta en comparación a la población bacteriana en ausencia de azitromicina (Tabla 19).

Tabla 19. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 7.4 frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 7.4				<i>S. aureus</i> ATCC 29213 - pH 7.4			
Parámetros	Unidad	control	0.125 CIM	0.25 CIM	0.5 CIM	control	0.125 CIM	0.25 CIM	0.5 CIM
R		0.9907	0.9981	0.9869	0.9642	0.9999	0.9925	0.9904	0.9833
c	Log ufc/mL	4.94	3.56	5.96	917	4.75	2.47	0.99	0.78
b	h ⁻¹	0.15	0.24	0.12	0.14	0.15	0.26	0.42	0.09
m	h	4.06	7.61	-15.49	-55.29	4.20	6.73	2.37	-76.10
a	Log ufc/mL	6.91	7.81	2.65	-908.69	7.06	7.93	7.65	-569.52
μ	Log ufc/mL*h	0.28	0.31	0.27	46.35	0.27	0.24	0.15	19.09
LPD	h	19.89	27.82	-132.57	-409.65	20.77	21.66	3.29	-858.60
MPD	Log ufc/mL	11.84	11.37	8.61	8.24	11.81	10.40	8.64	8.41
Kc	h ⁻¹	0.2514	0.2173	0.0529	0.0354	0.2436	0.1500	0.0454	0.0438
T½c	h	2.76	3.19	13.10	19.58	2.84	4.62	15.26	15.82

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno.

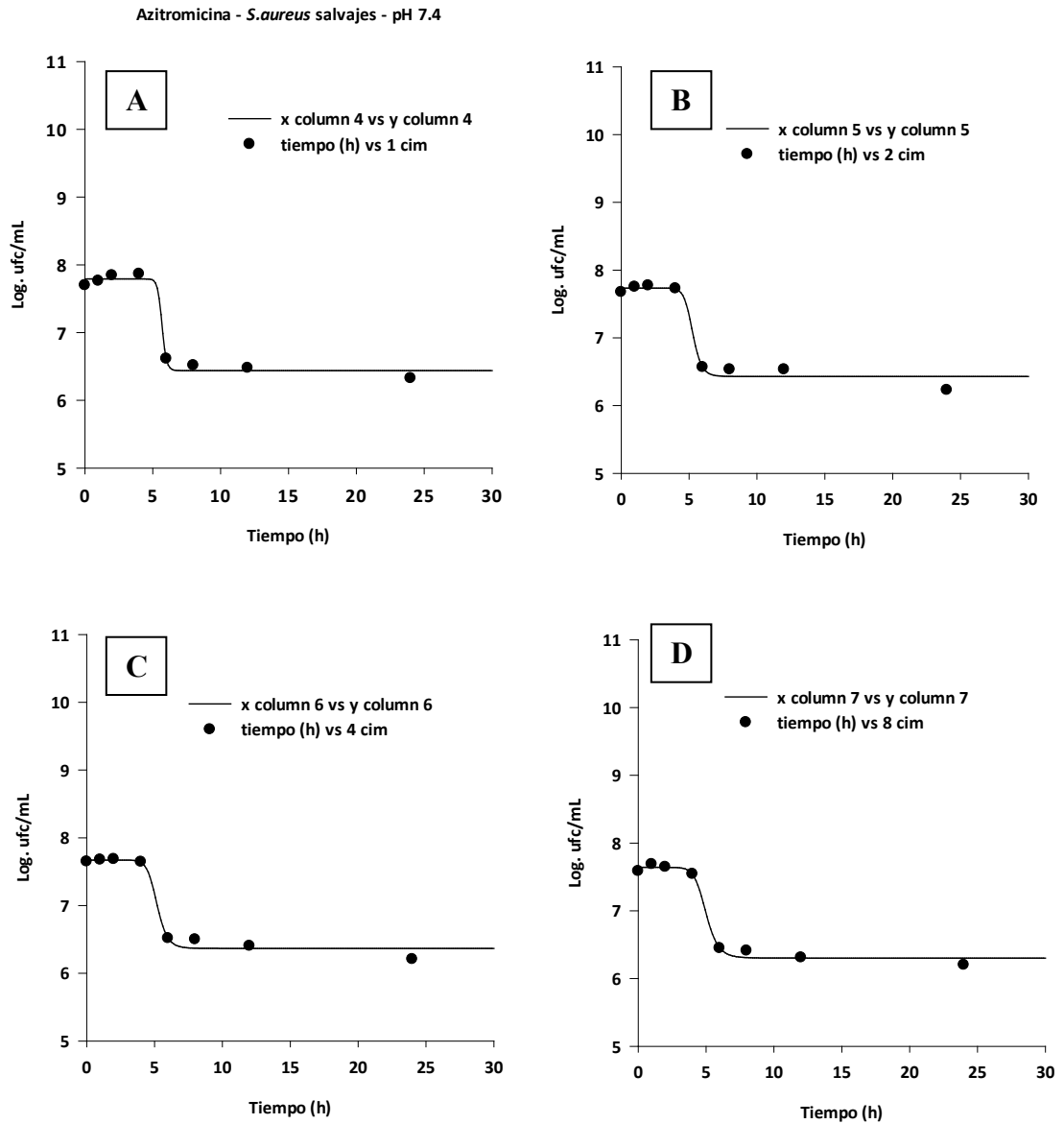


Figura 27. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (16 µg/mL).

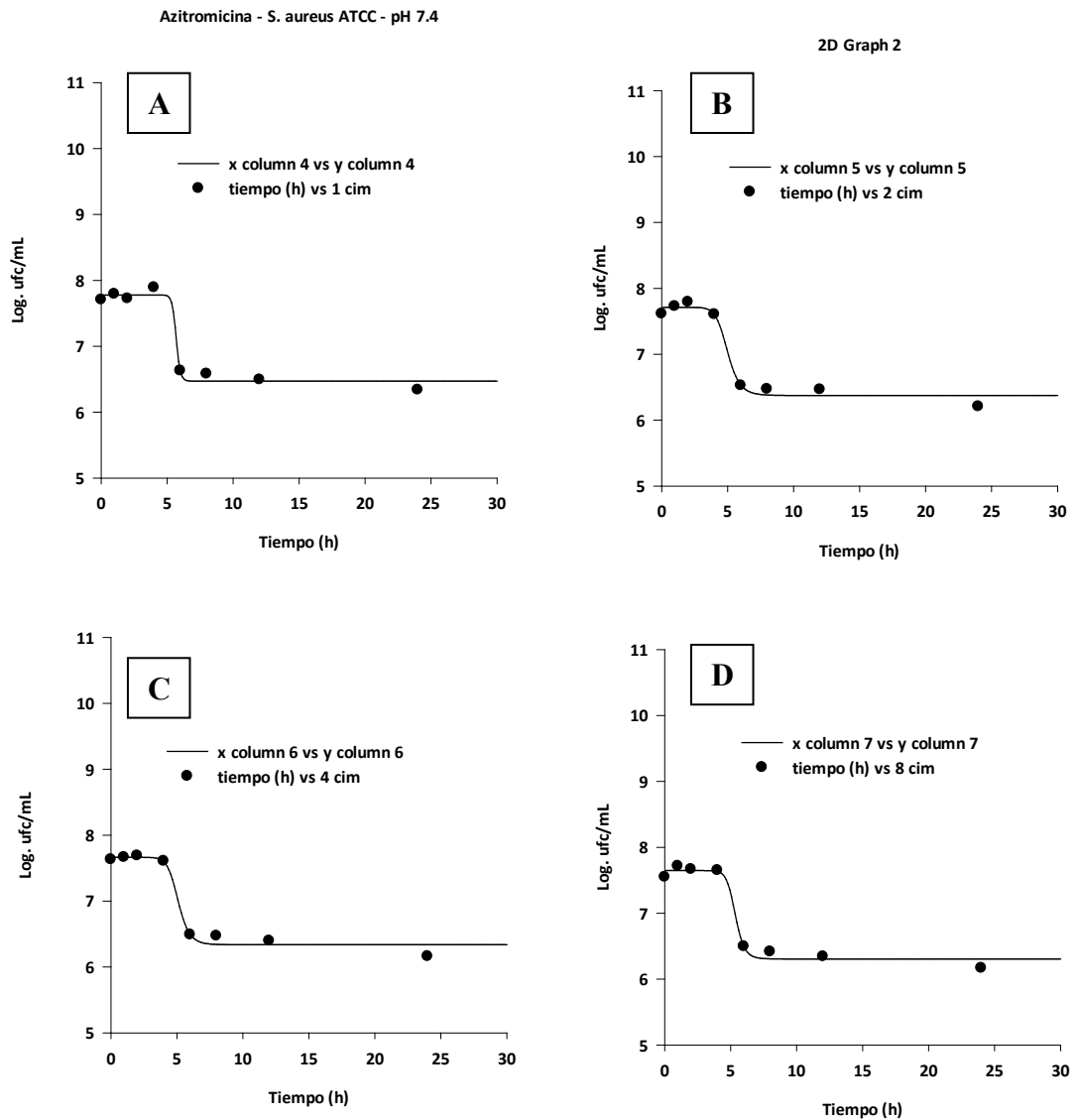


Figura 28. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (16 µg/mL).

En la Tabla 20 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base:

$$N = N_0 - \frac{N_{max} \cdot T^{\square}}{T_{150}^{\square} + T^{\square}} \quad \text{Ec. 8}$$

Donde N es el número de UFC/mL a un tiempo determinado, N_0 es la concentración del inóculo inicial (10^6 UFC/mL), N_{max} es la población bacteriana final, T_{150} es el tiempo

necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, γ es el coeficiente de sigmoidicidad y T es el tiempo.

También en la Tabla 20 se presentan los parámetros obtenidos tras la aplicación del modelo de regresión lineal, cuya ecuación es:

$$\text{Log } N_t = \log N_0 + a t \quad \text{Ec.9}$$

Donde: **Log N_t** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos finales (Log UFC/mL) al cabo del tiempo t , dado en horas; **Log N_0** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos iniciales (Log UFC/mL); **a** corresponde a la pendiente de la regresión ((UFC/ml)⁻¹h⁻¹) que es negativa cuando hay efecto bactericida.

Tabla 20. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 7.4 frente a diferentes concentraciones múltiples de la CIM de azitromicina.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 7.4				<i>S. aureus</i> ATCC - pH 7.4			
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
R		0.9763	0.9924	0.9989	0.9917	0.9670	0.975	0.9971	0.9809
N _{max}	UFC/mL	2109000	1694000	1612000	1588000	2180000	1604000	1444000	1466000
Y		60.54	19.76	16.46	13.01	89.67	12.84	14.47	23.66
T ₁₅₀	h	5.63	4.88	4.73	4.41	5.75	4.37	4.56	5.13
N ₀	UFC/mL	49800000	47166667	44533333	38466667	50600000	40800000	42600000	35400000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1318	-0.1386	-0.1383	-0.1328	-0.1310	-0.1349	-0.1410	-0.1327
T _{½α}	h	5.26	5.00	5.01	5.22	5.29	5.14	4.91	5.22

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T_{½α}**: tiempo medio de declinación

5.4.1.2. Azitromicina a pH 6.5

Nuevamente, como ocurrió al pH 7.4, tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de azitromicina. La CIM para azitromicina a pH 6.5 fue 8 µg/mL, en las Figuras 29 y 30 se puede corroborar su acción independiente de la concentración, ya que su actividad frente a *S. aureus* no aumenta al incrementar las concentraciones. Presentó similar cinética de muerte a 1, 2, 4 y 8 veces la CIM, de manera similar a lo que ocurrió cuando se ensayó a pH 7.4. El aumento de la CIM demuestra la pérdida de potencia antimicrobiana a medida que el pH se va acidificando. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 31 y 32 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (31 A y 32 A). Las curvas en ausencia de azitromicina fueron analizadas por el modelo de Gompertz. En este grupo también se incorporaron las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25 y 0.5 CIM de azitromicina, ya que, como se puede observar en las gráficas, a esas concentraciones continuó el crecimiento bacteriano, aunque de manera más lenta.

En las Figuras 33 y 34 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de azitromicina (1xCIM, 2xCIM, 4xCIM y 8xCIM) a pH 6.5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A las cuatro concentraciones tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

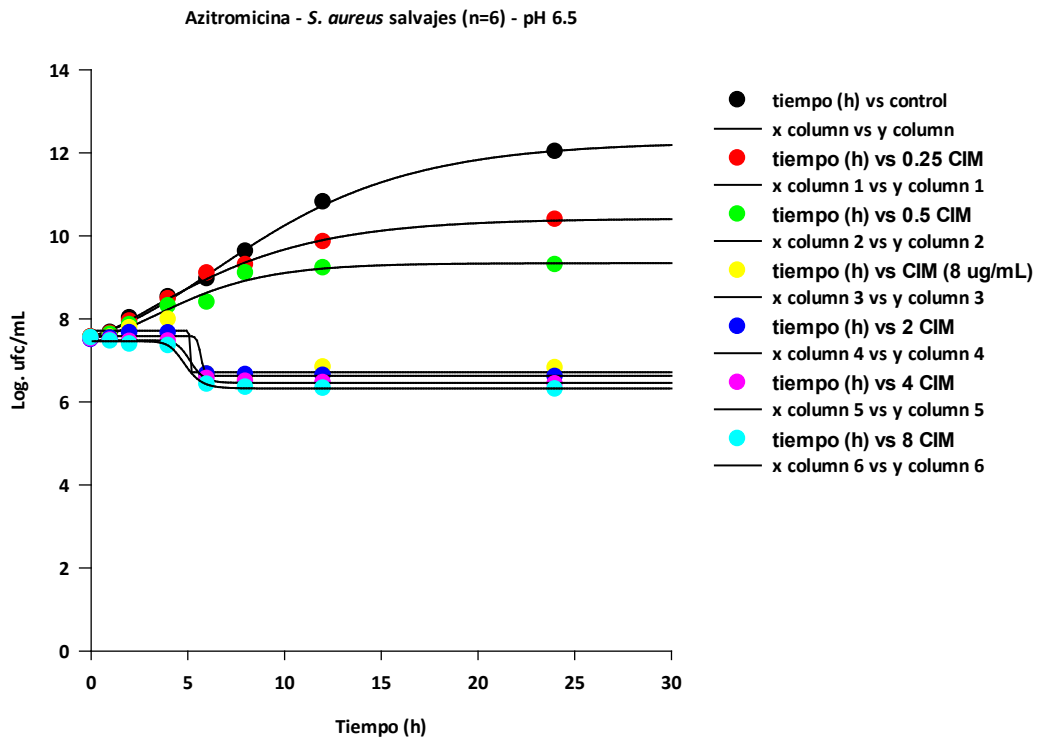


Figura 29. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 6.5

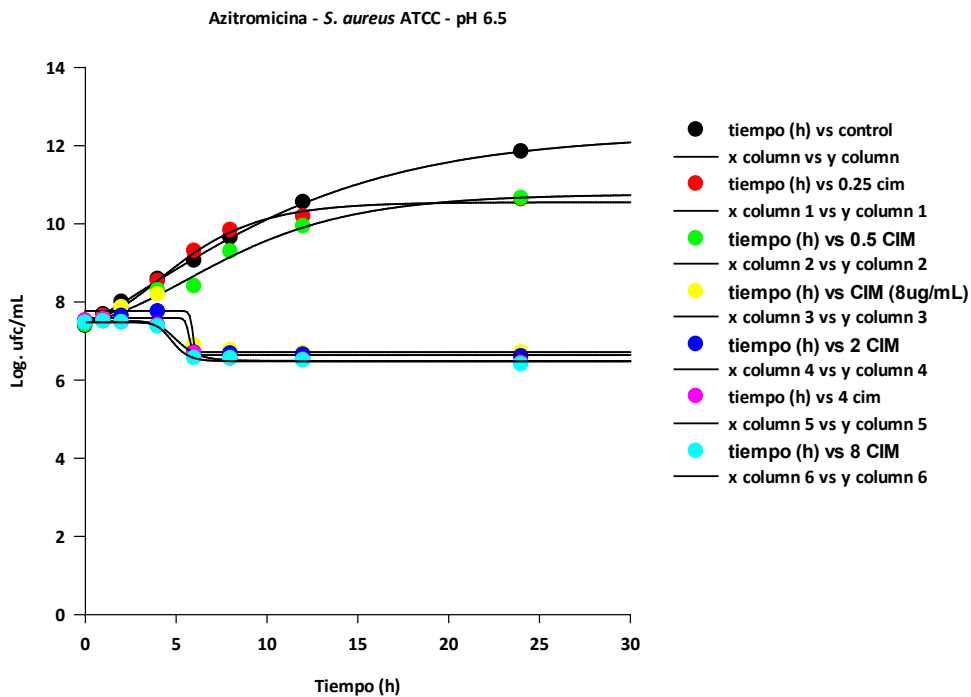


Figura 30. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH a pH 6.5.

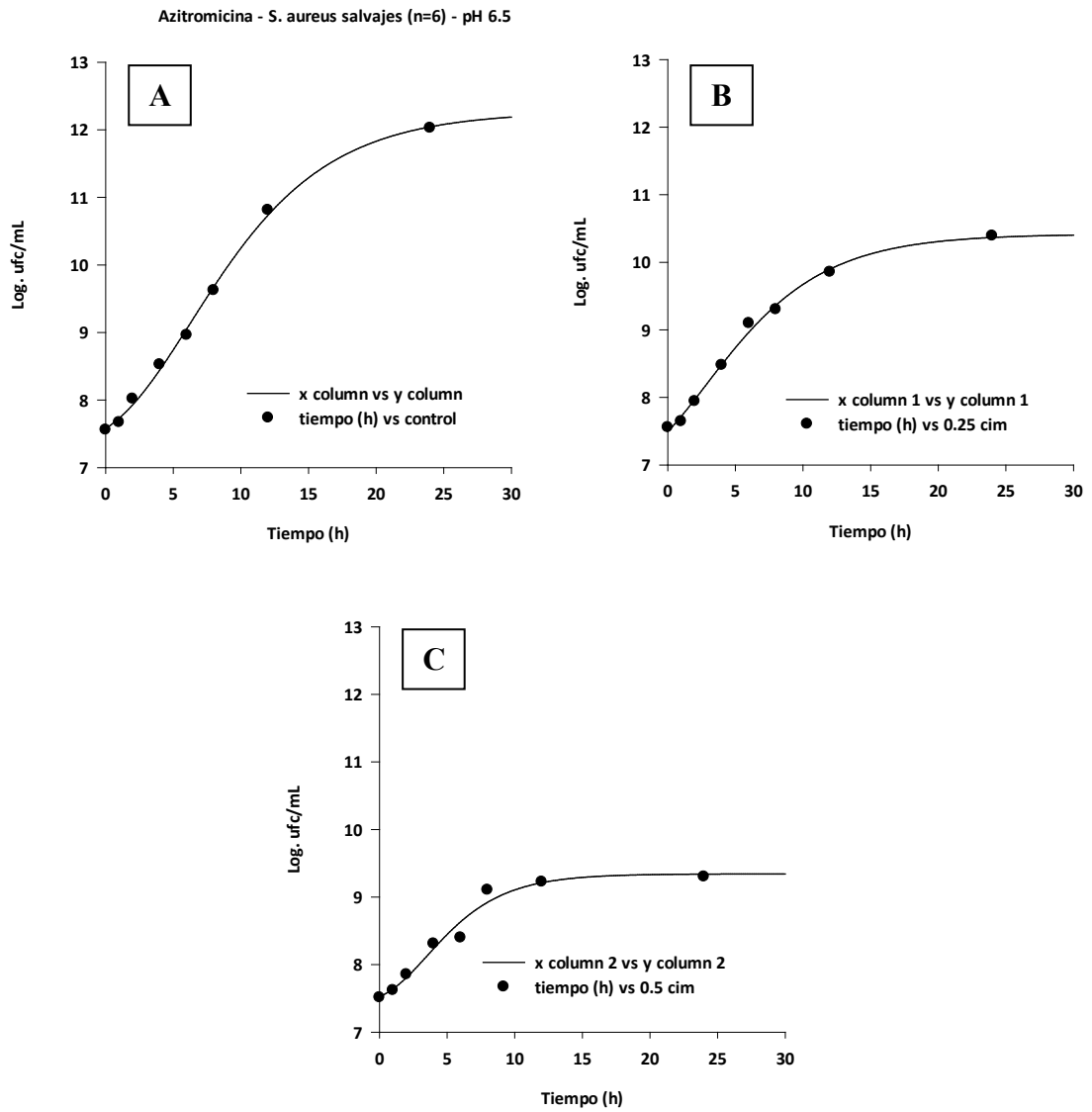


Figura 31. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

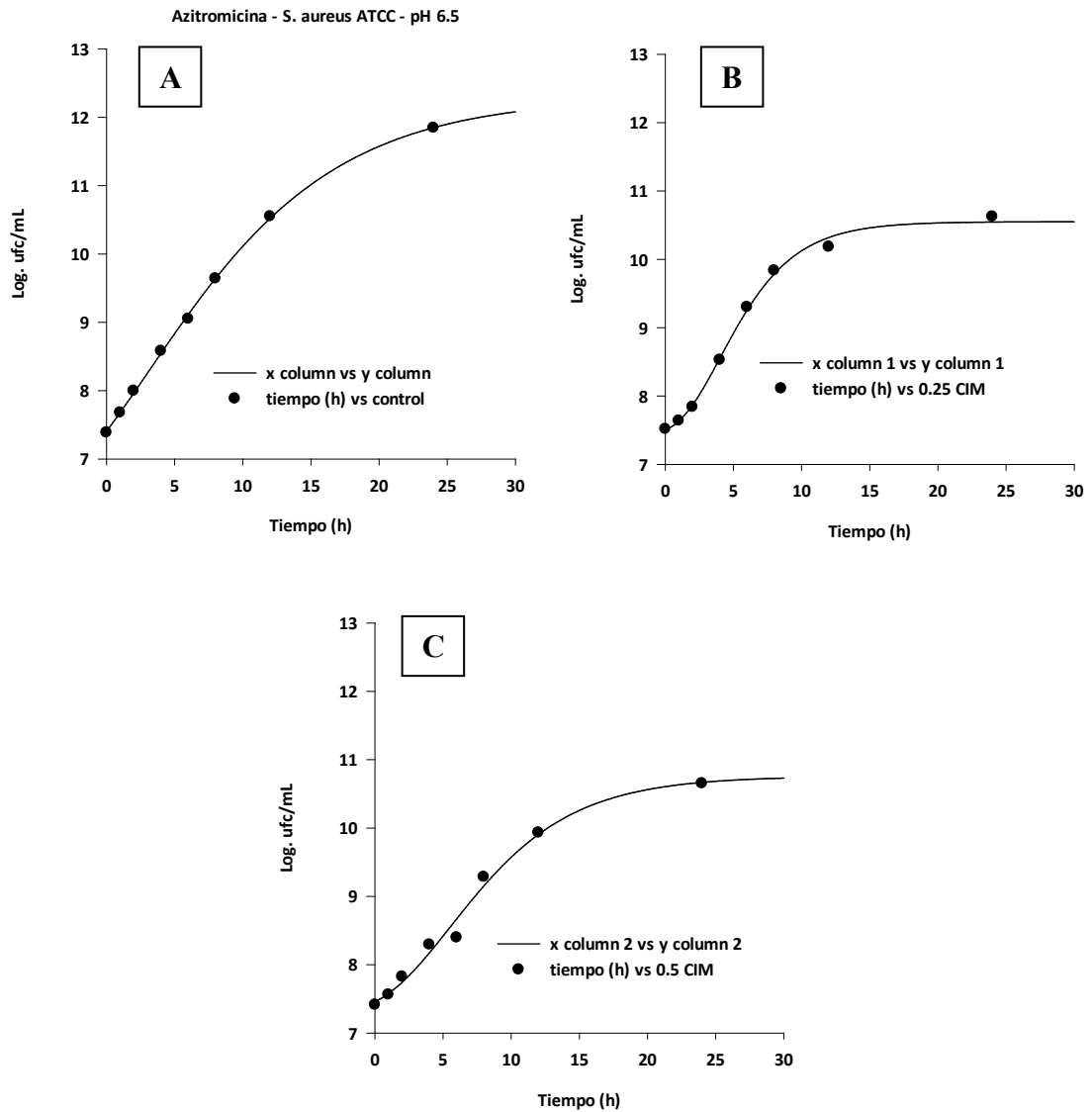


Figura 32. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina), B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (2 µg/mL), C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (4 µg/mL).

En la Tabla 21 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 21. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 6.5 frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 6.5				<i>S. aureus</i> ATCC 29213 - pH 6.5			
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM*	control	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM*
R		0.9990	0.9978	0.9866	0.9554	0.9998	0.9985	0.9940	0.9326
c	Log ufc/mL	4.94	3.52	1.91	1.00	6.33	3.13	3.48	1.05
b	h ⁻¹	0.17	0.20	0.31	-47.47	0.13	0.32	0.20	-10.29
m	h	6.28	2.86	3.55	5.12	3.13	4.06	5.56	5.94
a	Log ufc/mL	7.32	6.90	7.43	6.71	5.97	7.42	7.28	6.71
μ	Log ufc/mL*h	0.32	0.26	0.22	-17.46	0.29	0.37	0.25	-3.99
LPD	h	30.46	9.24	8.13	-0.09	17.03	9.47	23.16	-0.48
MPD	Log ufc/mL	12.27	10.42	9.34	7.71	12.30	10.55	10.76	7.77
Kc	h ⁻¹	0.2520	0.1415	0.0755	nc	0.2630	0.1264	0.1721	nc
T½c	h	2.75	4.90	9.18		2.63	5.48	4.03	

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. *Se realizó el modelado de Gompertz. nc: no calculado

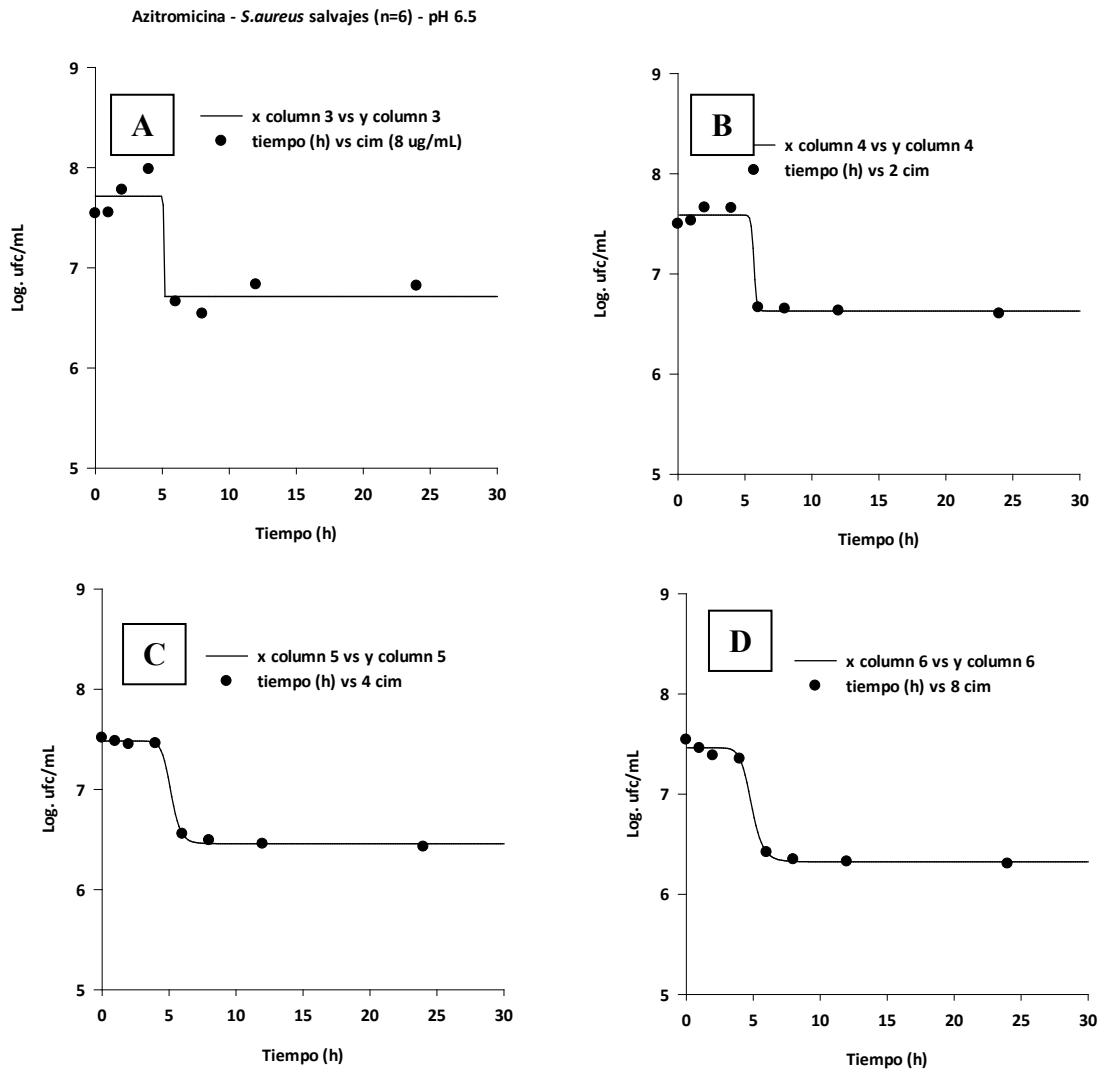


Figura 33. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (8 μg/mL), B: 2xCIM de azitromicina (16 μg/mL), C: 4xCIM de azitromicina (32 μg/mL), D: 8xCIM de azitromicina (64 μg/mL).

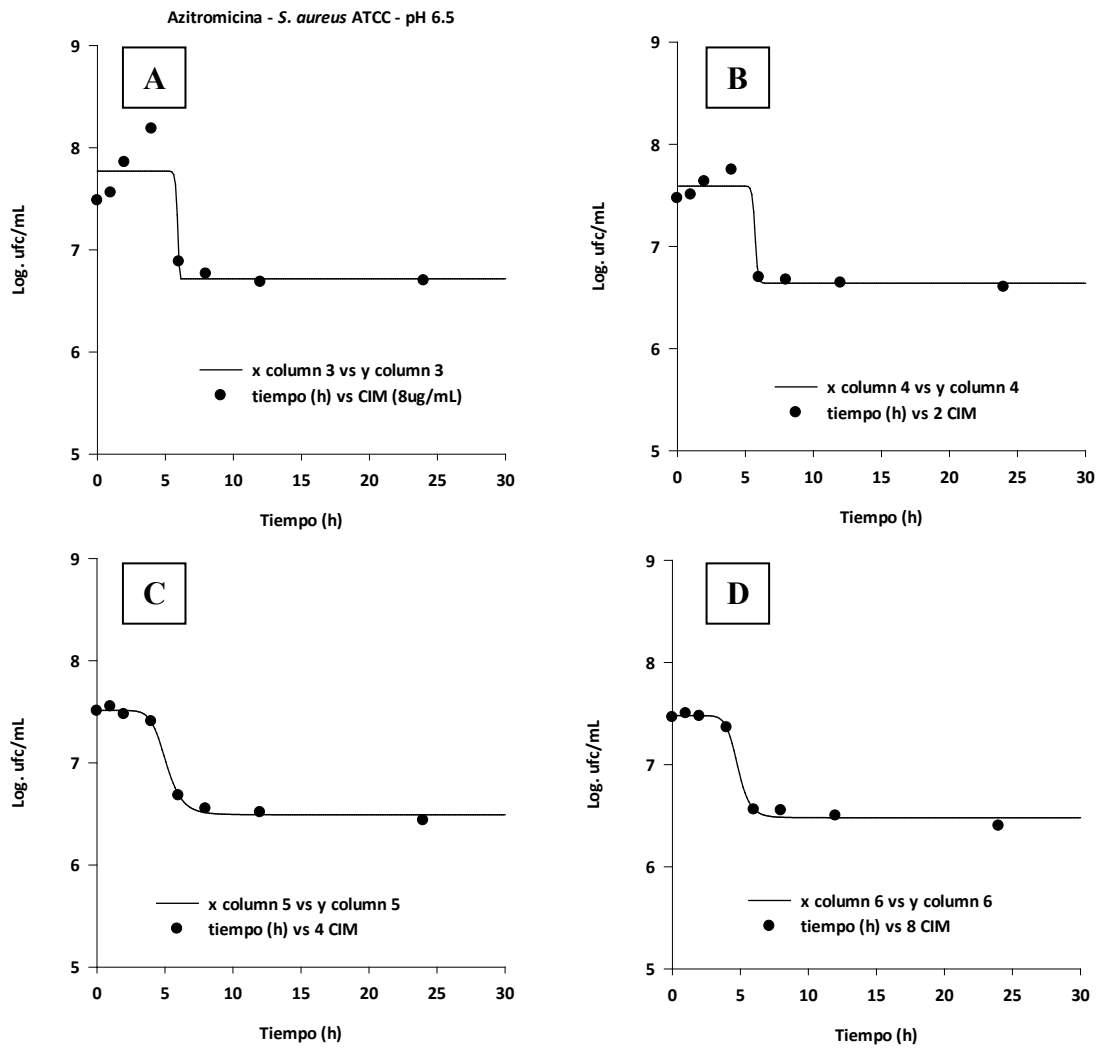


Figura 34. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (8 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (16 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (32 µg/mL), D: 8x CIM de azitromicina (64 µg/mL).

En la Tabla 22 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base

Tabla 22. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 6.5 frente a diferentes concentraciones múltiples de la CIM de azitromicina.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 6.5			<i>S. aureus</i> ATCC - pH 6.5		
Parámetros	Unidad	2 CIM	4 CIM	8 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
R		0.9967	0.9964	0.9795	0.9481	0.9944	0.9984
Nmax	UFC/mL	4015000	2675000	2020000	3998000	2732000	2512000
γ		63.64	15.68	12.26	-168.84	9.63	11.95
T ₁₅₀	H	5.58	4.76	4.38	4.65	4.50	4.36
N ₀	UFC/mL	31500000	32750000	34800000	29600000	32200000	29000000
α	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.0858	-0.1044	-0.1186	-0.0834	-0.1028	-0.1019
T_{1/2α}	H	8.08	6.64	5.84	8.31	6.74	6.80

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **γ**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T_{1/2α}**: tiempo medio de declinación

5.4.1.3. Azitromicina pH 5

A pH 5 se mantiene similar comportamiento entre los aislamientos salvajes y la cepa de referencia frente a las diferentes concentraciones de azitromicina. La CIM de azitromicina a pH 5 fue $\geq 64 \mu\text{g/mL}$. A este pH, se presenta a grandes concentraciones (2 y 4 veces la CIM) una mayor acción de la azitromicina frente al *S. aureus*. Lo dicho se puede observar en las Figuras 35 y 36. Sin embargo el aumento de la CIM demuestra una pérdida de potencia antimicrobiana a medida que el pH se va acidificando, ya que para lograr efecto antibacteriano se requiere de grandes concentraciones de azitromicina. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 37 y 38 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (37 A y 38 A). Las curvas en ausencia de azitromicina fueron analizadas por el modelo de Gompertz. En este grupo también se incorporaron las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25 y 0.5 CIM, ya que, como se puede observar en las gráficas, a las mismas continuó el crecimiento bacteriano, aunque podemos notar que de manera más lenta.

Azitromicina - *S.aureus* salvajes (n=6) - pH 6.5

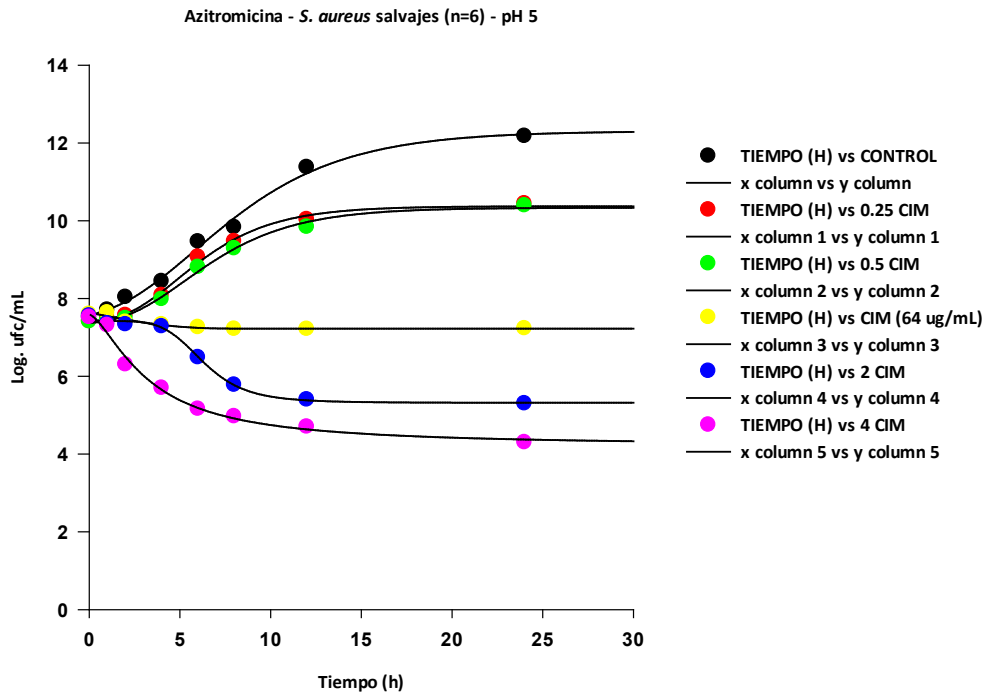


Figura 35. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH a pH 5.

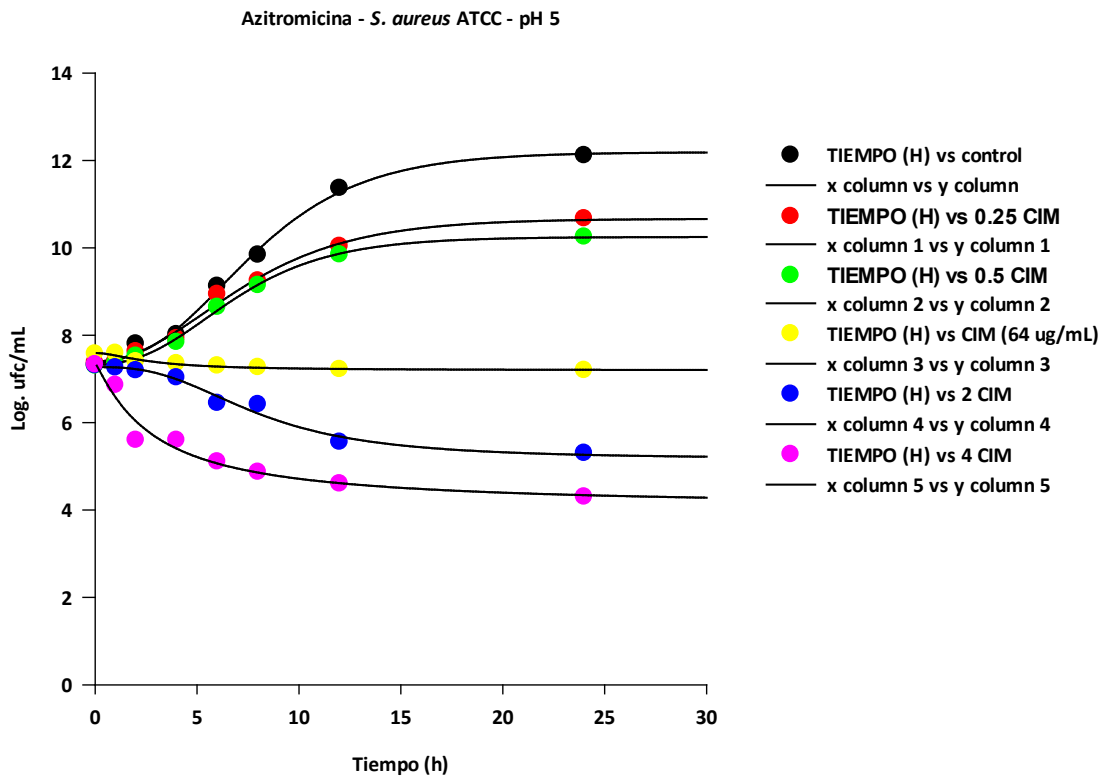


Figura 36. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH a pH 5.

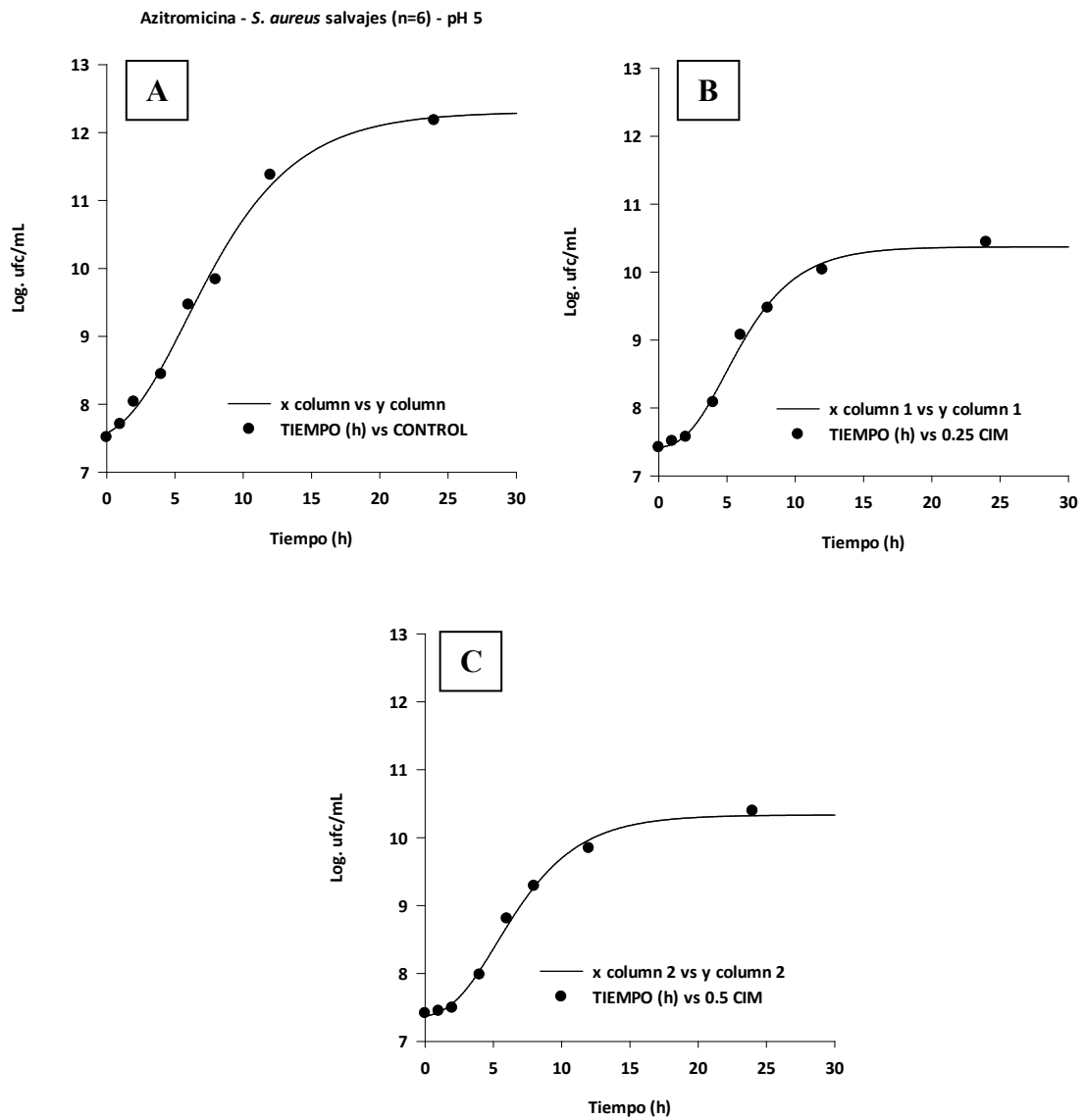


Figura 37. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) a pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (16 µg/mL) a pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (32 µg/mL) a pH 5.

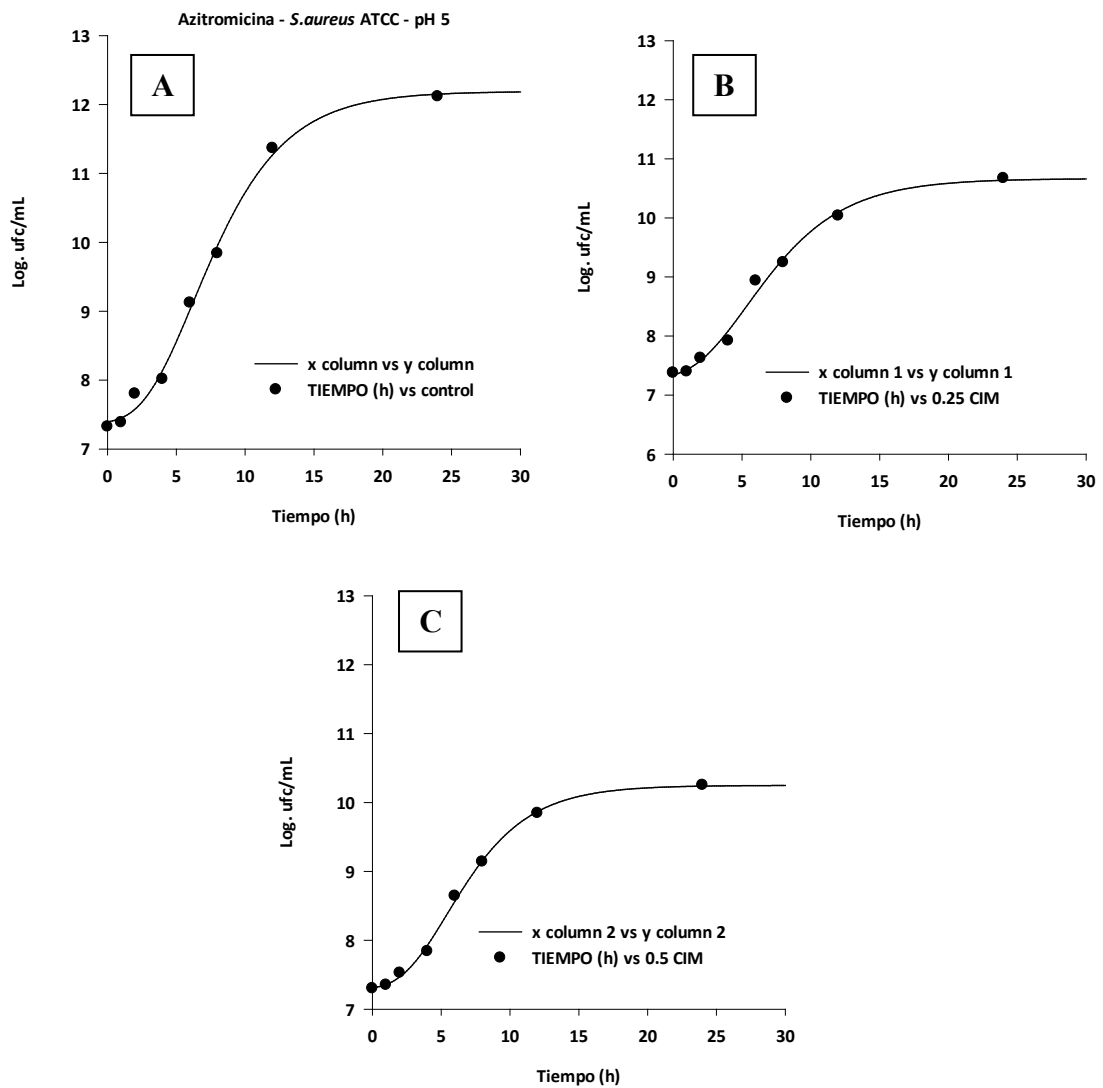


Figura 38. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) a pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (16 µg/mL) a pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de azitromicina (32 µg/mL) a pH 5.

En la Tabla 23 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 23. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 5 frente a concentraciones inferiores a la CIM (64 µg/mL).

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 5			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 - pH 5		
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM	0.5 CIM	control	0.25 CIM	0.5 CIM
R		0.9968	0.9974	0.9977	0.9977	0.9960	0.9991
c	Log ufc/mL	4.86	2.97	2.99	4.82	3.39	2.95
b	h ⁻¹	0.22	0.35	0.30	0.27	0.26	0.30
m	H	5.83	4.87	5.25	6.25	5.39	5.43
a	Log ufc/mL	7.45	7.40	7.35	7.37	7.28	7.29
µ	Log ufc/mL*h	0.40	0.38	0.33	0.48	0.32	0.33
LPD	H	21.70	11.15	14.14	19.45	17.11	14.70
MPD	Log ufc/mL	12.31	10.37	10.33	12.19	10.67	10.25
Kc	h ⁻¹	0.1919	0.1461	0.1286	0.1843	0.1618	0.1322
T½c	H	3.61	4.74	5.39	3.76	4.28	5.24

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **µ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno.

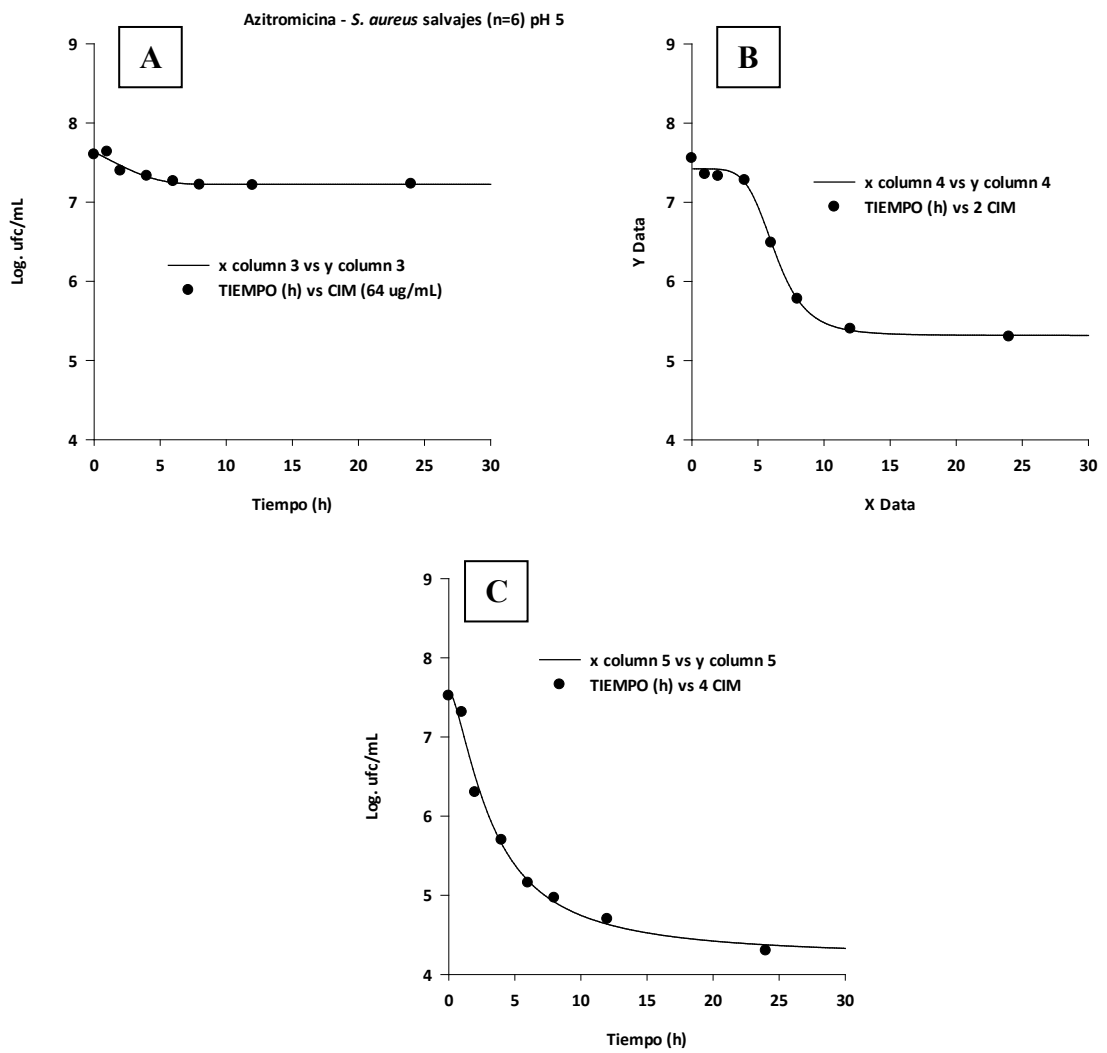


Figura 39. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes a pH 5. A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (64 µg/mL), B: 2x CIM de azitromicina (128 µg/mL), C: 4x CIM de azitromicina (256 µg/mL).

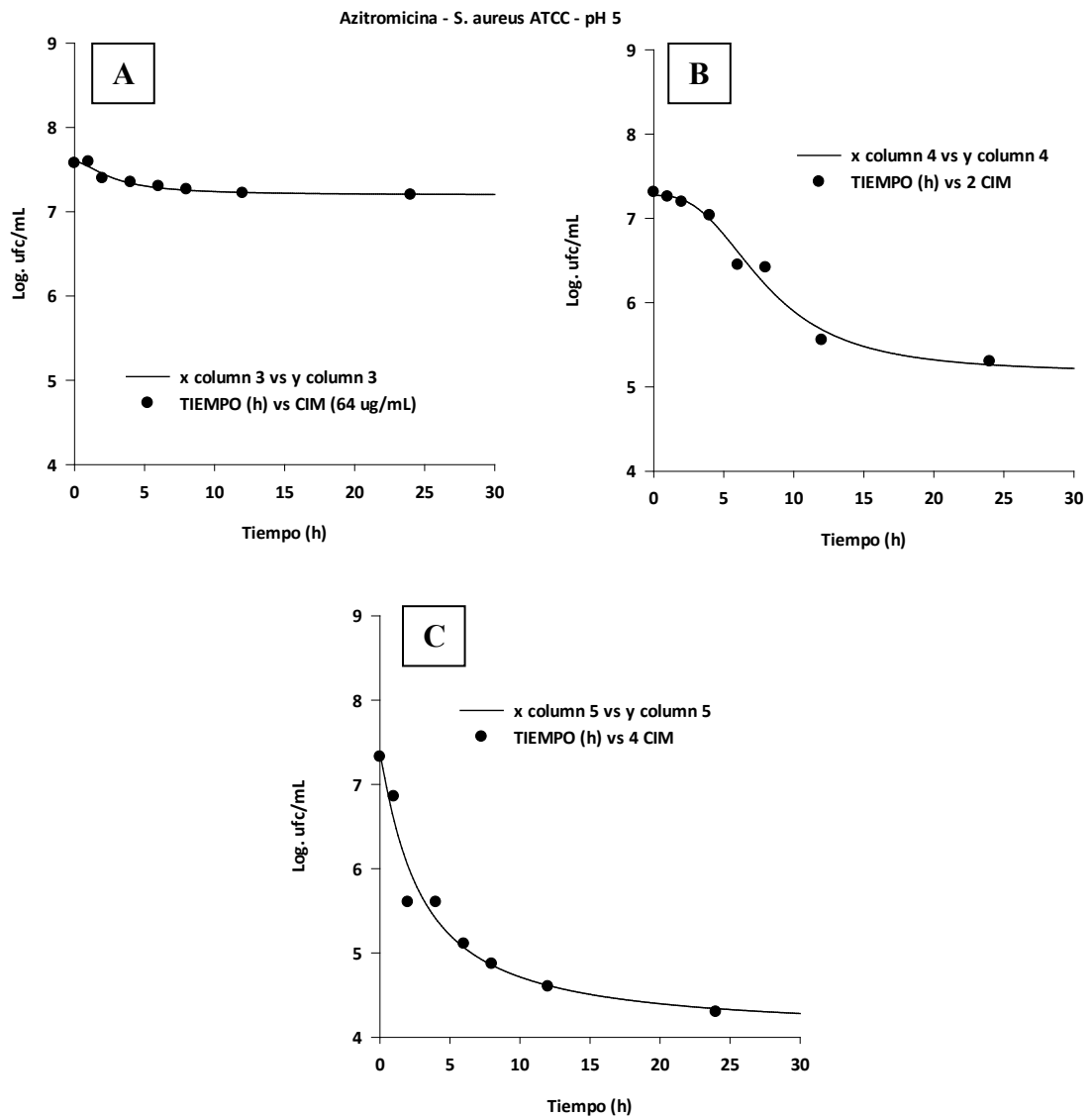


Figura 40. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 a pH 5, A: *S. aureus* frente a 1x CIM de azitromicina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 2x CIM de azitromicina (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 4x CIM de azitromicina (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la Tabla 24 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 24. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH a pH 5 frente a diferentes concentraciones (CIM -64µg/mL-, 2 y 4 veces la CIM) de azitromicina.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo - pH 5			<i>S. aureus</i> ATCC - pH 5		
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM
R		0.9854	0.9566	1.0000	0.9745	0.9916	0.9999
N _{max}	UFC/mL	17000000	200000	20000	15800000	200000	20000
Y		29.29	1.17	4.75	23.14	2.61	5.19
T ₁₅₀	H	1.94	3.16	1.11	1.93	3.92	0.88
N ₀	UFC/mL	39800000	36000000	33200000	37600000	20400000	21200000
<i>α</i>	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.0355	-0.2164	-0.3090	-0.0361	-0.1927	-0.2903
<i>T½α</i>	H	19.52	3.20	2.24	19.20	3.60	2.39

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. ***α***: pendiente de la regresión. ***T½α***: tiempo medio de declinación

5.4.1.4. Efecto de la leche sobre la actividad de Azitromicina

Azitromicina en leche, cuyo pH se encuentra entre 6.5-6.8, comenzó a ejercer cierta actividad frente al *S. aureus* a concentraciones muy bajas (0.25 CIM). Considerando que la CIM en leche fue de 8 µg/mL, a 2 µg/mL presentó cierta inhibición sobre el crecimiento microbiano. En las Figuras 41 y 42 se puede observar claramente este hallazgo. Si bien se evidenció un aumento de la CIM a medida que el pH se vuelve más ácido, la inhibición bacteriana en leche y a grandes concentraciones fue evidente. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 43 y 44 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (43 A y 44 A). Las curvas en ausencia de azitromicina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, como así también las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.125xCIM de azitromicina (1µg/mL), ya que, como se puede observar en las gráficas, a esa concentración no se observó inhibición bacteriana ni tampoco crecimiento, evidenciándose un estado estacionario prolongado.

En las Figuras 45 y 46 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de azitromicina (0.25xCIM, 0.5x CIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM y 8xCIM) en leche bovina, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como las de referencia presentaron similar cinética de muerte.

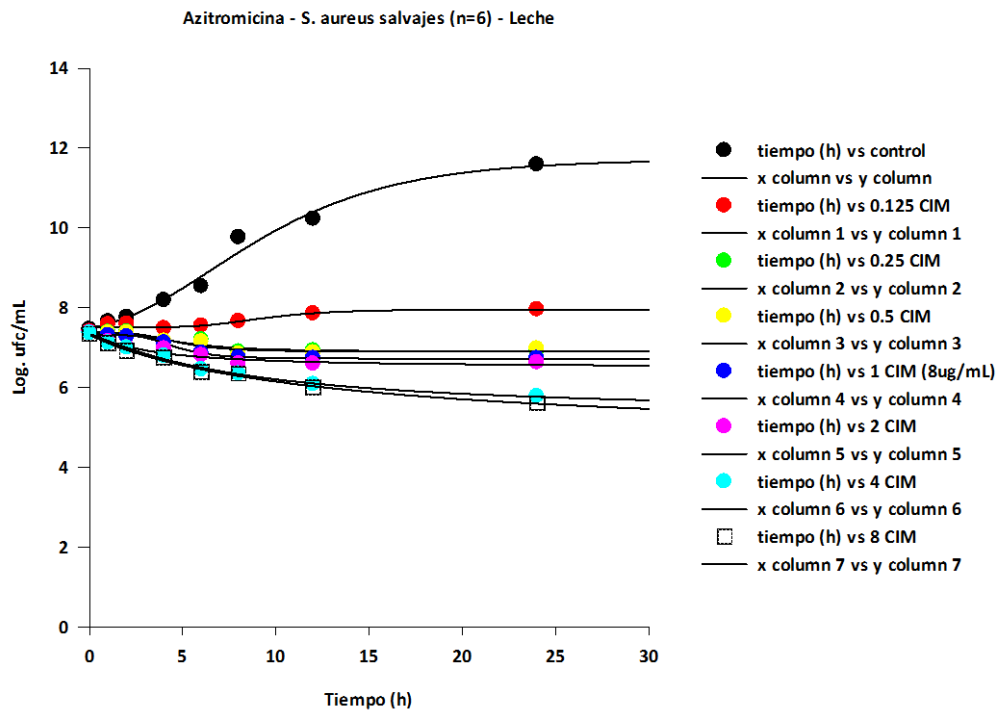


Figura 41. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en leche bovina.

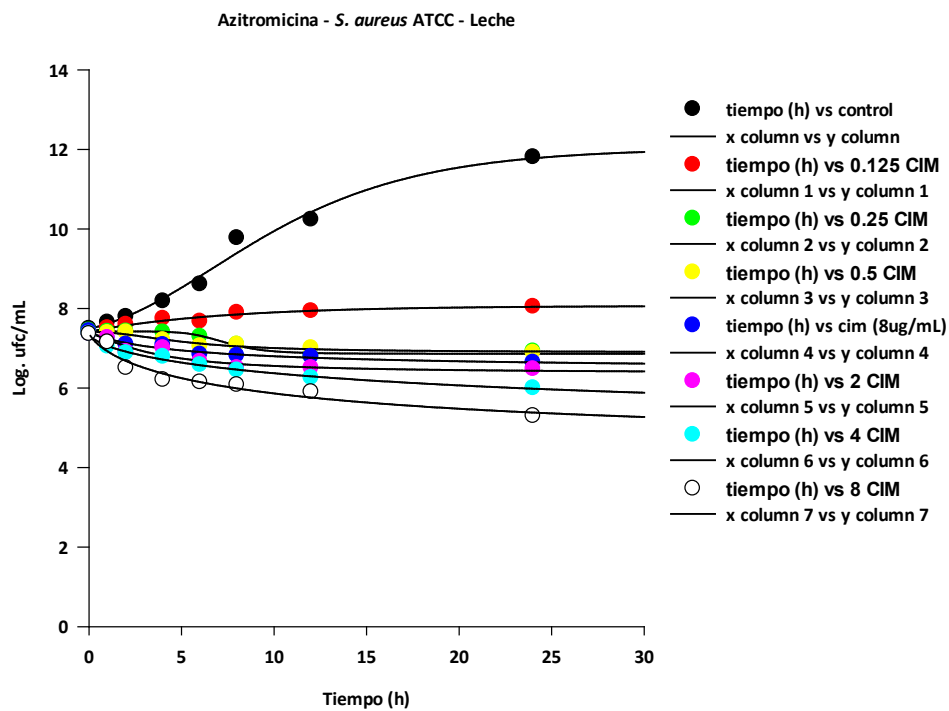


Figura 42. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en leche bovina.

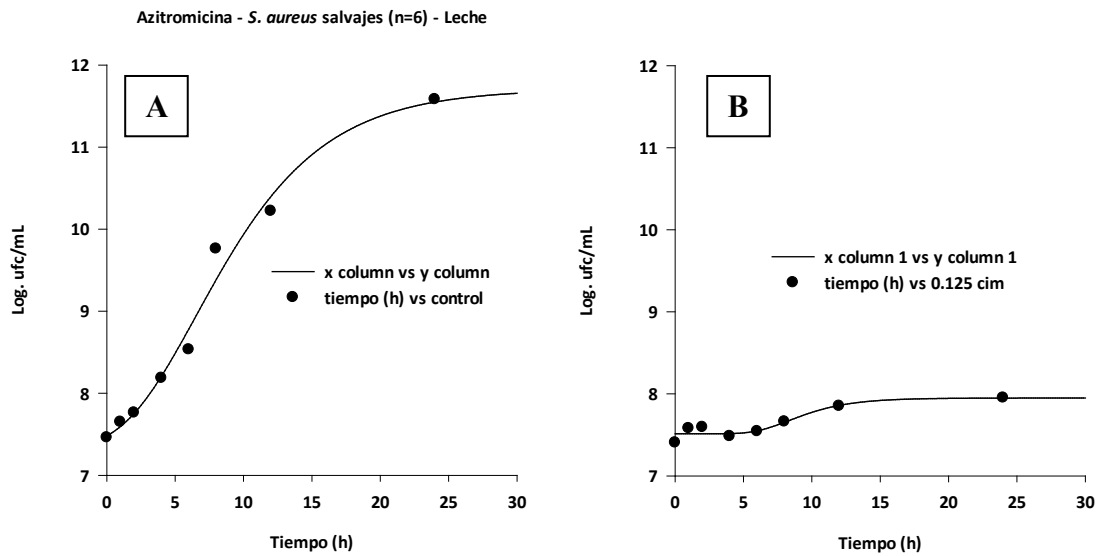


Figura 43. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en leche.

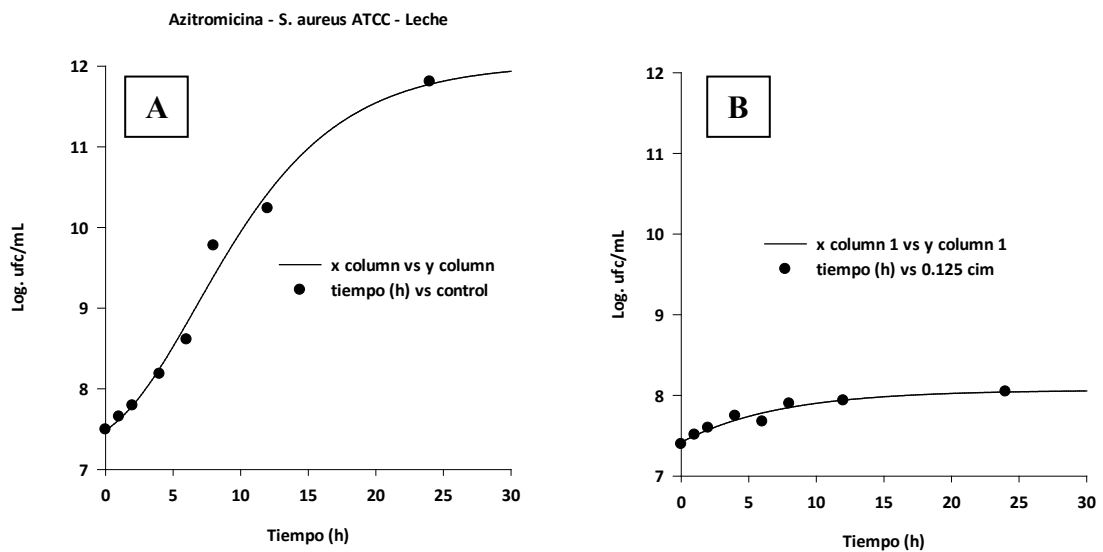


Figura 44. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en leche bovina, B: curva de crecimiento frente a 0.125 CIM de azitromicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 25 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 25. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en leche bovina frente a concentraciones inferiores a la CIM (8 µg/mL).

		<i>S. aureus</i> aislados a campo en LECHE		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 en LECHE	
Parámetros	Unidad	Control	0.125 CIM	control	0.125 CIM
R		0.9921	0.9487	0.9931	0.9741
c	Log ufc/mL	4.37	0.43	4.76	703.86
b	h ⁻¹	0.19	0.40	0.17	0.14
m	H	6.54	8.33	6.71	-50.89
a	Log ufc/mL	7.34	7.51	7.27	-695.79
µ	Log ufc/mL*h	0.30	0.06	0.29	35.58
LPD	H	29.37	18.43	34.03	-377.68
MPD	Log ufc/mL	11.71	7.95	12.03	8.07
Kc	h ⁻¹	0.2675	0.0441	0.3040	0.0440
T½c	H	2.59	15.71	2.28	15.75

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **µ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno.

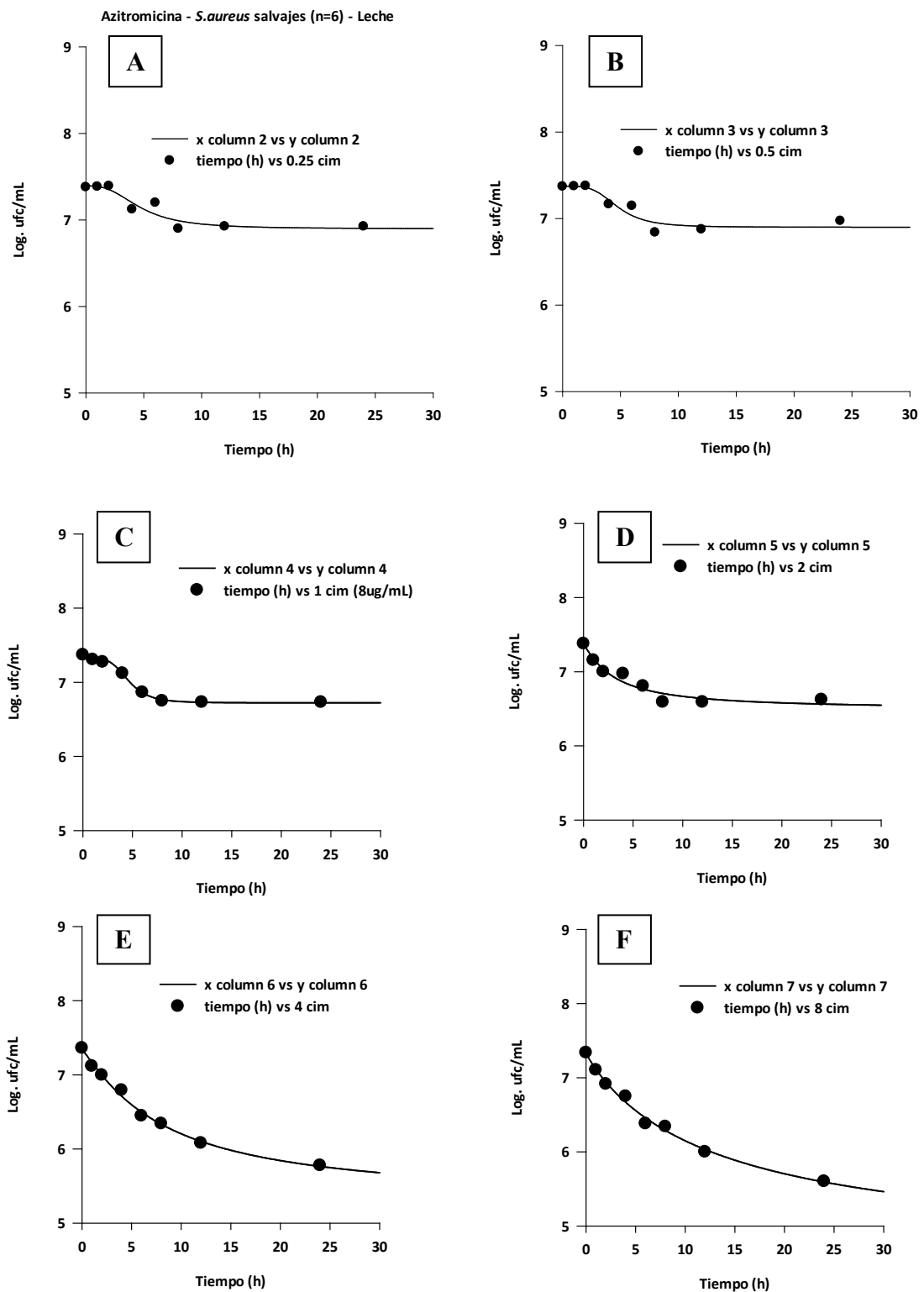


Figura 45. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en leche bovina. A: *S. aureus* frente a 0.25xCIM de azitromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 0.5xCIM de azitromicina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 1xCIM de azitromicina (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 2xCIM de azitromicina (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), E: 4xCIM de azitromicina (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y F: 8xCIM de azitromicina (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Azitromicina - *S. aureus* ATCC - Leche

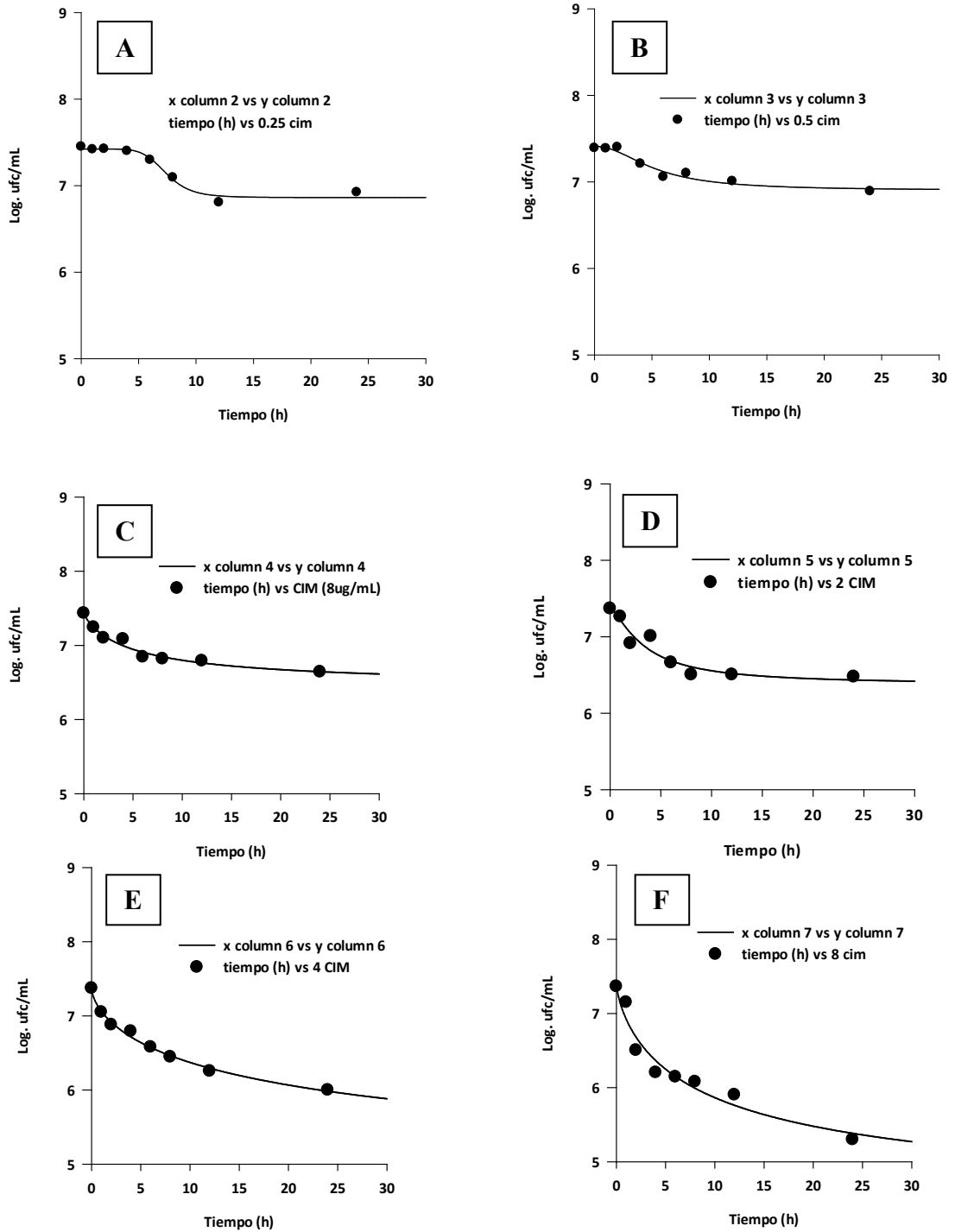


Figura 46. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213, en leche bovina. A: *S. aureus* frente a 0.25xCIM de azitromicina (2 µg/mL), B: 0.5xCIM de azitromicina (4 µg/mL), C: 1xCIM de azitromicina (8 µg/mL), D: 2xCIM de azitromicina (16 µg/mL), E: 4xCIM de azitromicina (32 µg/mL) y F: 8xCIM de azitromicina (64 µg/mL).

En la Tabla 26 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 26. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en leche bovina frente a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, CIM -8µg/mL-, 2, 4 y 8 veces la CIM) de azitromicina

		<i>S. aureus</i> aislados a campo en LECHE						<i>S. aureus</i> ATCC en LECHE					
Parám.	Unidad	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM
R		0.9566	0.9727	0.9915	0.9896	0.9974	0.9982	0.9943	0.9849	0.9905	0.9687	0.9984	0.999
Nmax	UFC/mL	8400000	9400000	5400000	4200000	600000	400000	8400000	7800000	4400000	3000000	1000000	200000
Y		2.98	3.60	2.76	0.95	1.02	1.09	5.80	3.99	0.87	1.59	0.71	3.63
T150	h	3.85	3.99	3.60	1.27	1.58	1.43	6.61	3.84	1.66	1.59	1.04	1.11
N ₀	UFC/mL	23900000	23400000	23400000	23900000	23000000	21800000	28200000	24600000	27200000	23400000	23600000	23200000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.0476	-0.0380	-0.0611	-0.0725	-0.1520	-0.1666	-0.0505	-0.0479	-0.0759	-0.0856	-0.1317	-0.1981
T½α	h	15.89	18.24	11.34	9.56	4.56	4.16	13.72	14.47	9.13	8.10	5.26	3.50

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión, **T½α**: tiempo medio de declinación.

5.4.1.5. Efecto del suero sobre la actividad de Azitromicina

Azitromicina en suero, cuyo pH es 7.4, comenzó a ejercer actividad frente al *S. aureus* a concentraciones del orden de 0.5 CIM. La CIM de azitromicina para *S. aureus* cuando el CMH fue suplementado con 40% de suero bovino fue de 2 µg/mL, pero a 1 µg/mL presentó inhibición sobre el crecimiento microbiano. En las Figuras 47 y 48 se puede observar claramente este hallazgo. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 49 y 50 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (49 A y 50 A). Las curvas en ausencia de azitromicina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, como así también las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25xCIM de azitromicina (0.5 µg/mL), ya que, como se puede observar en las gráficas, a 0.25 CIM continuó el crecimiento bacteriano, aunque de manera mucho más lenta en comparación a la curva control sin azitromicina.

En las Figuras 51 y 52 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de azitromicina (0.5xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM y 16xCIM) en CMH suplementado con 40 % de suero bovino, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

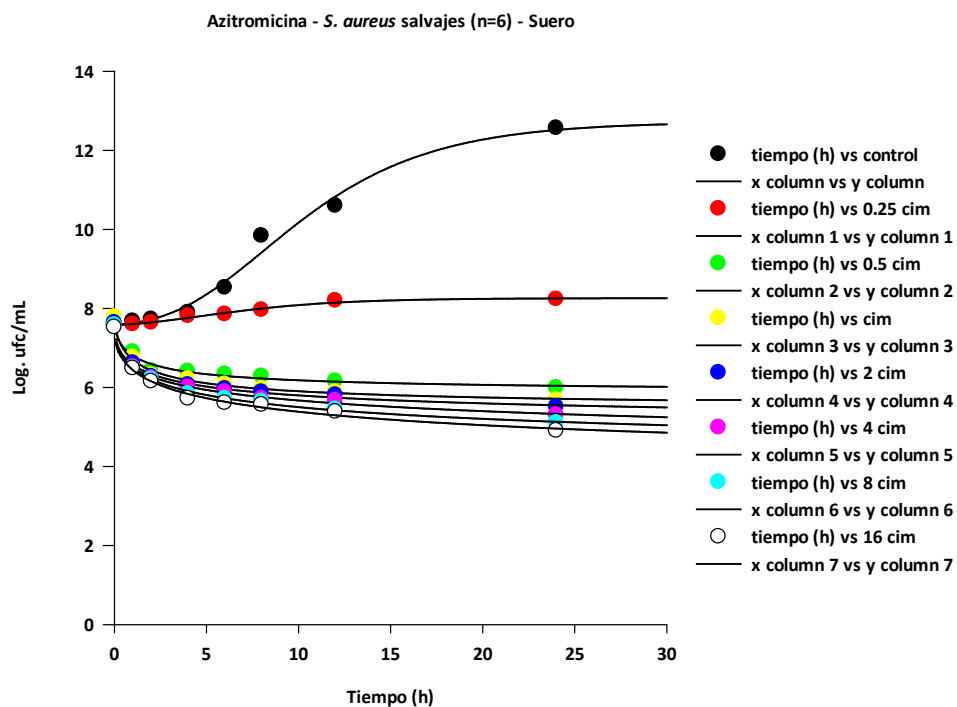


Figura 47. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Azitromicina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

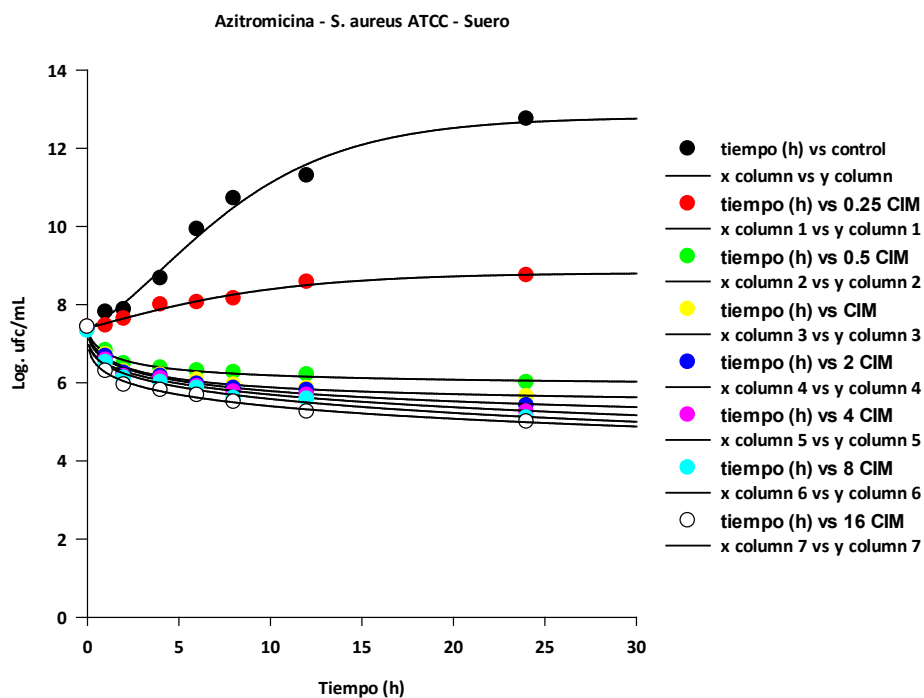


Figura 48. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Azitromicina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

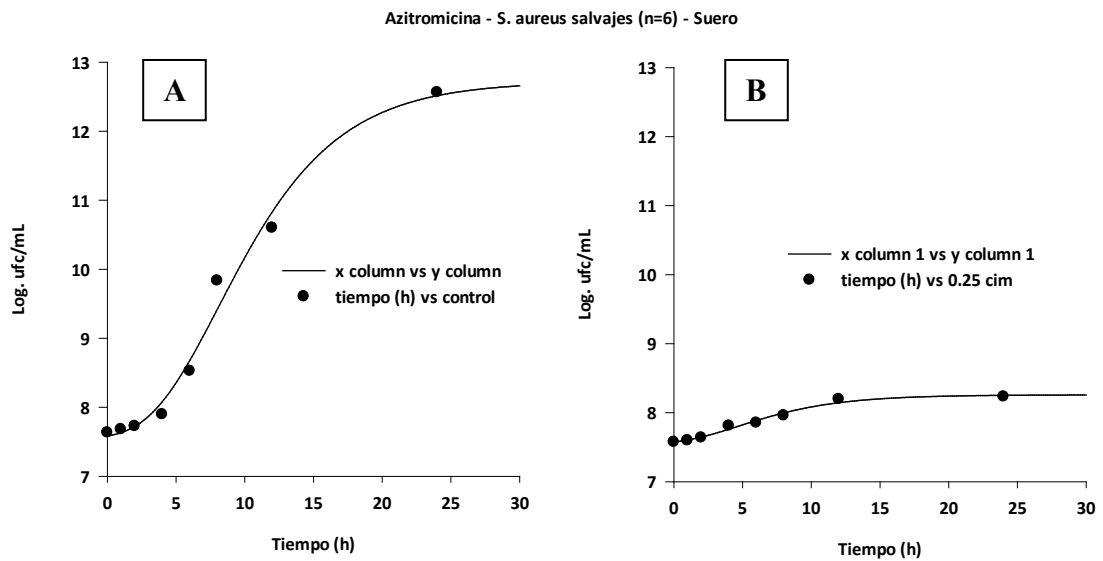


Figura 49. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CMH suplementado con suero bovino.

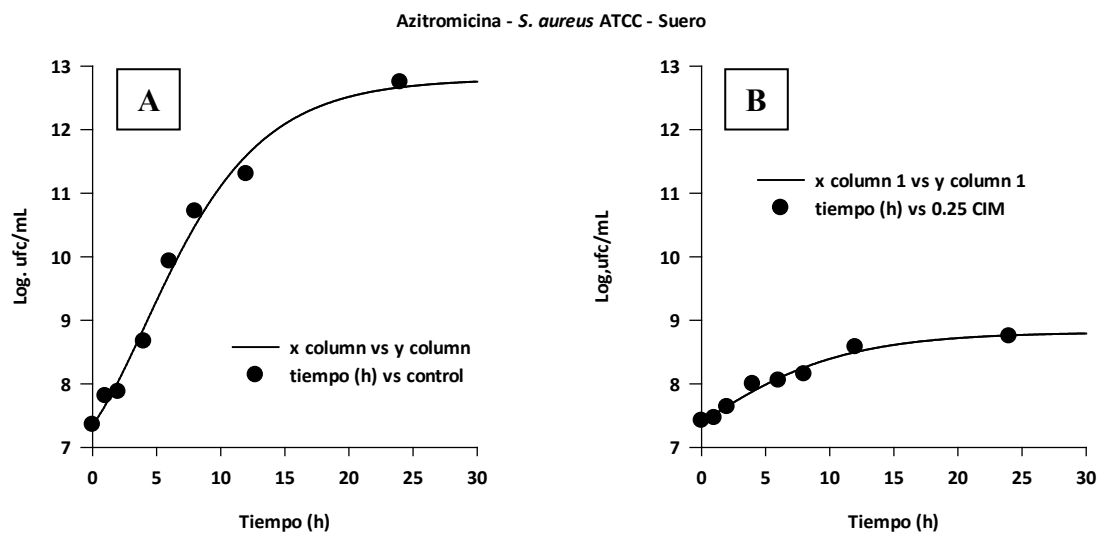


Figura 50. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin azitromicina) en CMH suplementado con suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de azitromicina (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 27 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 27. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con suero bovino frente a concentraciones inferiores a la CIM (2 µg/mL).

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH/SUERO		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH/SUERO	
Parámetros	Unidad	Control	0.25 CIM	control	0.25 CIM
R		0.9935	0.9915	0.9948	0.9892
c	Log ufc/mL	5.17	0.71	6.13	2.14
b	h ⁻¹	0.20	0.24	0.19	0.16
m	h	8.09	4.73	4.10	0.50
a	Log ufc/mL	7.55	7.54	6.66	6.67
µ	Log ufc/mL*h	0.38	0.06	0.43	0.13
LPD	h	35.22	15.48	16.13	-3.09
MPD	Log ufc/mL	12.72	8.26	12.80	8.81
Kc	h ⁻¹	0.3795	0.0508	0.2843	0.0832
T½c	h	1.83	13.64	2.44	8.33

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **µ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno.

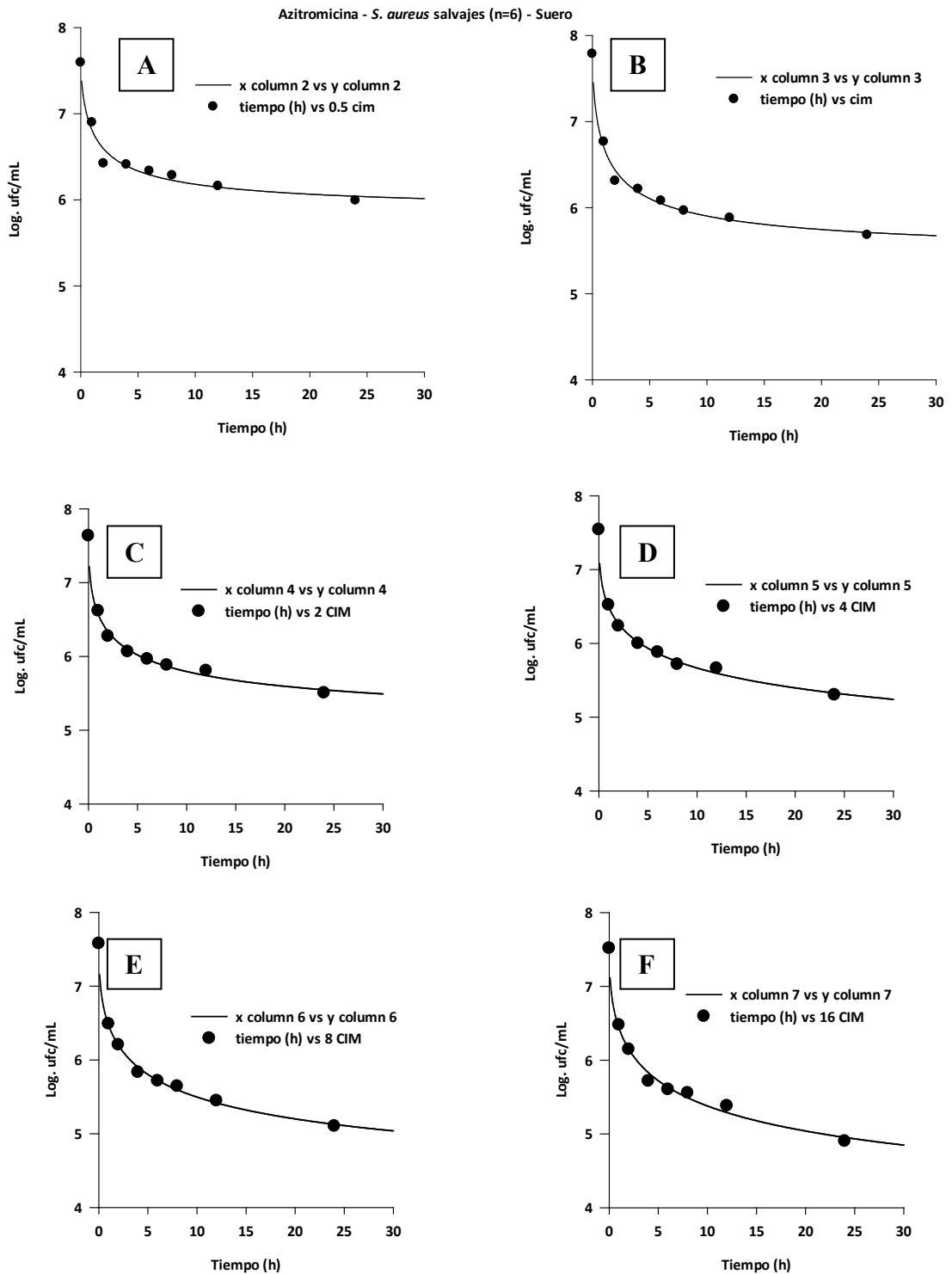


Figura 51. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de azitromicina (1 µg/mL), B: 1xCIM de azitromicina (2 µg/mL), C: 2xCIM de azitromicina (4 µg/mL), D: 4xCIM de azitromicina (8 µg/mL), E: 8xCIM de azitromicina (16 µg/mL) y F: 16xCIM de azitromicina (32 µg/mL).

Azitromicina - *S. aureus* ATCC - Suero

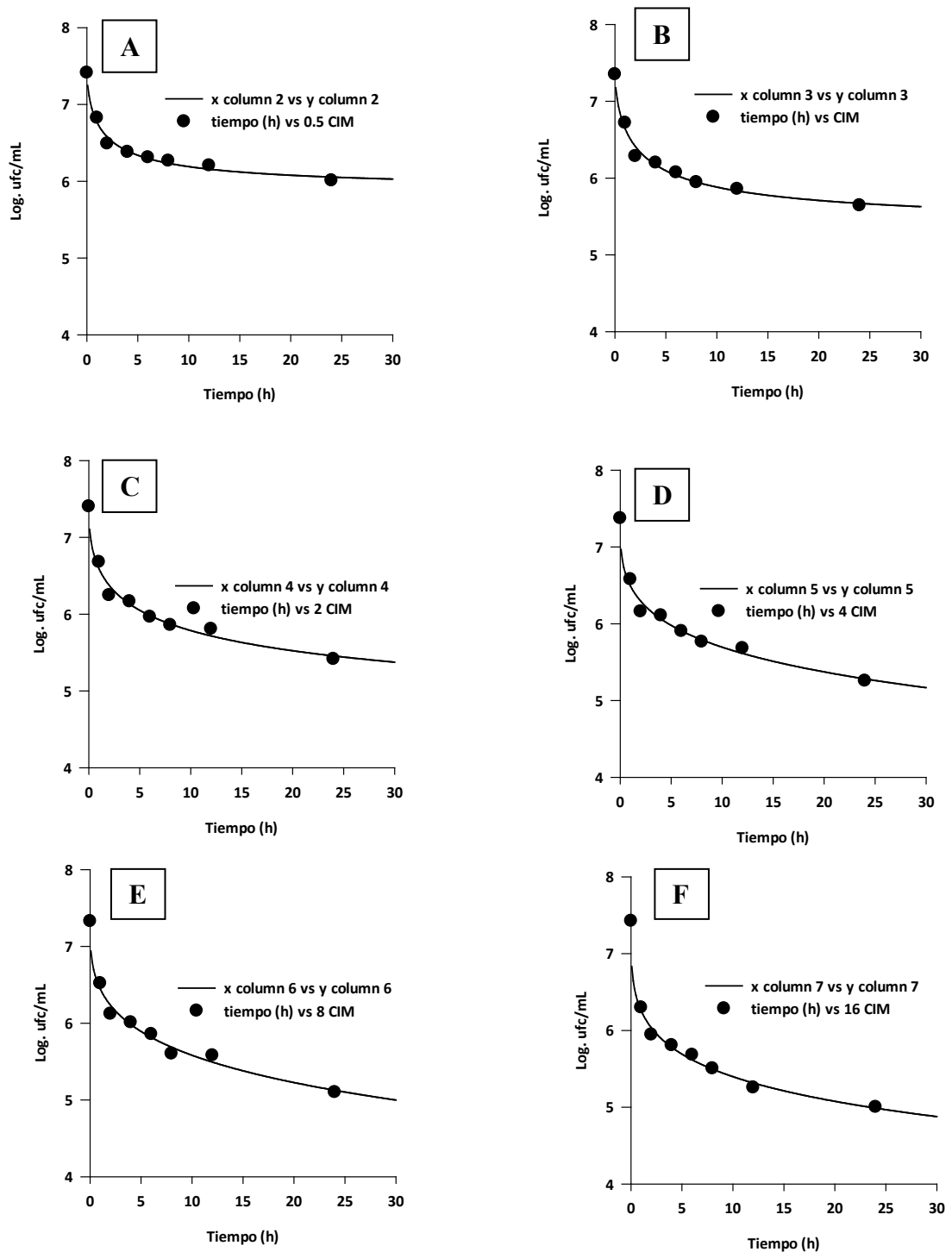


Figura 52. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de azitromicina (1 µg/mL), B: 1xCIM de azitromicina (2 µg/mL), C: 2xCIM de azitromicina (4 µg/mL), D: 4xCIM de azitromicina (8 µg/mL), E: 8xCIM de azitromicina (16 µg/mL) y F: 16xCIM de azitromicina (32 µg/mL).

En la Tabla 28 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 28. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con suero bovino frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -2 µg/mL-, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de azitromicina

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH/SUERO						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH/SUERO					
Parámetros	Unidad	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9995	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9995	0.9995	0.9996	0.9997	0.9998	1.0000
N _{max}	UFC/mL	980000	480000	320000	200000	80000	20000	1020000	440000	260000	180000	100000	20000
Y		2.49	1.74	1.28	0.99	1.04	1.22	1.59	1.79	1.58	1.36	1.27	0.93
T ₁₅₀	H	0.52	0.25	0.16	0.10	0.09	0.15	0.44	0.47	0.37	0.27	0.25	0.07
N ₀	UFC/mL	39200000	60800000	43200000	34800000	37800000	32800000	25800000	22400000	25200000	23600000	21200000	26600000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1537	-0.2018	-0.2044	-0.2150	-0.2566	-0.3085	-0.1346	-0.1638	-0.1906	-0.2032	-0.2232	-0.2998
T½ α	h	4.51	3.43	3.39	3.22	2.70	2.25	5.15	4.23	3.64	3.41	3.10	2.31

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α** : pendiente de la regresión, **T½ α** : tiempo medio de declinación.

5.4.2. DANOFLOXACINA

Las Figuras 53 a 82 presentan las curvas de muerte bacteriana obtenidas para los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de bovinos portadores de mastitis subclínica (promedio de seis cepas salvajes), como así también de la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs de danofloxacina en CMH pH 7.4, 6.5 y 5.0; en leche y suero bovino.

5.4.2.1. Danofloxacina a pH 7.4

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de danofloxacina a pH 7.4, aunque la cepa de referencia se mostró ligeramente más sensible a altas concentraciones del antimicrobiano. La CIM de danofloxacina a pH 7.4 fue 0.5 -1 µg/mL, obsérvese en las Figuras 53 y 54 que su actividad frente a *S. aureus* se vio aumentada sustancialmente al aumentar las concentraciones, demostrando su concentración dependencia. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 55 y 56 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (55 A y 56 A). Las curvas en ausencia de danofloxacina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, como así también las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.125 CIM, ya que a esa concentración continuó un leve crecimiento bacteriano.

En las Figuras 57 y 58 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacina (0.5xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM y 16xCIM) a pH 7.4, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todos los casos, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte, siendo el *S. aureus* ATCC 29213 más sensible a altas concentraciones que las cepas salvajes.

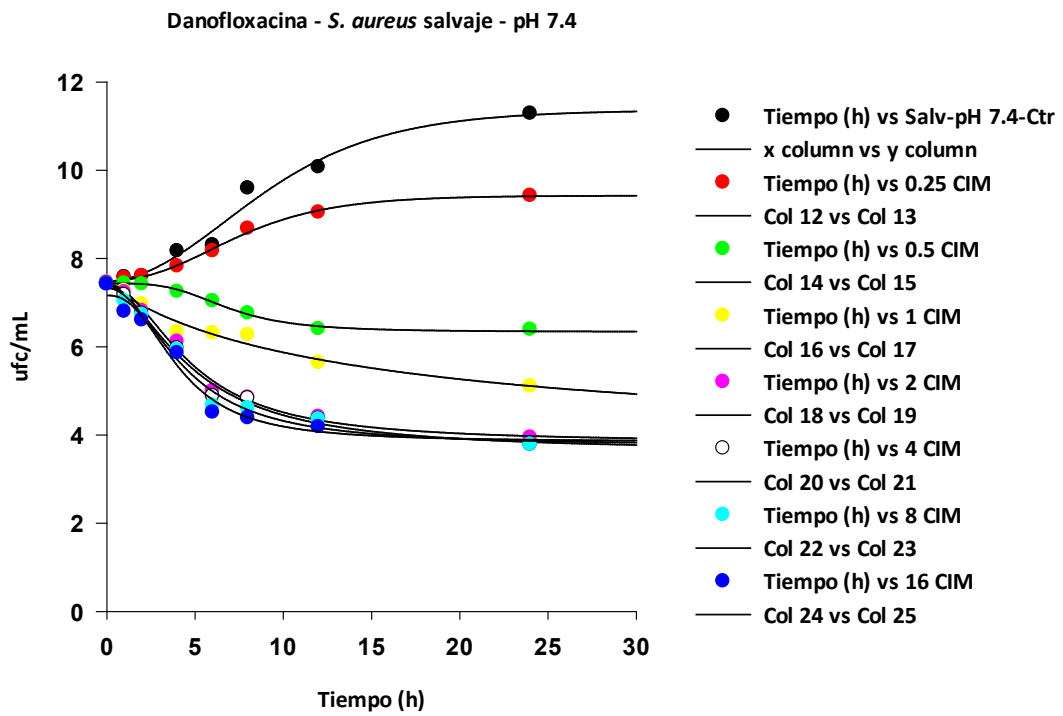


Figura 53. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacin en CMH pH 7.4.

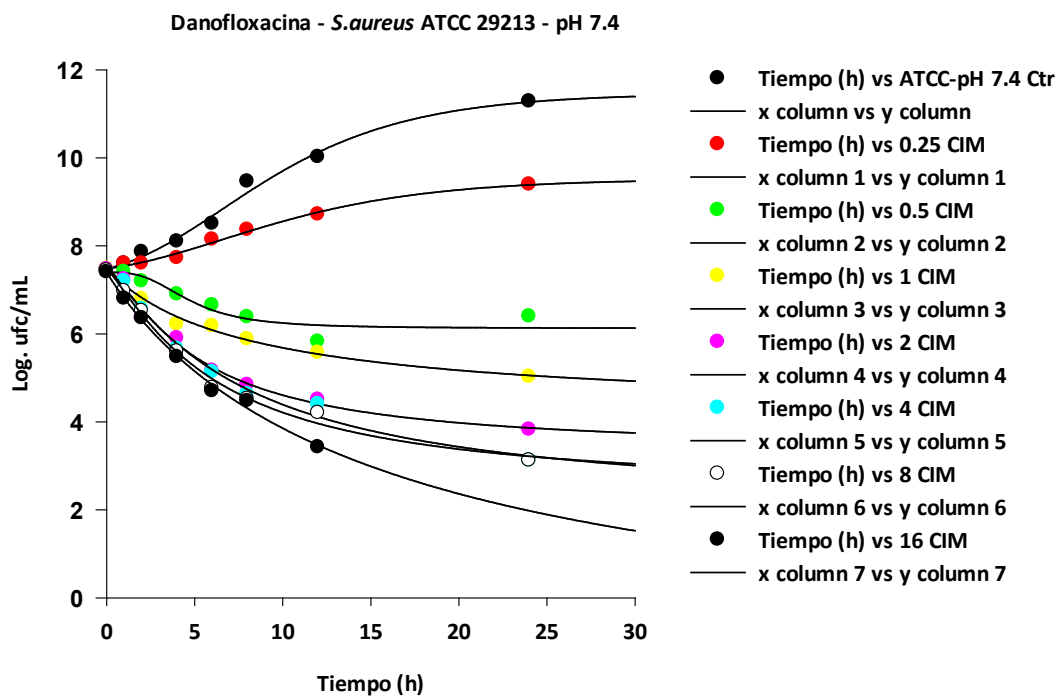


Figura 54. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacin en CMH pH 7.4.

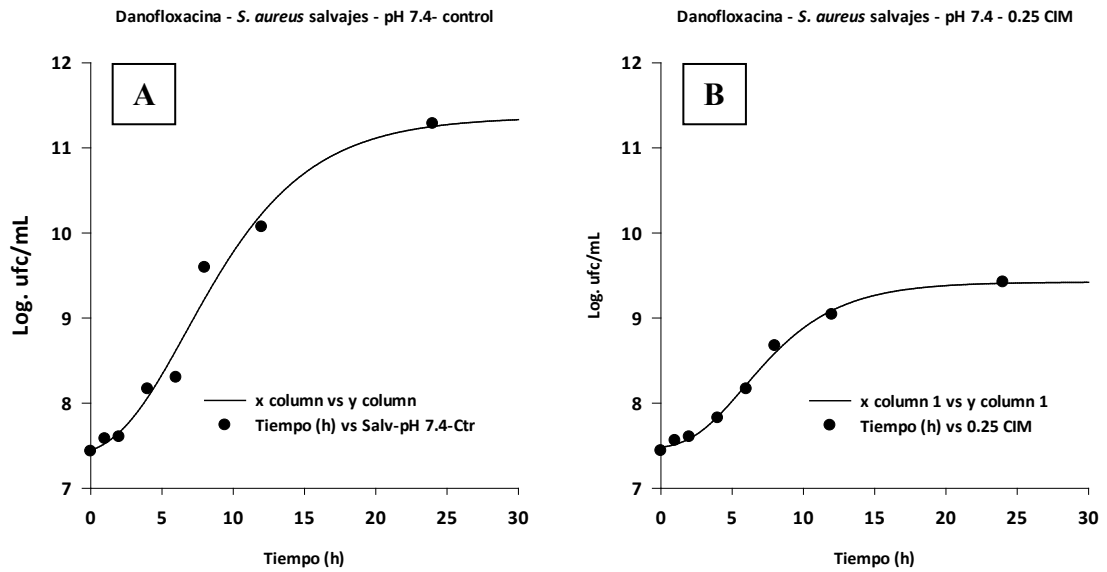


Figura 55. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH pH 7.4.

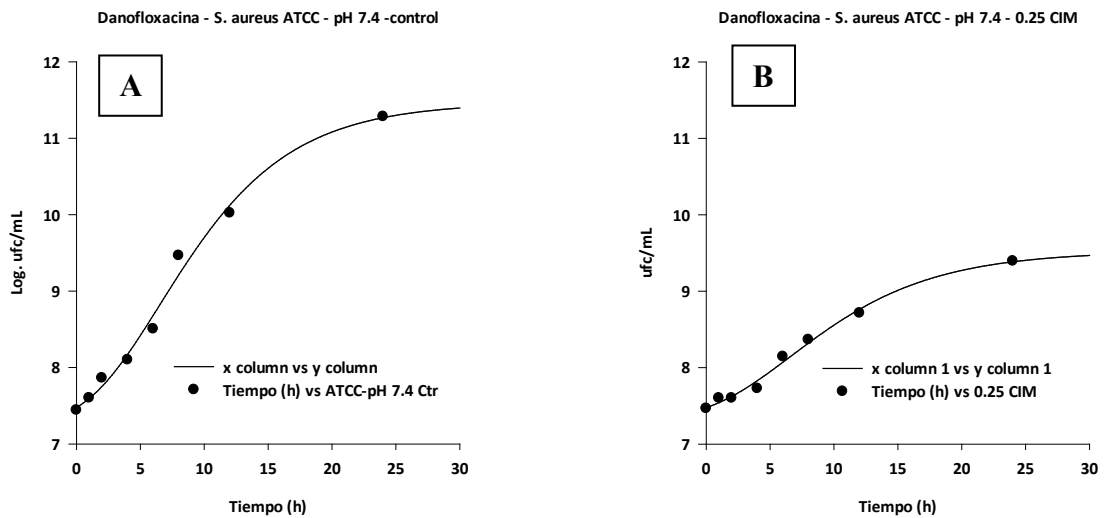


Figura 56. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 29 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 29. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus*, en CMH pH 7.4 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM (0.25 µg/mL).

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH pH 7.4		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 7.4	
Parámetros	Unidad	Control	0.25 CIM	control	0.25 CIM
R		0.9898	0.9978	0.9951	0.9961
c	Log ufc/mL	3.99	1.96	4.17	2.17
b	h ⁻¹	0.21	0.27	0.17	0.16
m	H	6.69	5.84	6.55	6.61
a	Log ufc/mL	7.37	7.47	7.29	7.35
µ	Log ufc/mL*h	0.31	0.19	0.26	0.13
LPD	H	27.10	17.93	32.65	35.06
MPD	Log ufc/mL	11.36	9.43	11.46	9.52
Kc	h ⁻¹	0.2434	0.1174	0.2525	0.1492
T½c	H	2.85	5.90	2.74	4.64

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **µ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

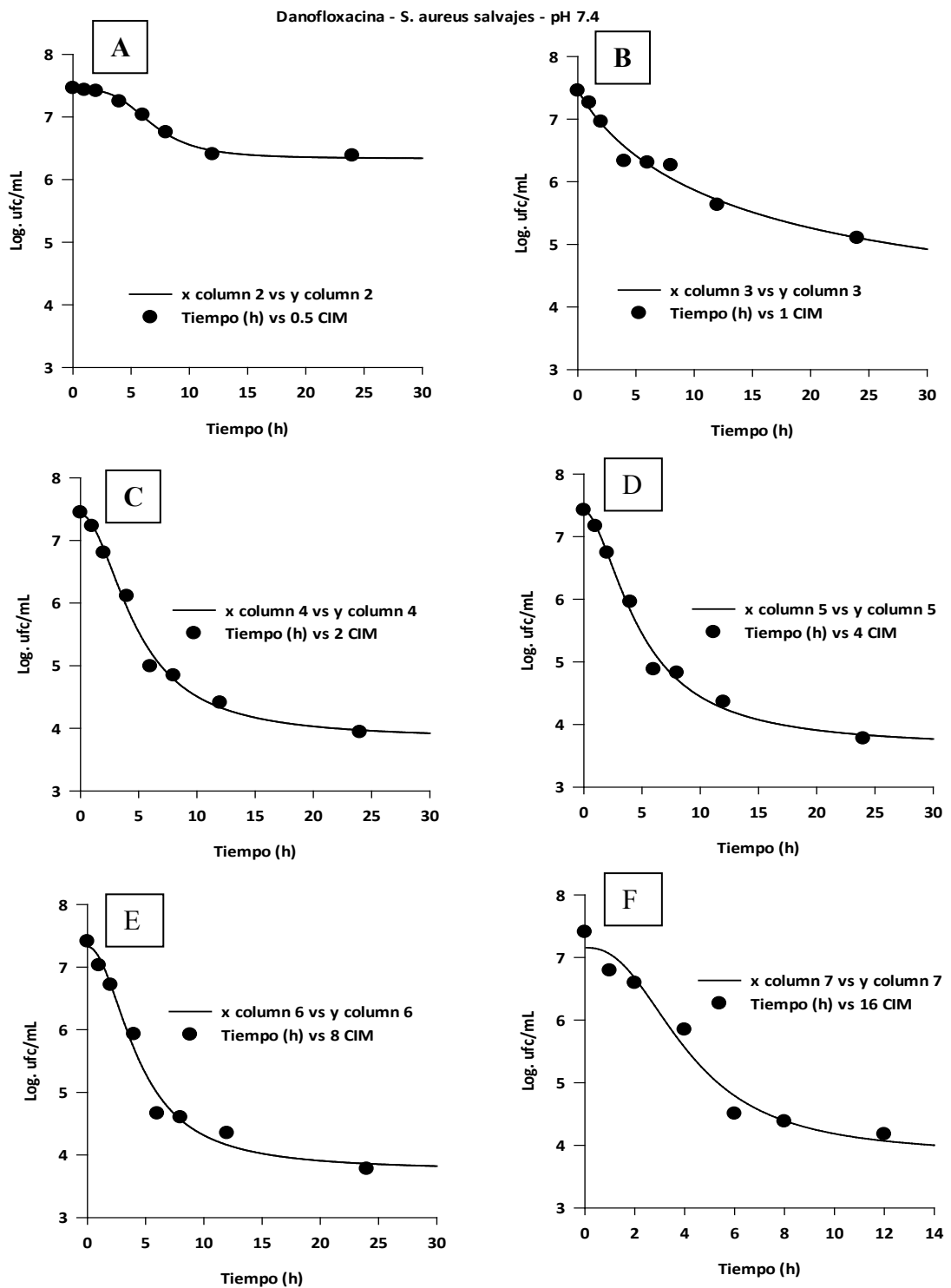


Figura 57. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacin (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacin (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacin (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacin (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacin (16 µg/mL).

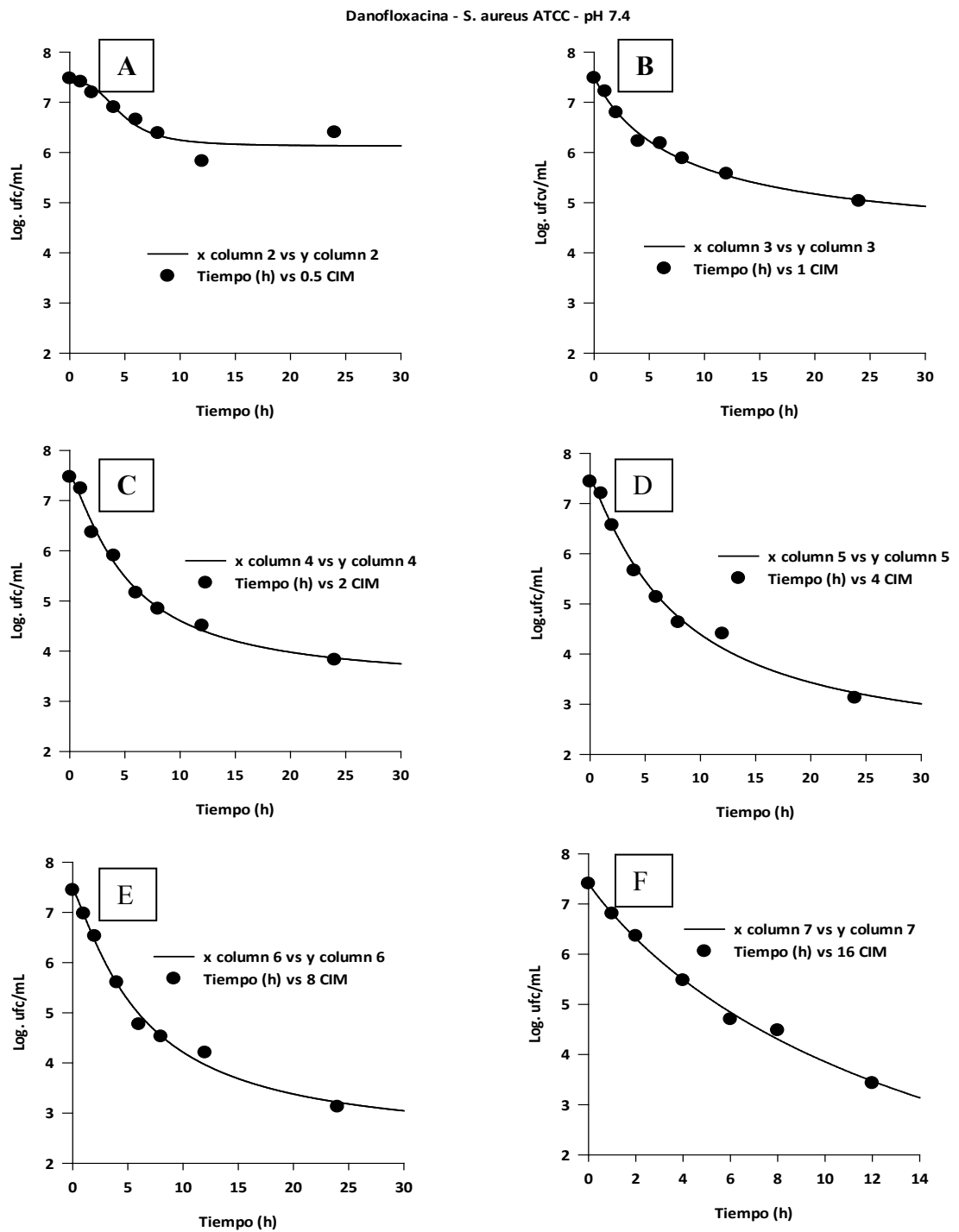


Figura 58. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (16 µg/mL).

En la Tabla 30 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 30. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -1 µg/mL-, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - pH 7.4						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – pH 7.4					
Par.	Unidad	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9984	0.9988	0.9999	0.9998	0.9991	0.9987	0.9973	0.9988	0.9998	1.0000	0.9998	0.9999
N _{max}	UFC/mL	2416666	126666	8666	6000	6000	0	2506666	106666	6666	1333	1333	0
Y		2.94	2.05	2.40	2.29	1.68	1.16	2.14	2.22	4.12	3.16	1.97	1.82
T ₁₅₀	H	4.66	1.33	1.21	1.12	0.85	0.43	2.11	1.06	1.09	1.11	0.72	0.56
N ₀	UFC/mL	28953333	28446666	27940000	26566666	25750000	25533333	29626666	30480000	29360000	27240000	27640000	25440000
α	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1035	-0.2256	-0.3367	-0.3499	-0.3486	-0.6200	-0.1029	-0.2357	-0.3497	-0.4136	-0.4142	-0.7637
T _{1/2} α	H	6.70	3.07	2.06	1.98	1.99	1.12	6.73	2.94	1.98	1.68	1.67	0.91

Modelo Sigmoidal. N_0 : concentración del inóculo inicial (10^6 UFC/mL), N_{max} : población bacteriana final, T_{150} : tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, Y : coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. α : pendiente de la regresión, $T_{1/2}\alpha$: tiempo medio de declinación.

El modelo sigmoideal demuestra que a concentraciones mayores a 0.5XCIM, el TI50 va descendiendo, conforme aumenta la concentración, lo cual es lógico, ya que al ser un ATB, concentración dependiente, el tiempo en que tarda en exhibir un efecto bactericida, será menor a mayores concentraciones. A este pH, el TI50 es de 0.43 a 0.56 h a 16XCIM, mientras que a 4XCIM es de 1.12-1.11 h. Esto mismo queda corroborado con el análisis por regresión lineal que arroja una semivida de declinación mucho más corta a mayores concentraciones.

5.4.2.2. Danofloxacin pH 6.5

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron, nuevamente, un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de danofloxacin, pero en este caso a pH 6.5. La CIM en pH 6.5 fue de 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en las Figuras 59 y 60 se puede corroborar su acción dependiente de la concentración, ya que su actividad frente a *S. aureus* aumenta notablemente al aumentar las concentraciones. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 61 y 62 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (Figuras 61 A y 62 A). Las curvas en ausencia de danofloxacin fueron analizadas por el modelo de Gompertz, conjuntamente con las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25 y 0.5 CIM, debido a que, como se observa en las gráficas, frente a esas concentraciones continuó el crecimiento bacteriano. Sin embargo no ocurrió lo mismo con el *S. aureus* ATCC de referencia, ya que se mostró más sensible y a 0.5CIM existió muerte bacteriana (Figura 62 B).

En las Figuras 63 y 64 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacin a pH 6.5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

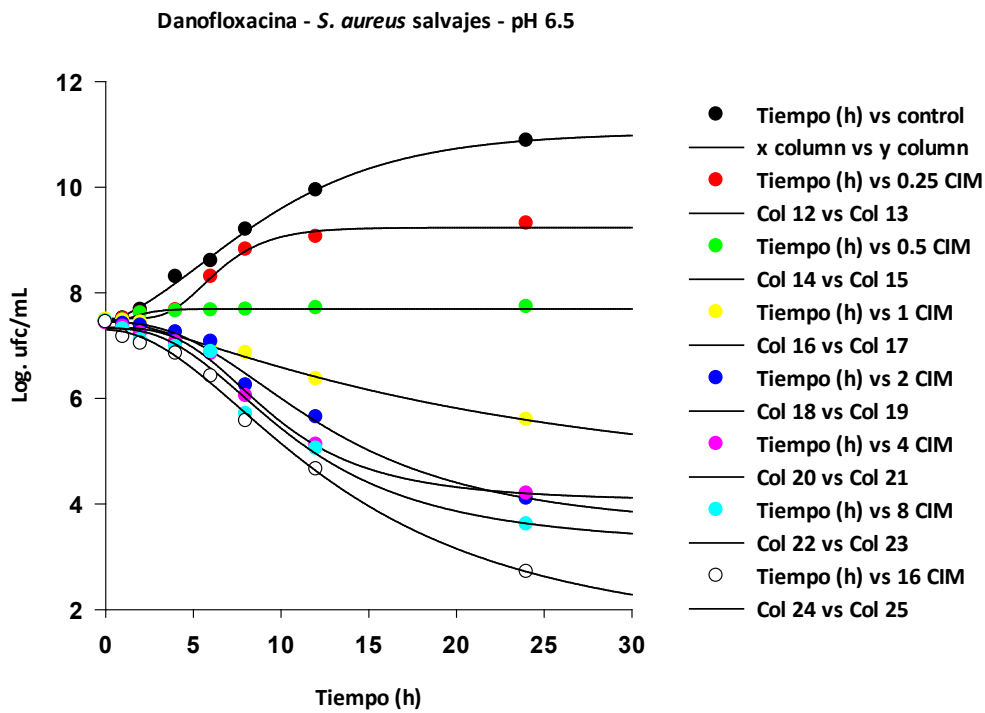


Figura 59. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacin en CMH pH 6.5.

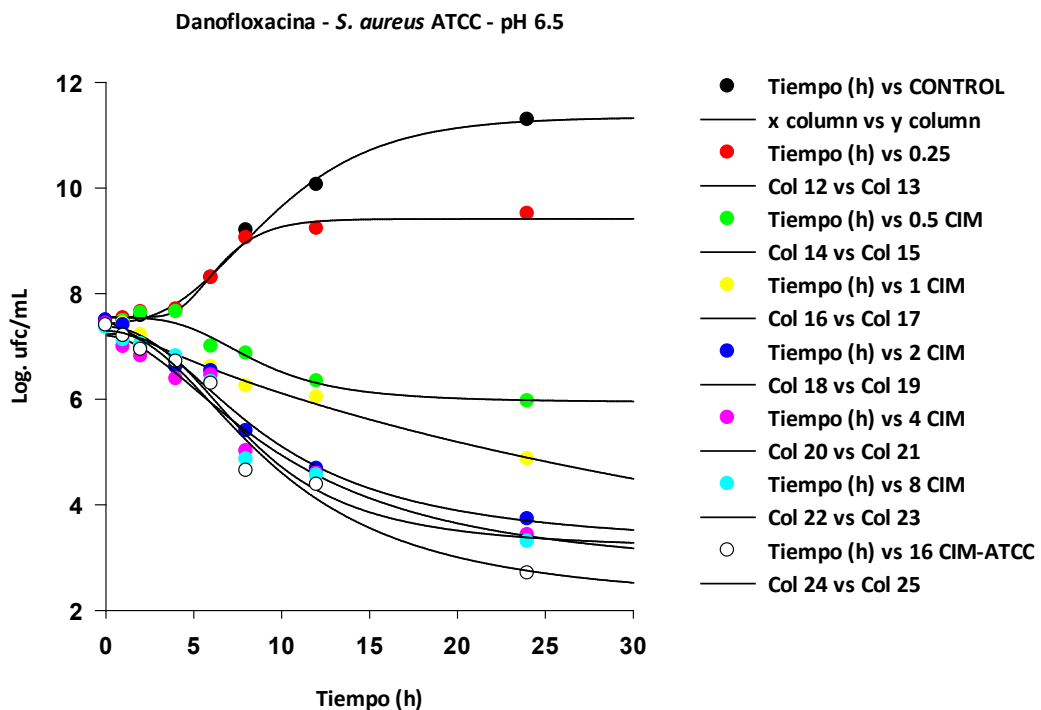


Figura 60. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacin en CMH pH 6.5.

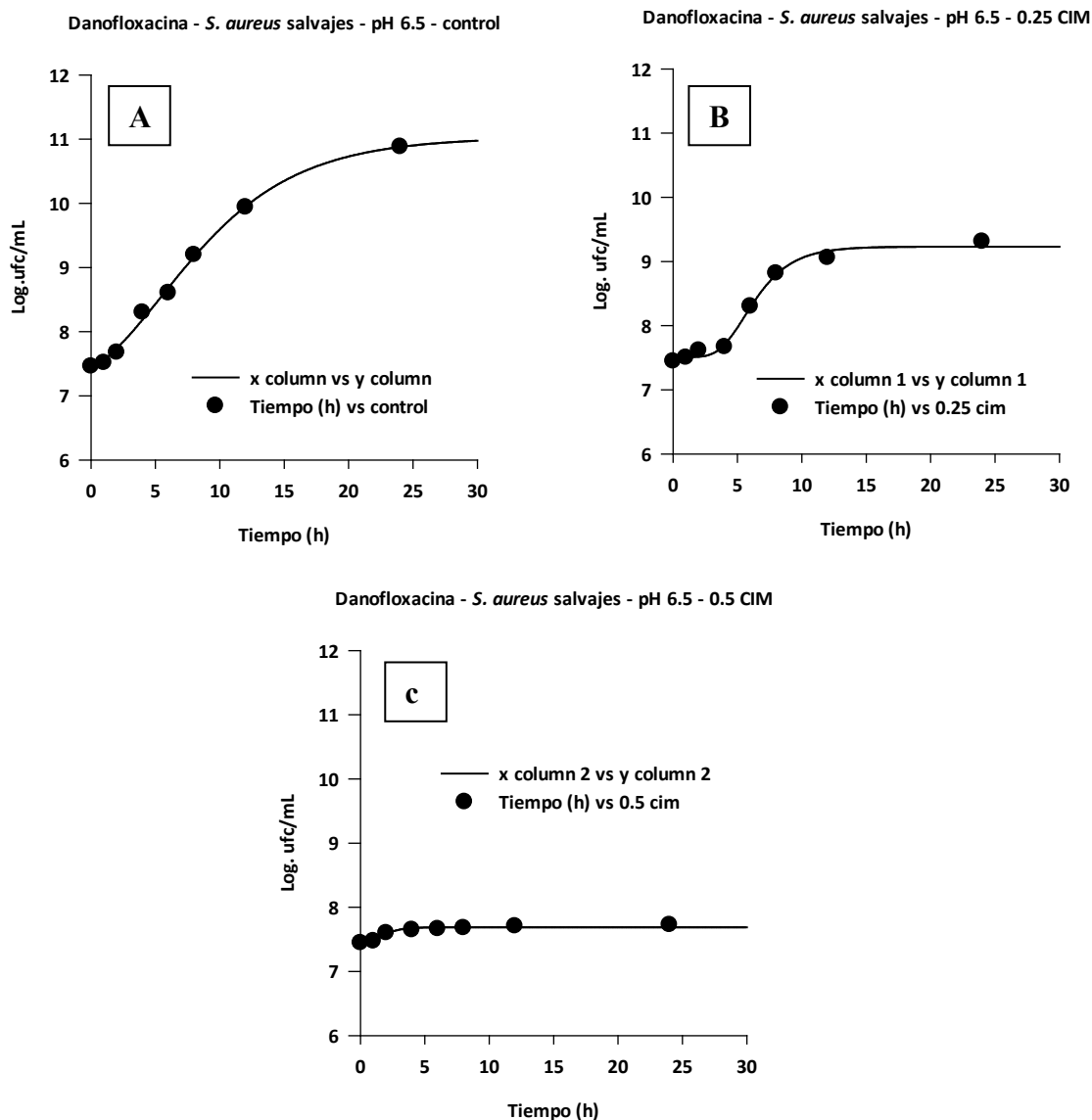


Figura 61. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacin) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacin (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CMH pH 6.5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CMH pH 6.5.

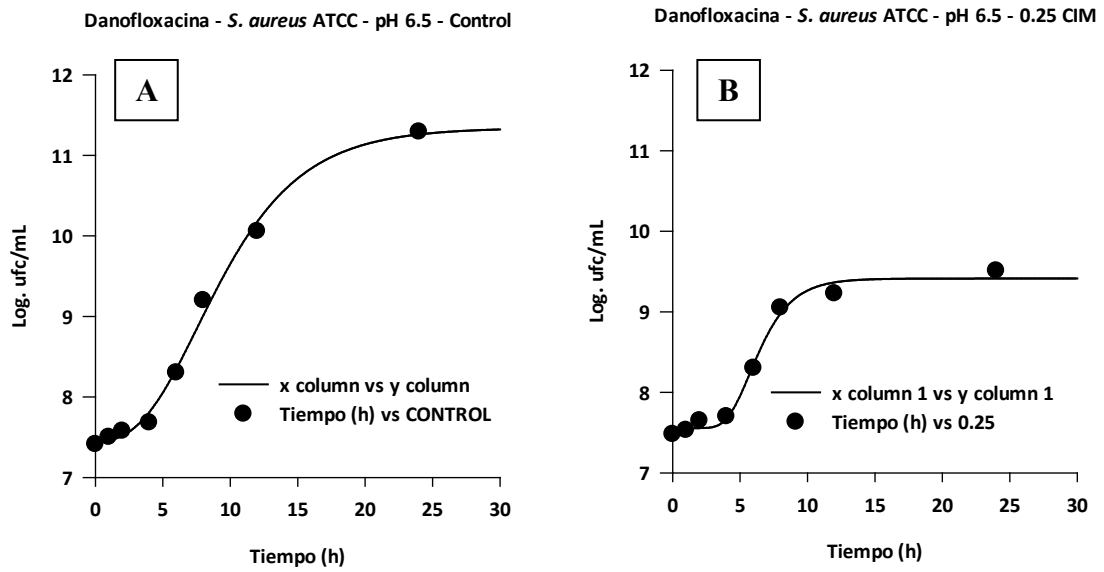


Figura 62. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacin) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacin (0.25 µg/mL) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 31 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 31. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH pH 6.5			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 6.5	
Parámetros	Unidad	Control	0.25 CIM	0.5 CIM	control	0.25 CIM
R		0.9986	0.9957	0.9763	0.9974	0.9947
c	Log ufc/mL	3.90	1.72	0.25	3.92	1.85
b	h ⁻¹	0.17	0.50	1.16	0.23	0.58
m	H	5.53	5.56	1.48	7.56	5.74
a	Log ufc/mL	7.13	7.51	7.44	7.42	7.56
μ	Log ufc/mL*h	0.24	0.32	0.11	0.33	0.39
LPD	H	26.65	9.12	0.41	28.52	8.17
MPD	Log ufc/mL	11.03	9.23	7.69	11.34	9.41
Kc	h ⁻¹	0.2047	0.0984	0.0187	0.2532	0.1016
T½c	H	3.39	7.04	37.06	2.74	6.82

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

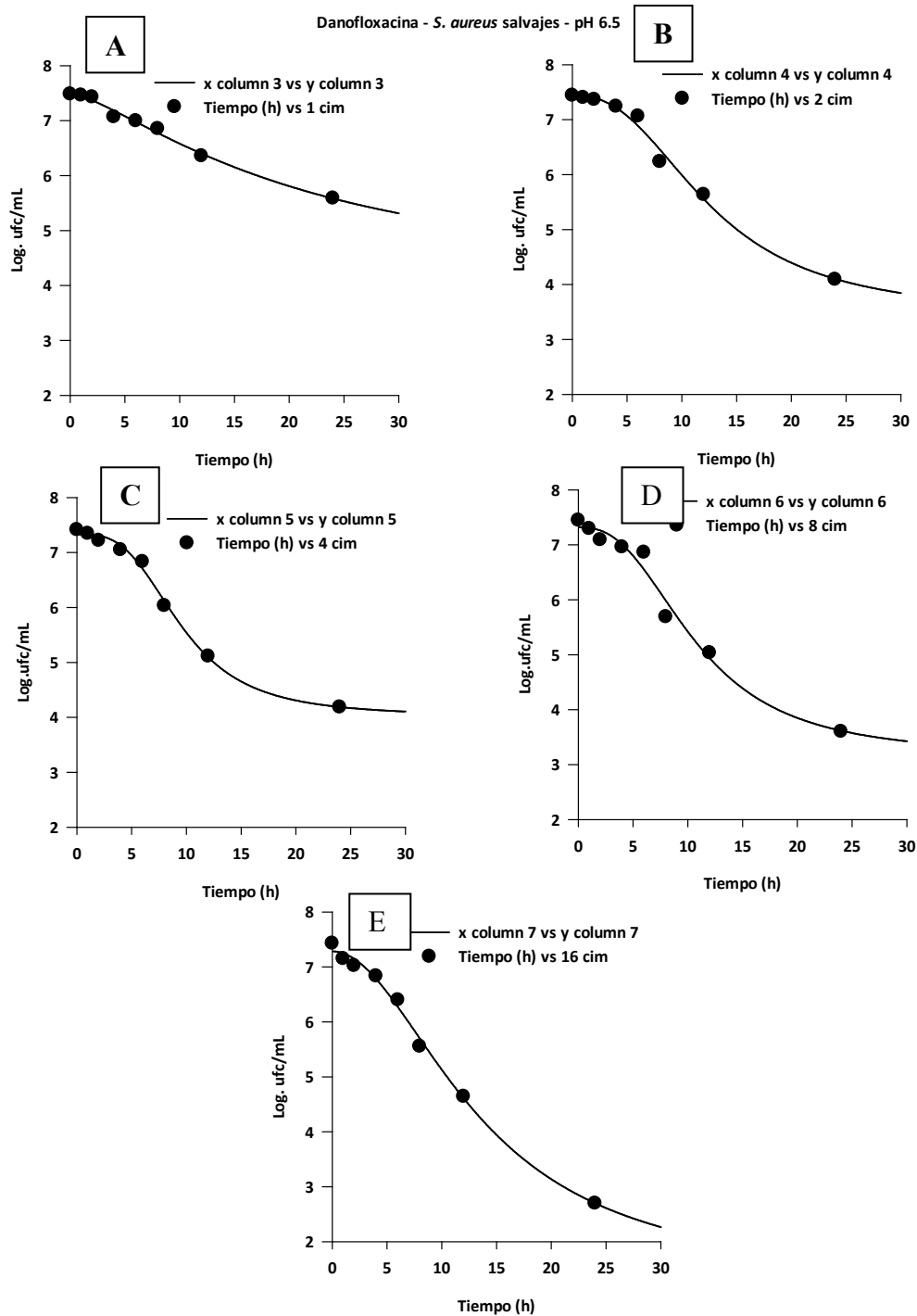


Figura 63. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de danofloxacin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 2xCIM de danofloxacin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 4xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 8xCIM de danofloxacin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Y E: 16xCIM de danofloxacin (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

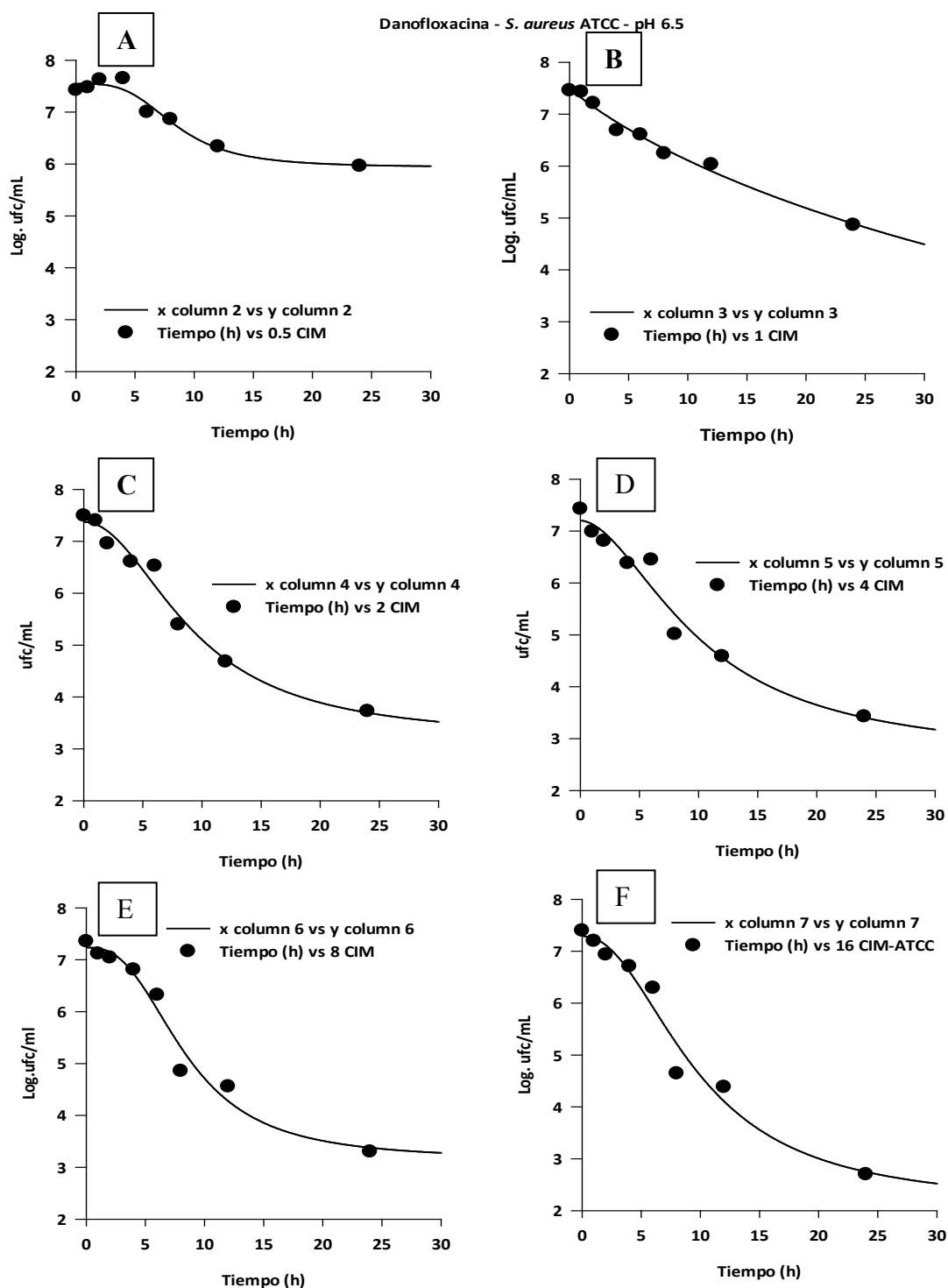


Figura 64. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 $\mu\text{g/mL}$), B: 1xCIM de danofloxacin (1 $\mu\text{g/mL}$), C: 2xCIM de danofloxacin (2 $\mu\text{g/mL}$), D: 4xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g/mL}$), E: 8xCIM de danofloxacin (8 $\mu\text{g/mL}$) y F: 16xCIM de danofloxacin (16 $\mu\text{g/mL}$).

En la Tabla 32 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 32. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM -1 µg/mL, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - pH 6.5					<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – pH 6.5					
Parámetro	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9909	0.9904	0.9927	0.9869	0.9938	0.9384	0.9979	0.9950	0.9973	0.9895	0.9973
N _{max}	UFC/mL	386666	12333	15333	4000	500	9133333	73333	5333	2667	2000	500
Y		2.21	3.30	1.65	1.12	0.98	33.30	2.77	3.06	0.94	1.12	1.47
T ₁₅₀	H	3.75	5.20	3.39	2.31	1.50	5.76	2.17	1.51	0.65	1.95	1.48
N ₀	UFC/mL	30460000	27646666	25973333	28030000	26913333	26660000	28686667	31086666	26793333	22506666	24980000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1820	-0.3215	-0.3098	-0.3690	-0.4540	-0.1406	-0.2488	-0.3613	-0.3840	-0.3888	-0.4509
T½α	h	3.81	2.16	2.24	1.88	1.53	4.93	2.79	1.92	1.80	1.78	1.54

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T½α**: tiempo medio de declinación

A este pH, los valores TI50 son mas elevados que los presentados a pH 7.4 y oscilan entre 3.75 y 1.50 h, para valores de 0.5 y 16 CIM.

5.4.2.3. Danofloxacin a pH 5

La CIM para danofloxacin a pH 5 fue estuvo entre 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$, en las Figuras 64 y 65 se evidencia nuevamente su acción dependiente de la concentración. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 67 y 68 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (Figuras 67 A y 68 A). Las curvas en ausencia de danofloxacin fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25, 0.5 y 1 CIM, indicando una pérdida de su actividad bactericida a pH ácido, lo que se corroborada por el aumento de su CIM, comportamiento demostrado también con la cepa de referencia.

En las Figuras 69 y 70 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacin a pH 5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

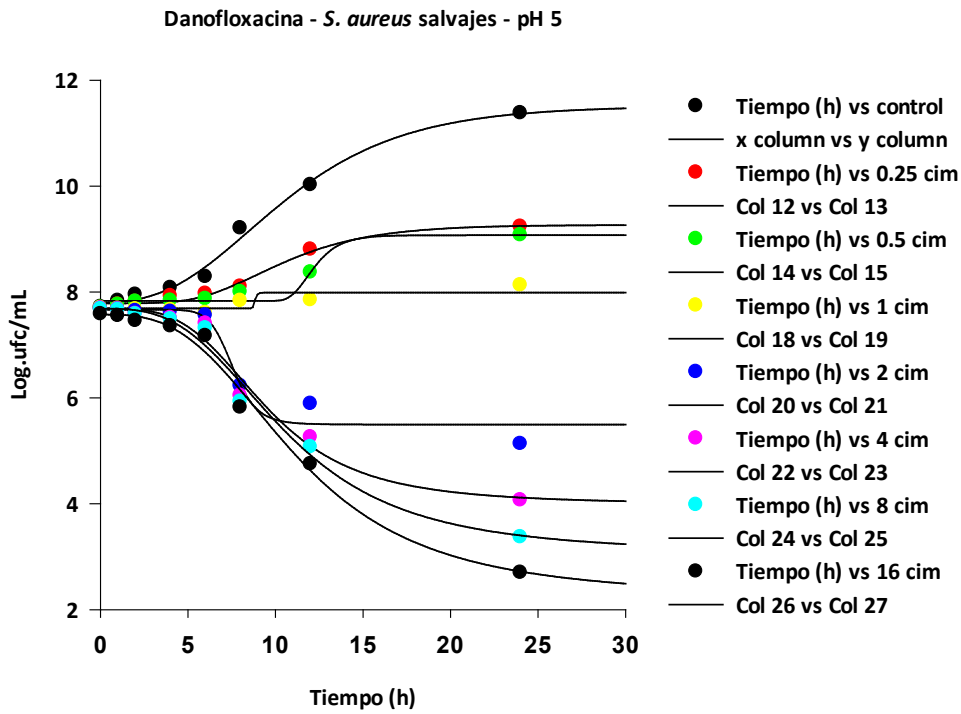


Figura 65. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH pH 5.

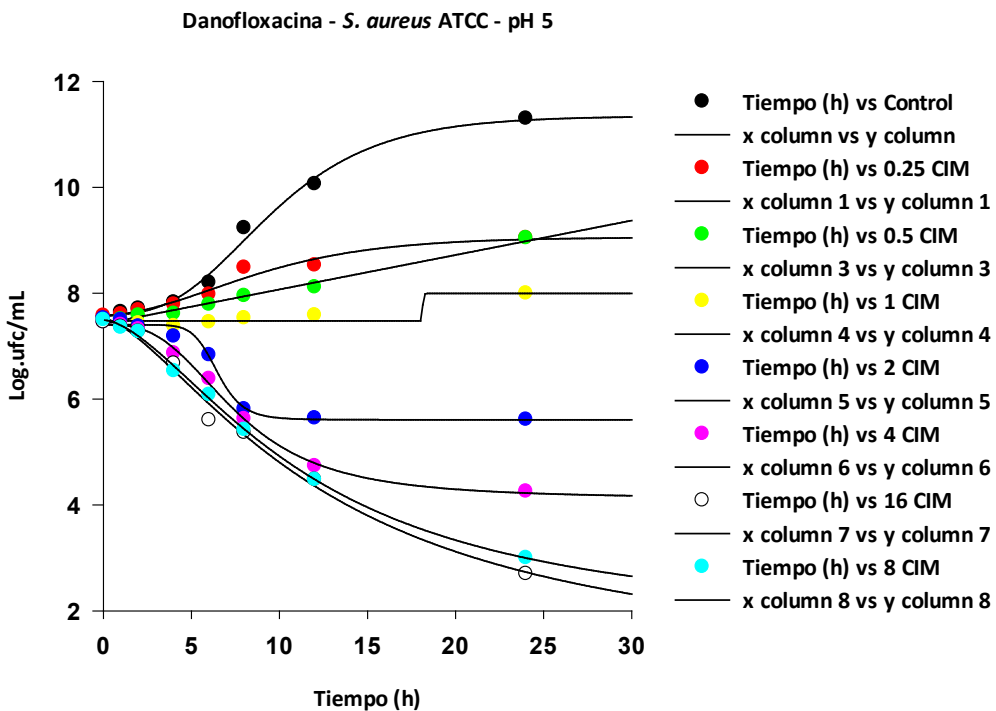


Figura 66. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH pH 5.

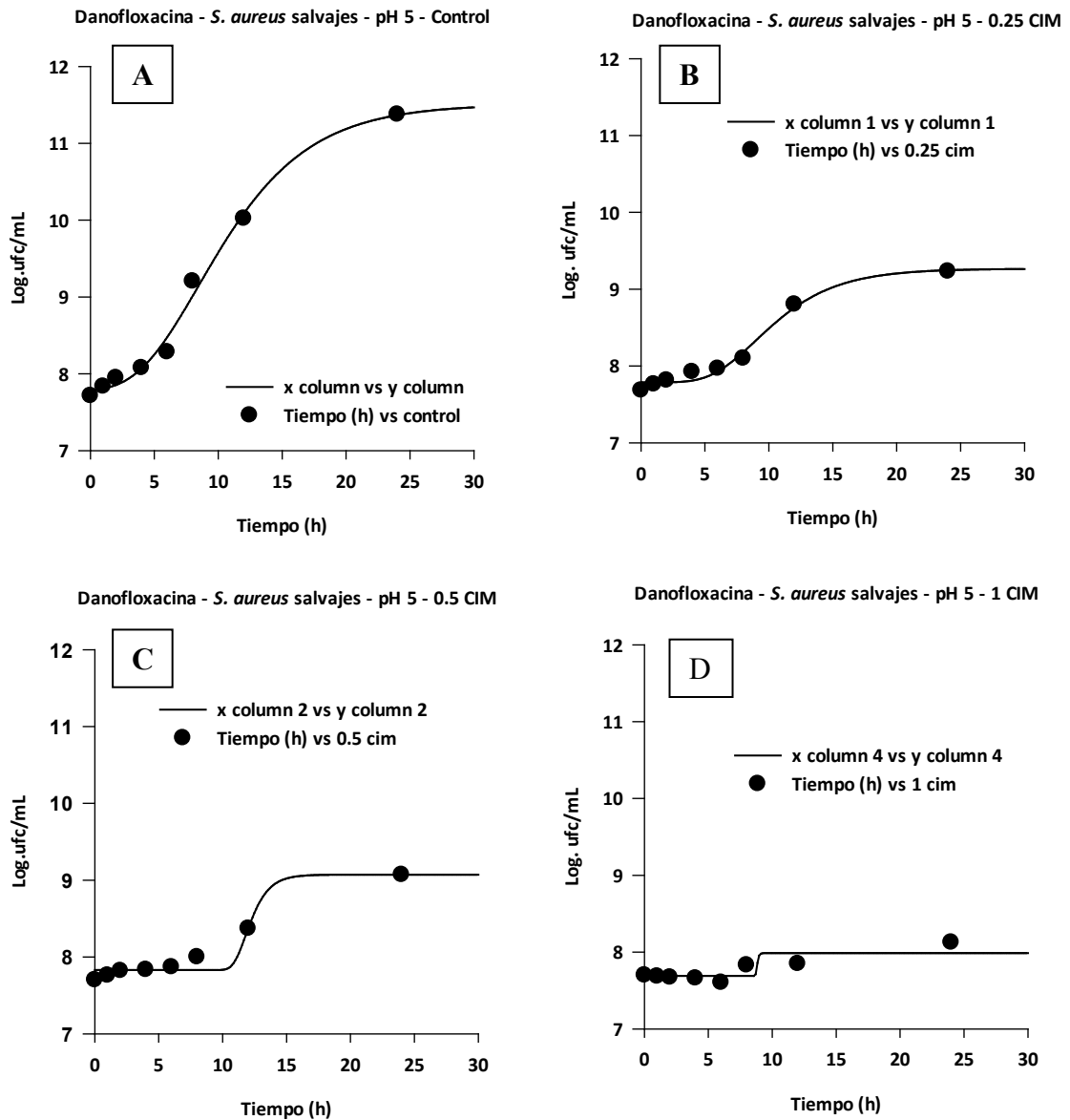


Figura 67. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacin) en CMH pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacin (0.5 µg/mL) en CMH pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacin (1 µg/mL) y D: curva de crecimiento frente a 1 CIM de danofloxacin (2 µg/mL) en CMH pH 5.

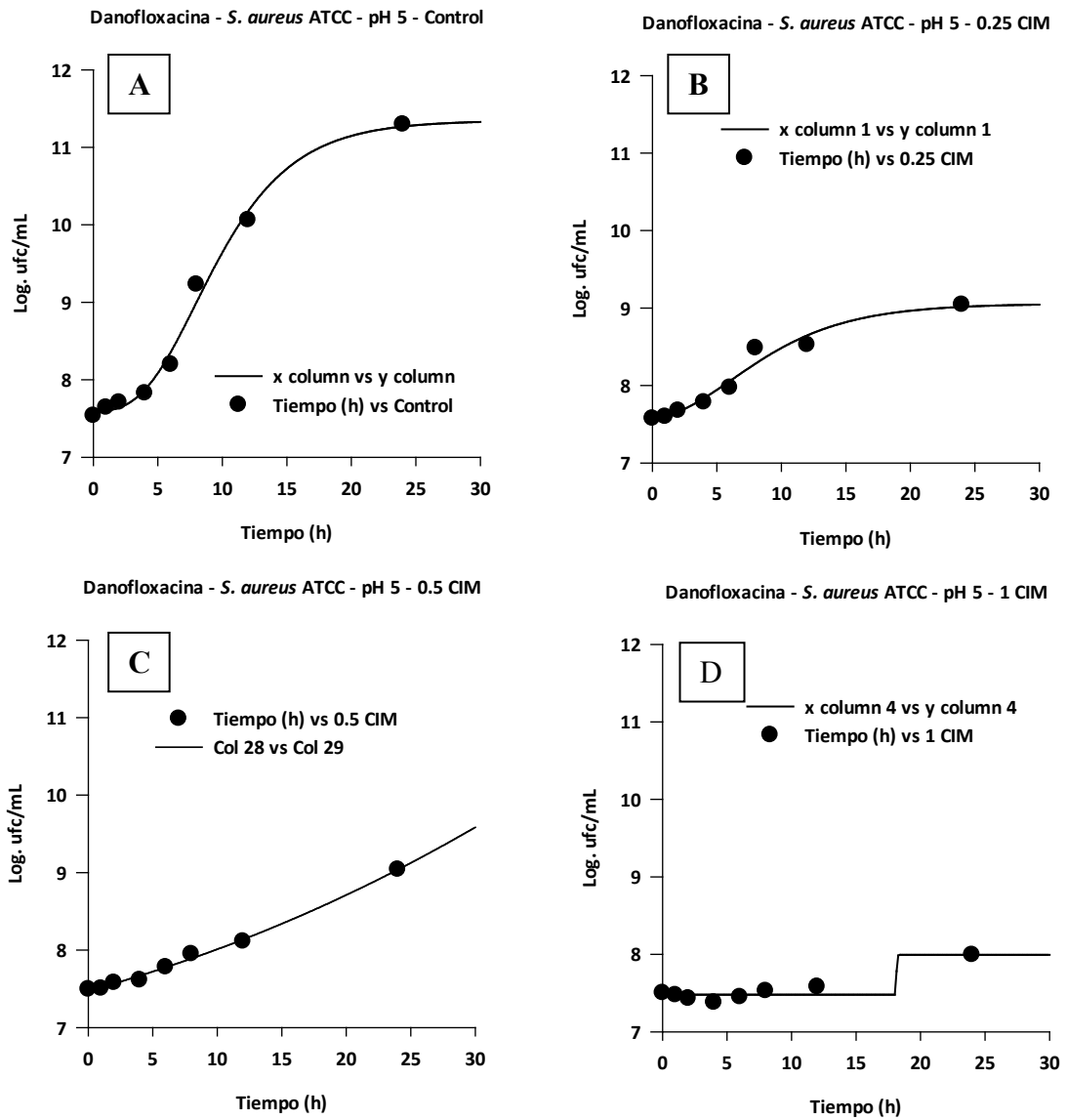


Figura 68. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH pH 5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.5 µg/mL) en CMH pH 5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de danofloxacina (1 µg/mL) y D: curva de crecimiento frente a 1 CIM de danofloxacina (2 µg/mL) en CMH pH 5.

En la Tabla 33 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 33. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH pH 5.0				<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 5.0			
Parámetros	Unidad	Control	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM	control	0.25 CIM	0.5 CIM	1 CIM
R		0.9962	0.9918	0.9824	0.8108	0.9961	0.9837	0.9973	0.9478
c	Log ufc/mL	3.73	1.48	1.24	0.30	3.77	1.54	11.84	0.51
b	h ⁻¹	0.21	0.29	1.00	11.42	0.24	0.20	0.02	24.57
m	h	8.48	8.98	11.82	8.79	7.90	6.22	46.47	18.11
a	Log ufc/mL	7.78	7.79	7.83	7.69	7.58	7.51	6.75	7.48
μ	Log ufc/mL*h	0.29	0.16	0.46	1.26	0.33	0.11	0.09	4.61
LPD	h	35.62	27.52	10.83	0.68	28.75	26.10	2273.5	0.70
MPD	Log ufc/mL	11.51	9.18	9.07	7.99	11.35	9.05	18.59	7.99
Kc	h ⁻¹	0.2721	0.1248	0.1410	0.0488	0.2527	0.1127	0.1658	0.0616
T½c	h	2.55	5.55	4.91	14.20	2.74	6.14	4.18	11.25

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

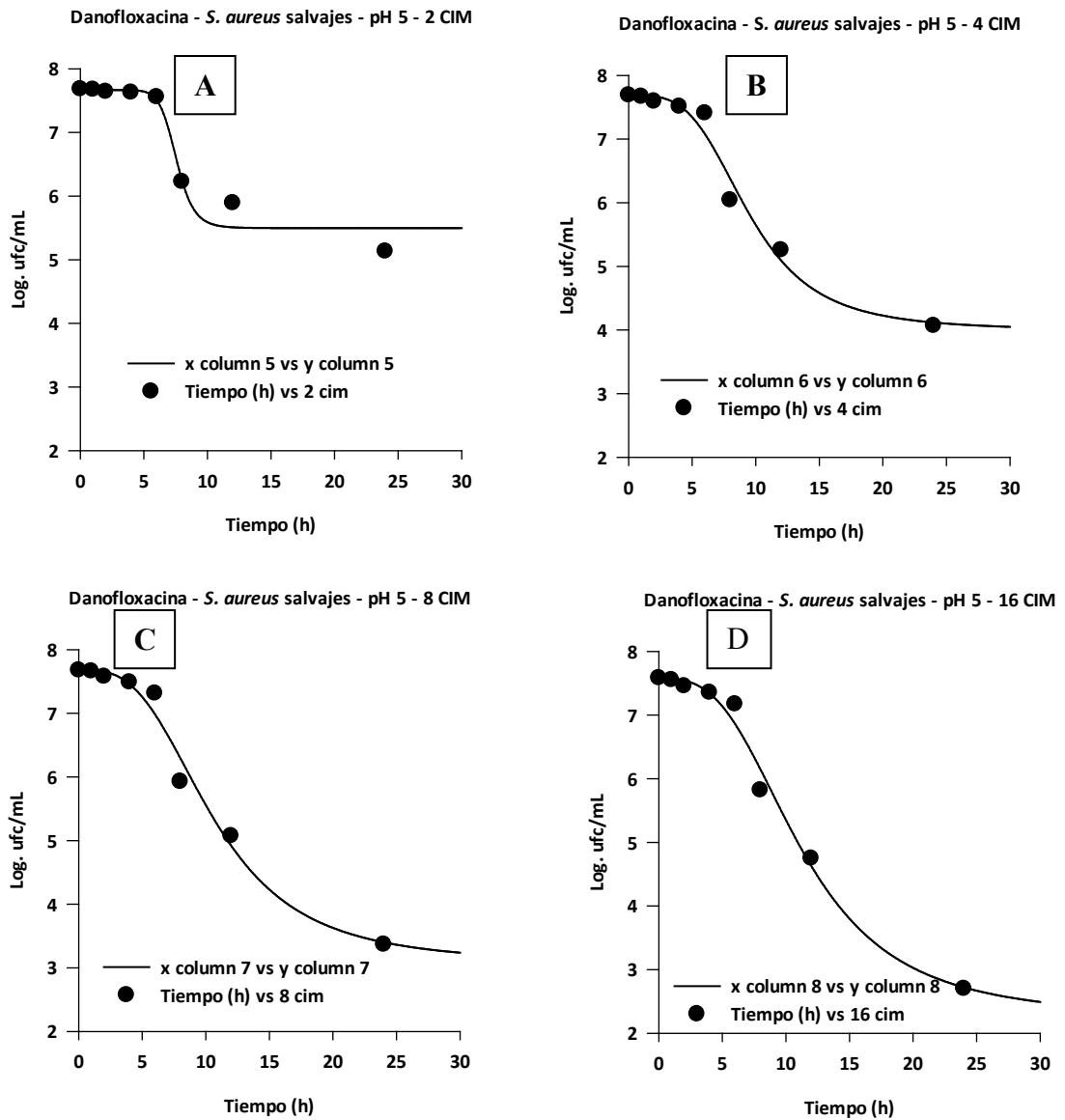


Figura 69. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 5. A: *S. aureus* frente a 2xCIM de danofloxacin (4 µg/mL), B: 4xCIM de danofloxacin (8 µg/mL), C: 8xCIM de danofloxacin (16 µg/mL) y D: 16xCIM de danofloxacin (32 µg/mL).

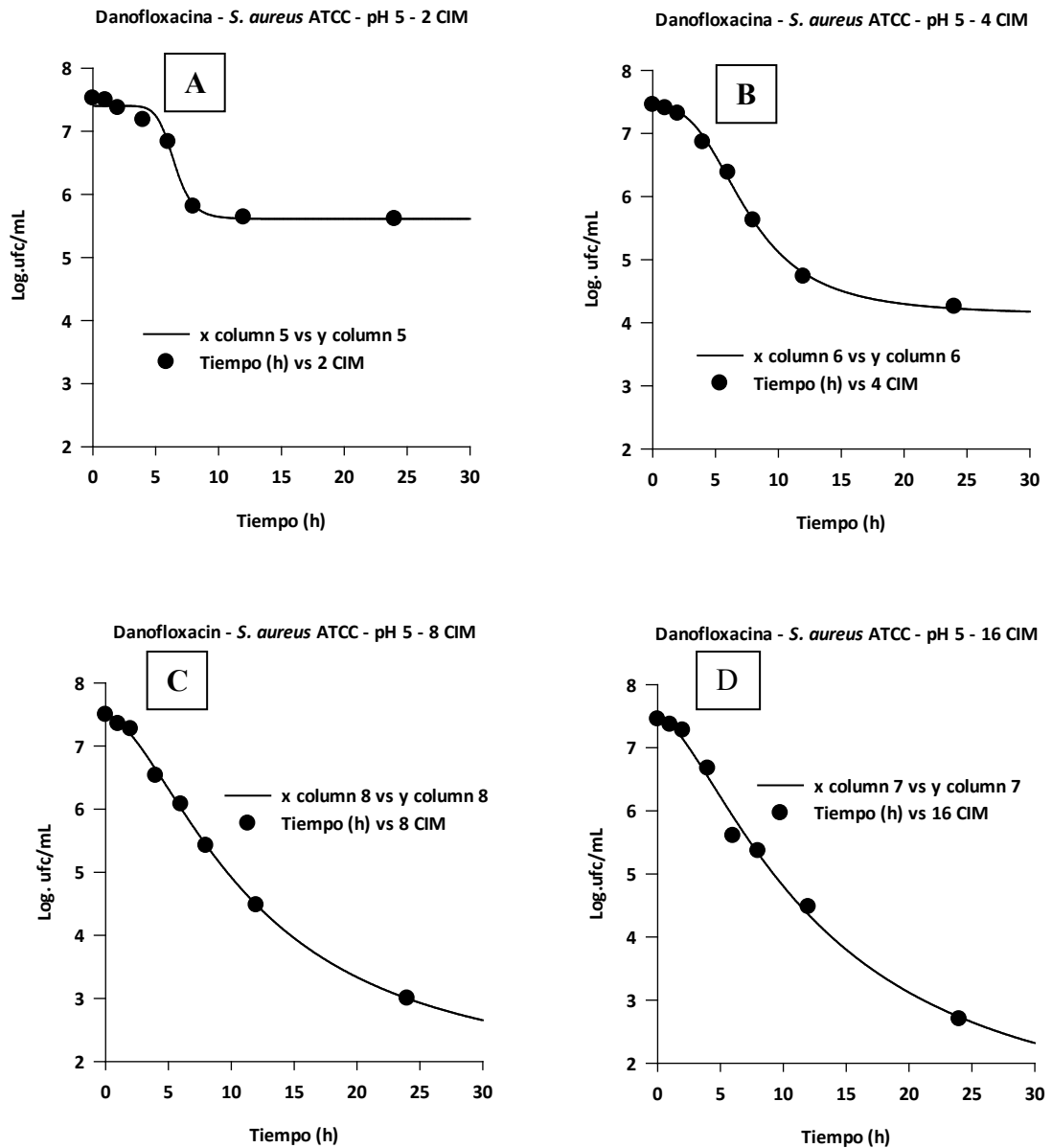


Figura 70. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 2xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 4xCIM de danofloxacin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 8xCIM de danofloxacin (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y D: 16xCIM de danofloxacin (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la Tabla 34 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Tabla 34. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 frente a diferentes concentraciones (2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina

		<i>S. aureus</i> aislados a campo CMH pH 5.0				<i>S. aureus</i> ATCC CMH pH 5.0			
Parámetro	Unidad	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9967	0.9765	0.9836	0.9827	0.994	0.9986	0.9896	0.9955
N _{max}	UFC/mL	135333	11666	2333	500	408000	18000	1000	500
Y		16.92	4.03	3.57	2.63	2.20	2.87	2.18	3.05
T _{I50}	h	6.50	5.72	5.27	4.80	3.46	2.86	2.14	2.53
N ₀	UFC/mL	48133333	48766667	47333333	38300000	33400000	28600000	31400000	28400000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.2448	-0.3475	-0.4133	-0.4687	-0.1836	-0.3072	-0.4315	-0.4562
T½α	h	2.83	1.99	1.68	1.48	3.77	2.26	1.61	1.52

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T_{I50}**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T½α**: tiempo medio de declinación.

A este pH, TI50 fue mas prolongado que en las condiciones de pH anteriores, esto puede ser explicado, teniendo en cuenta que dano, es menos eficaz a este pH e incluso su CIM, aumenta una vez con respecto a los demás pHs evaluados. En todo caso los valores TI50 descienden a medida que aumenta la concentración.

5.4.2.4. Efecto de la leche sobre la actividad de Danofloxacina

Danofloxacina en leche, cuyo pH se encuentra entre 6.5-6.8, presentó cierta actividad frente al *S. aureus* a 0.5 CIM. Considerando que la CIM en leche fue de 1 µg/mL (similar obviamente a la CIM obtenida en CMH pH 6.5), a 0.5 µg/mL presentó cierta inhibición sobre el crecimiento microbiano, diferenciándose en este caso con lo ocurrido en el CMH. En las Figuras 71 y 72 se puede observar claramente este hallazgo. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 73 y 74 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (73 A y 74 A). Las curvas en ausencia de danofloxacina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25xCIM de danofloxacina (0.25 µg/mL).

En las Figuras 75 y 76 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacina en Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de danofloxacina a pH 7.4, aunque la cepa de referencia se mostró ligeramente más sensible a altas concentraciones del antimicrobiano. La CIM de danofloxacina a pH 7.4 fue 0.5 -1 µg/mL, obsérvese en las Figuras 53 y 54 que su actividad frente a *S. aureus* se vio aumentada sustancialmente al aumentar las concentraciones, demostrando su concentración dependencia. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 55 y 56 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (55 A y 56 A). Las curvas en ausencia de danofloxacina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, como así también las curvas

obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.125 CIM, ya que a esa concentración continuó un leve crecimiento bacteriano.

En las Figuras 57 y 58 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacin (0.5xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM y 16xCIM) a pH 7.4, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todos los casos, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte, siendo el *S. aureus* ATCC 29213 más sensible a altas concentraciones que las cepas salvajes. El modelo sigmoidal demuestra que a concentraciones mayores a 0.5xCIM, el TI50 va descendiendo, conforme aumenta la concentración, lo cual es lógico, ya que al ser un ATB, concentración dependiente, el tiempo en que tarda en exhibir un efecto bactericida, será menor a mayores concentraciones. A este pH, el TI50 es de 0.43 a 0.56 h a 16xCIM, mientras que a 4xCIM es de 1.12-1.11 h. Esto mismo queda corroborado con el análisis por regresión lineal que arroja una semivida de declinación mucho más corta a mayores concentraciones.

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron, nuevamente, un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de danofloxacin, pero en este caso a pH 6.5. La CIM en pH 6.5 fue de 0.5-1 µg/mL, en las Figuras 59 y 60 se puede corroborar su acción dependiente de la concentración, ya que su actividad frente a *S. aureus* aumenta notablemente al aumentar las concentraciones. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 61 y 62 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (Figuras 61 A y 62 A). Las curvas en ausencia de danofloxacin fueron analizadas por el modelo de Gompertz, conjuntamente con las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25 y 0.5 CIM, debido a que, como se observa en las gráficas, frente a esas concentraciones continuó el crecimiento bacteriano. Sin embargo no ocurrió lo mismo con el *S. aureus* ATCC de referencia, ya que se mostró más sensible y a 0.5CIM existió muerte bacteriana (Figura 62 B).

En las Figuras 63 y 64 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacina a pH 6.5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

La CIM para danofloxacina a pH 5 fue estuvo entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en las Figuras 64 y 65 se evidencia nuevamente su acción dependiente de la concentración. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 67 y 68 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (Figuras 67 A y 68 A). Las curvas en ausencia de danofloxacina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25, 0.5 y 1 CIM, indicando una pérdida de su actividad bactericida a pH ácido, lo que se corroborada por el aumento de su CIM, comportamiento demostrado también con la cepa de referencia.

En las Figuras 69 y 70 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de danofloxacina a pH 5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

Danofloxacina en leche, cuyo pH se encuentra entre 6.5-6.8, presentó cierta actividad frente al *S. aureus* a 0.5 CIM. Considerando que la CIM en leche fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (similar obviamente a la CIM obtenida en CMH pH 6.5), a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó cierta inhibición sobre el crecimiento microbiano, diferenciándose en este caso con lo ocurrido en el CMH. En las Figuras 71 y 72 se puede observar claramente este hallazgo. Este comportamiento leche bovina, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

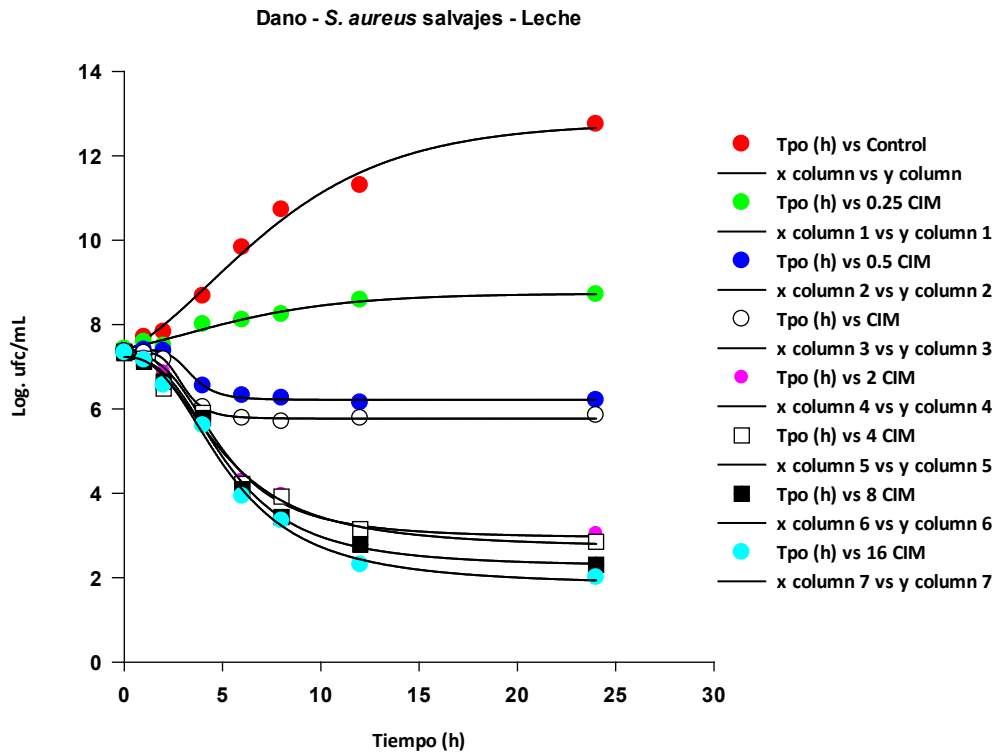


Figura 71. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en leche.

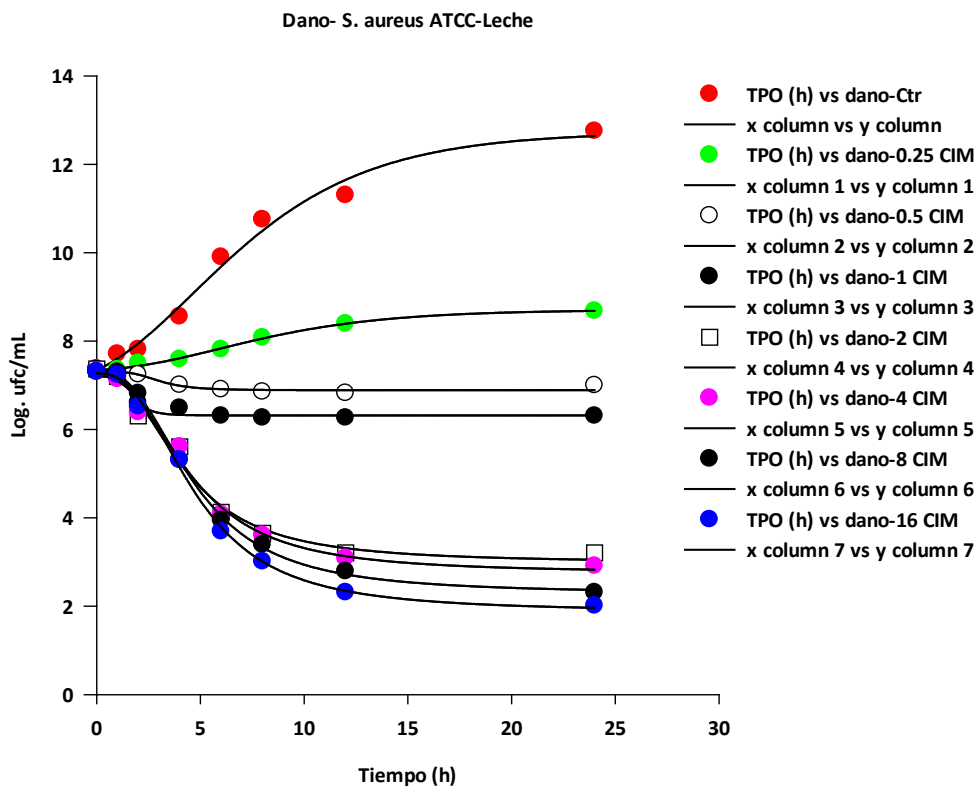


Figura 72. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en leche.

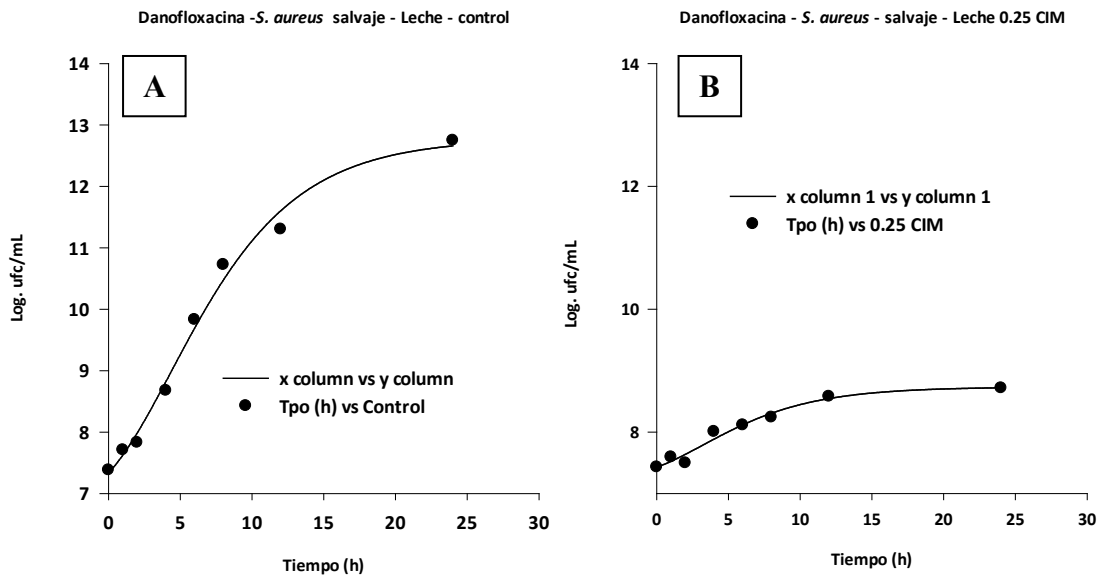


Figura 73. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en leche.

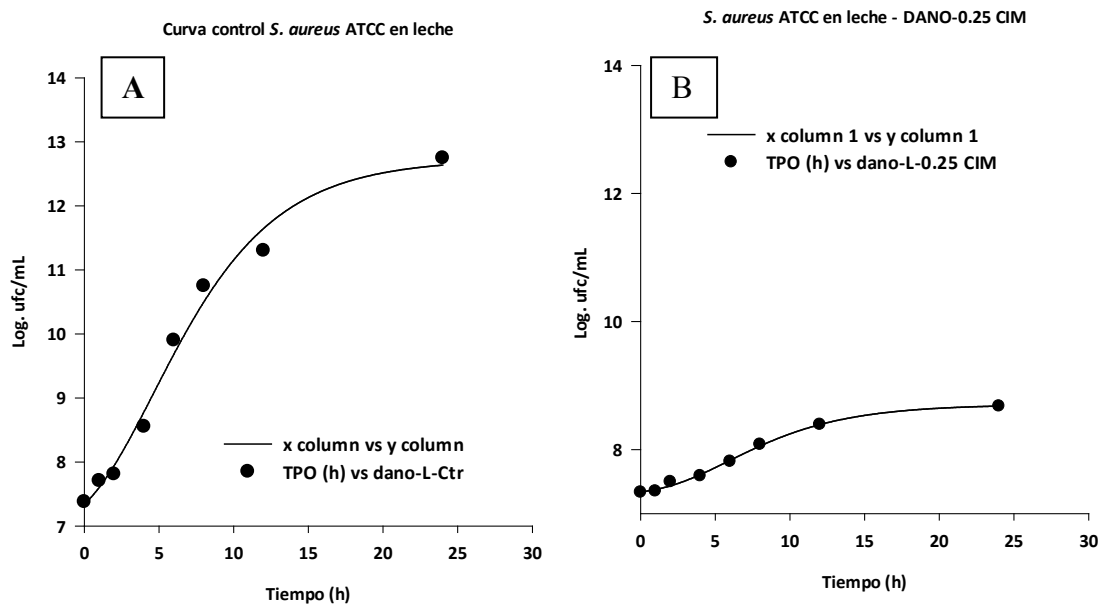


Figura 74. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en leche.

En la Tabla 35 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 35. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en leche sin danofloxacina y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – Leche		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – Leche	
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM	control	0.25 CIM
R		0.9956	0.9864	0.9940	0.9983
c	Log ufc/mL	5.99	1.49	5.78	1.40
b	h ⁻¹	0.20	0.23	0.21	0.22
m	h	4.39	3.26	4.64	5.89
a	Log ufc/mL	6.79	7.24	6.95	7.30
μ	Log ufc/mL*h	0.44	0.13	0.45	0.11
LPD	h	16.95	9.83	17.33	22.23
MPD	Log ufc/mL	12.78	8.73	12.73	8.70
Kc	h ⁻¹	0.2843	0.0771	0.2838	0.0958
T½c	h	2.44	8.99	2.44	7.23

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

S. aureus salvajes - Leche

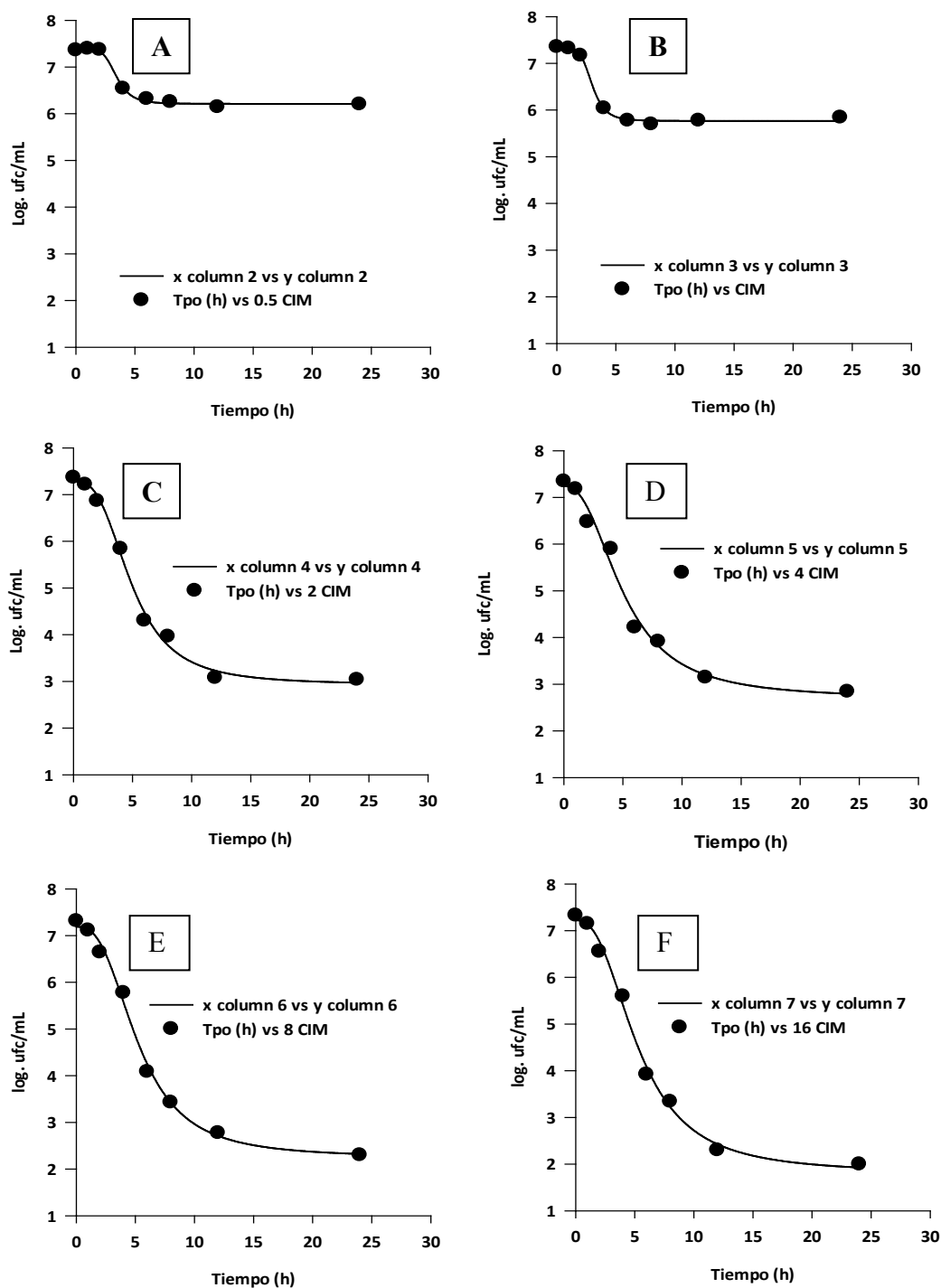


Figura 75. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en leche. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacina (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacina (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacina (4 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacina (2 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacina (4 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacina (8 µg/mL).

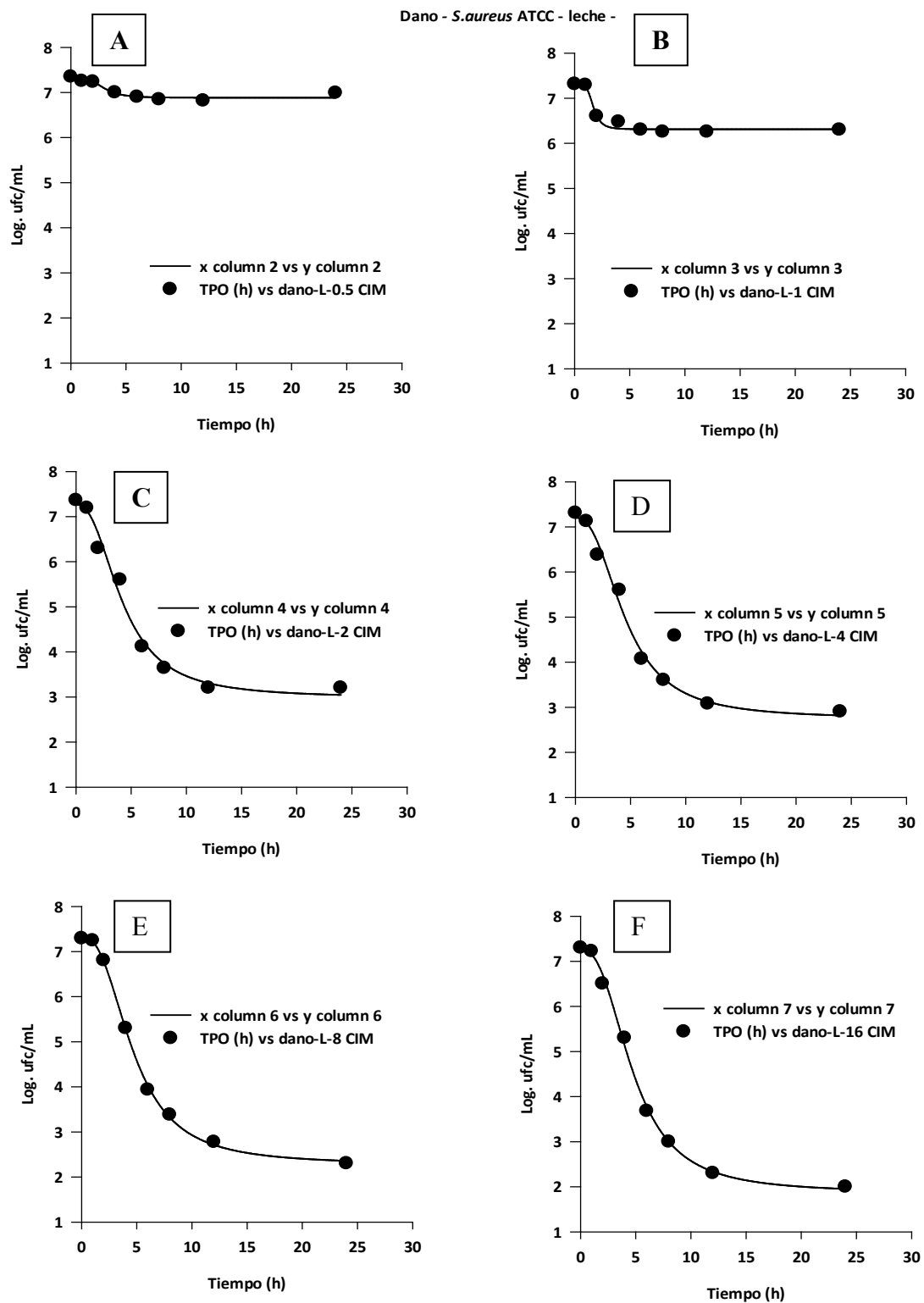


Figura 76. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en leche. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 1xCIM de danofloxacin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 2xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 4xCIM de danofloxacin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), E: 8xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y F: 16xCIM de danofloxacin (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la Tabla 36 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

En leche, se mantuvo la misma tendencia que a pH 6.5, los valores TI50 fueron reduciéndose a medida que aumentaba la concentración.

Tabla 36. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en leche frente a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacina

Parámetros	Unidad	<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - Leche						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – Leche					
		0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9990	0.9994	0.9993	0.9998	0.9999	1.0000	0.9703	0.9994	0.99990	1.0000	0.9999	1.0000
N _{max}	UFC/mL	1600000	700000	1100	700	200	100	9800000	2000000	1600	800	200	100
γ		8.89	5.81	2.55	3.78	2.65	3.29	3.06	7.22	4.46	3.84	4.26	4.78
T ₁₅₀	h	3.04	2.25	1.46	1.22	1.22	1.24	2.49	1.48	1.17	1.18	1.69	1.41
N ₀	UFC/mL	23200000	22600000	23500000	22400000	20800000	21300000	22400000	20600000	23200000	20400000	19600000	20000000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1114	-0.1448	-0.4155	-0.4323	-0.4814	-0.5113	-0.0344	-0.0972	-0.3993	-0.4228	-0.4790	-0.5087
T_{1/2α}	h	6.22	4.79	1.67	1.60	1.44	1.36	20.15	7.13	1.74	1.64	1.45	1.36

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **γ**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T_{1/2α}**: tiempo medio de declinación.

5.4.2.5. Efecto del suero sobre la actividad de Danofloxacina

Danofloxacina en suero, cuyo pH es 7.4, comenzó a ejercer actividad frente al *S. aureus* a concentraciones del orden de 0.5 CIM, al igual que en leche. La CIM de danofloxacina para *S. aureus* cuando el CMH fue suplementado con 40% de suero bovino fue de 1 µg/mL, pero a 0.5 µg/mL presentó inhibición del crecimiento microbiano. En las Figuras 77 y 78 se puede observar claramente este hallazgo. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 79 y 80 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (79 A y 80 A). Las curvas en ausencia de danofloxacina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25xCIM (0.25 µg/mL), debido a que continuó el crecimiento bacteriano, aunque de manera mucho más lenta en comparación a la curva control.

En las Figuras 81 y 82 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las mismas, en presencia de diferentes concentraciones de danofloxacina en CMH suplementado con 40 % de suero bovino, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

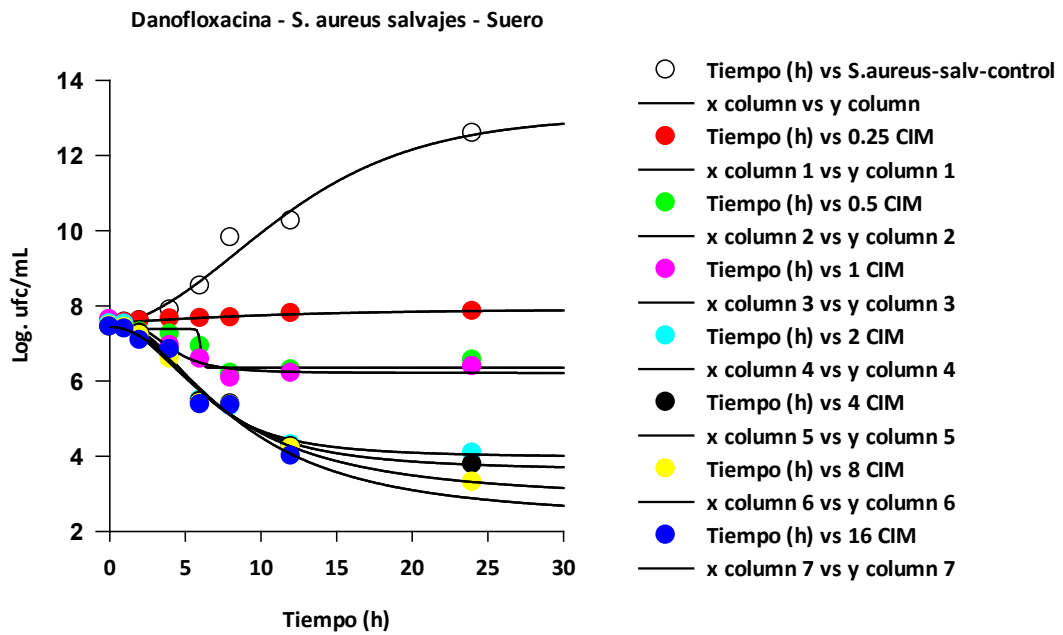


Figura 77. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Danofloxacina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

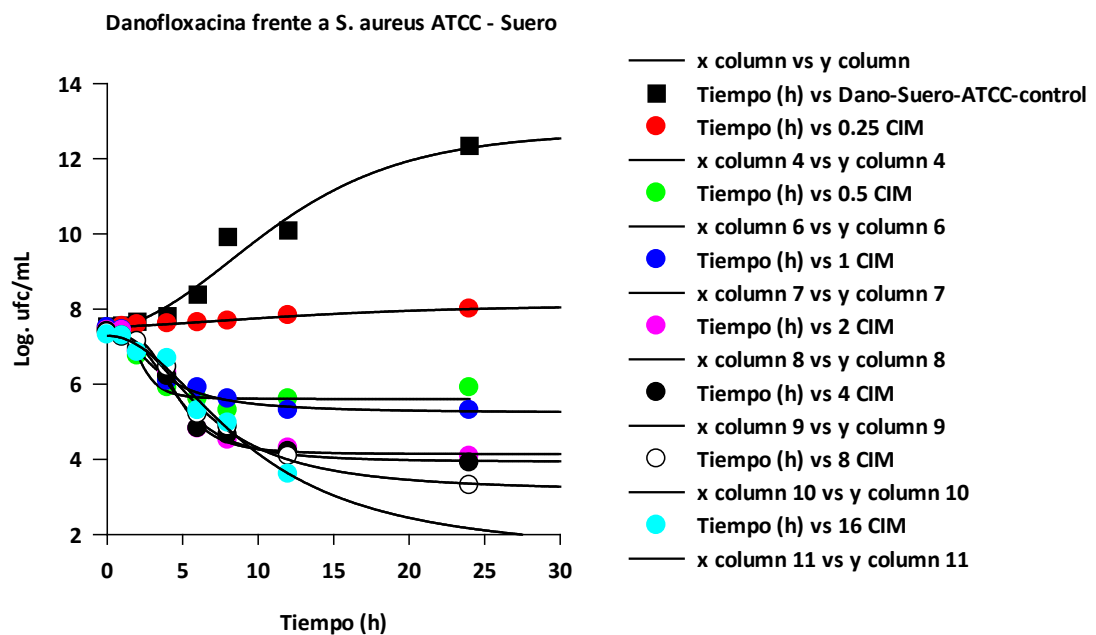


Figura 78. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Danofloxacina en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

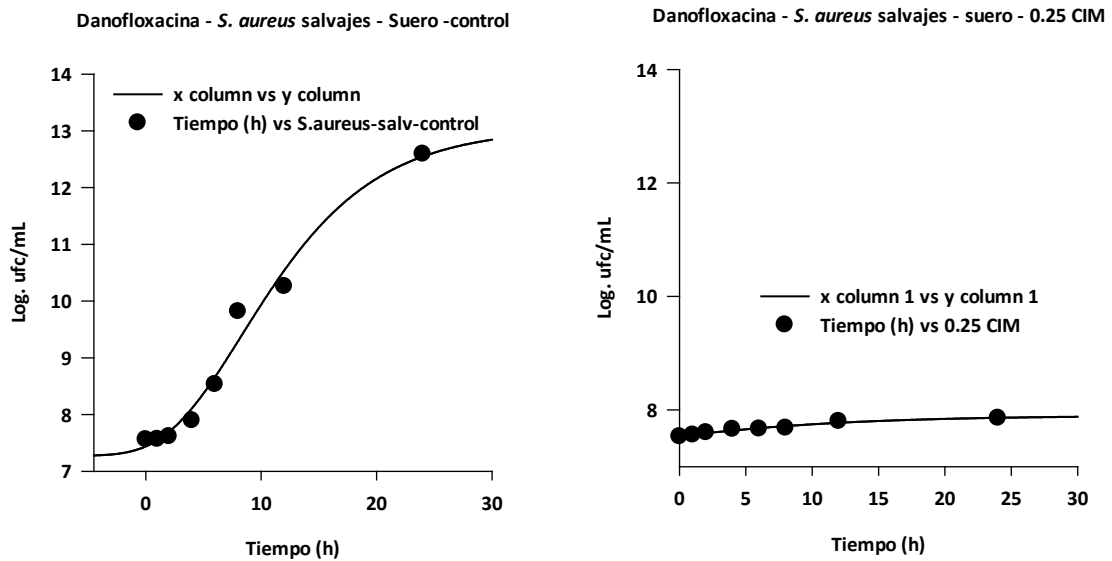


Figura 79. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

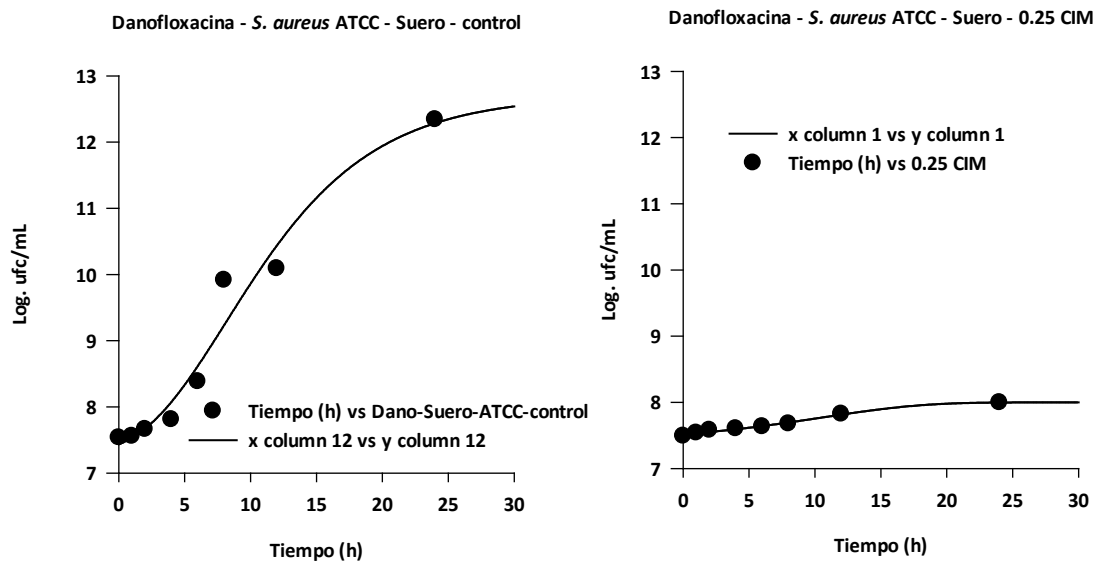


Figura 80. Modelado de Gompertz realizado a *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin danofloxacina) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de danofloxacina (0.25 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

En la Tabla 37 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 37. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino sin danofloxacin y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – 40% Suero		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – 40% Suero	
Parámetros	Unidad	Control	0.25 CIM	control	0.25 CIM
R		0.9962	0.9918	0.9961	0.9837
c	Log ufc/mL	3.73	1.48	3.77	1.54
b	h ⁻¹	0.21	0.29	0.24	0.20
m	h	8.48	8.98	7.90	6.22
a	Log ufc/mL	7.78	7.79	7.58	7.51
μ	Log ufc/mL*h	0.29	0.16	0.33	0.12
LPD	h	35.90	27.91	28.62	25.72
MPD	Log ufc/mL	11.51	9.27	11.35	9.06
Kc	h ⁻¹	0.4446	0.0278	0.4235	0.0454
T½c	h	1.56	24.93	1.64	15.26

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno.

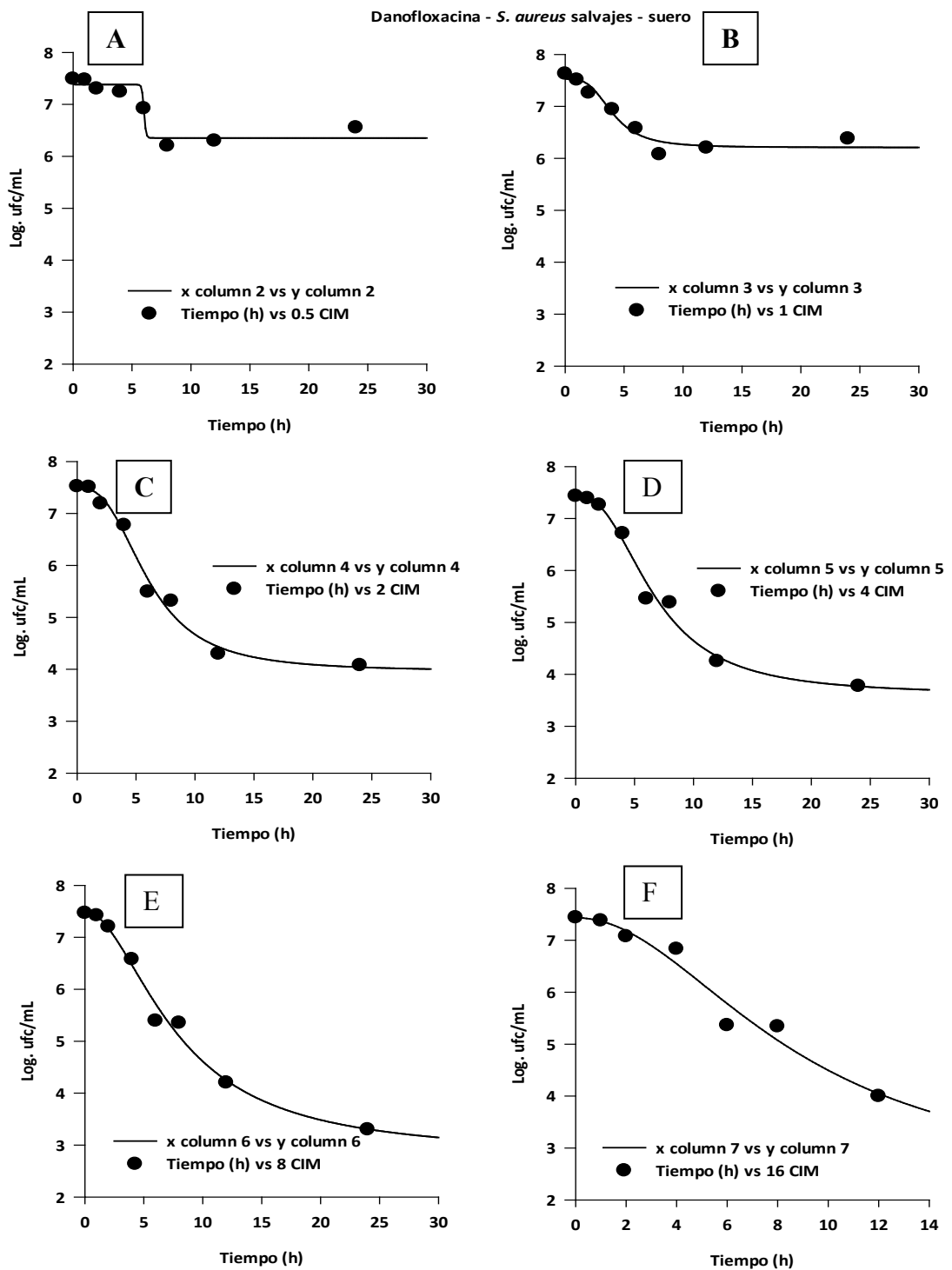


Figura 81. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 $\mu\text{g/mL}$), B: 1xCIM de danofloxacin (1 $\mu\text{g/mL}$), C: 2xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g/mL}$), D: 4xCIM de danofloxacin (2 $\mu\text{g/mL}$), E: 8xCIM de danofloxacin (4 $\mu\text{g/mL}$) y F: 16xCIM de danofloxacin (8 $\mu\text{g/mL}$).

Danofloxacin - *S. aureus* ATCC - Suero

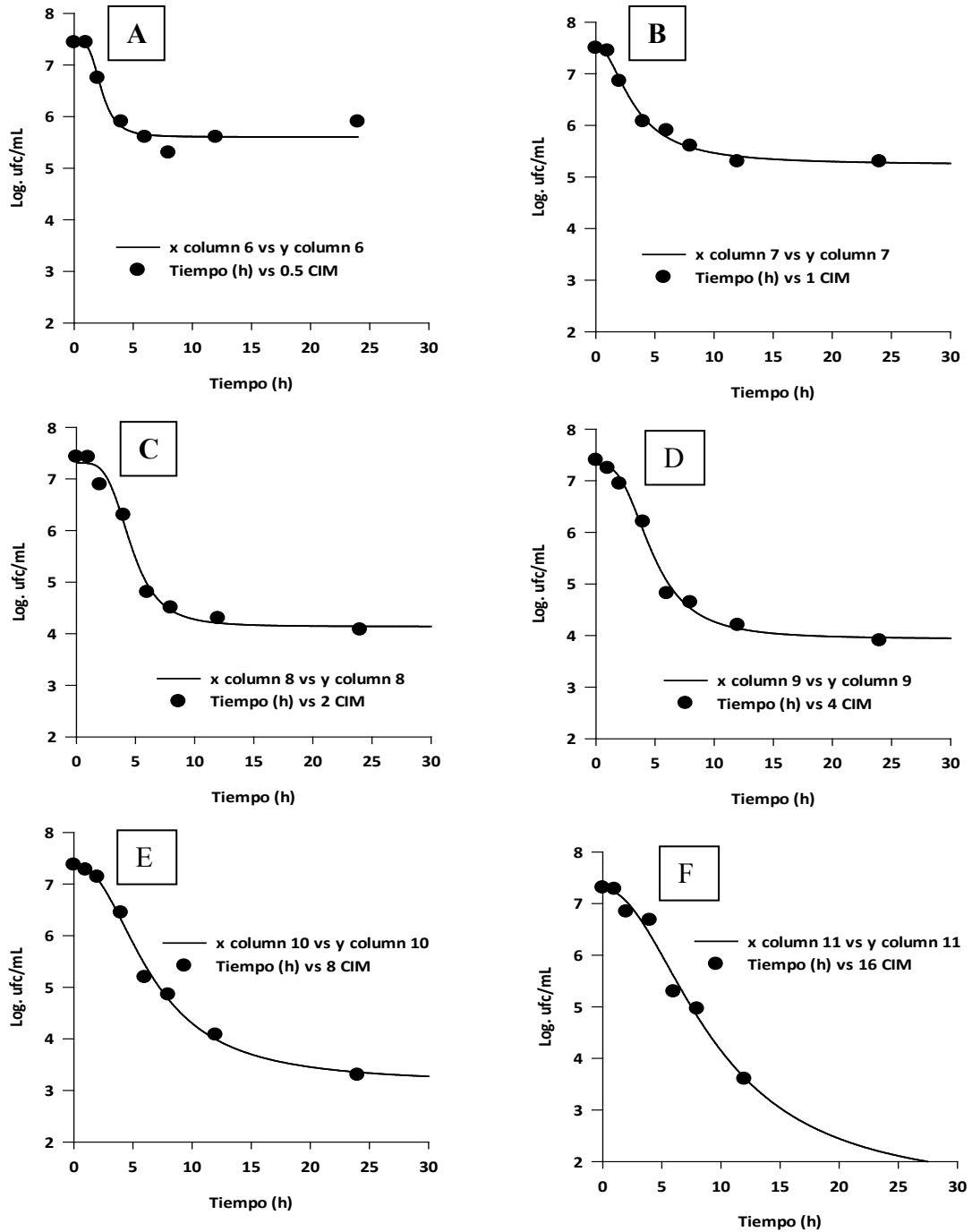


Figura 82. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 0.5xCIM de danofloxacin (0.5 µg/mL), B: 1xCIM de danofloxacin (1 µg/mL), C: 2xCIM de danofloxacin (2 µg/mL), D: 4xCIM de danofloxacin (4 µg/mL), E: 8xCIM de danofloxacin (8 µg/mL) y F: 16xCIM de danofloxacin (16 µg/mL).

En la Tabla 38 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

Cuando el medio de cultivo es suplementado con suero, encontramos que no hay una gran variación del T150, el que se encuentra entre 1.74 a 3.44 h, lo cual contrasta con lo encontrado en AMH a pH 7.4, donde si hubo variaciones en función de la concentración.

Tabla 38. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino frente a diferentes concentraciones (0.5, CIM, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de danofloxacin

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH – 40% Suero						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – 40% Suero					
Parámetros	Unidad	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	0.5 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9762	0.9983	0.9957	0.9989	0.9997	0.9929	0.9999	0.9998	0.9986	0.9992	0.9963	0.9864
N _{max}	UFC/mL	3600000	2400000	12000	6000	2000	0	800000	200000	12000	8000	2000	0
Y		2.03	2.07	3.11	3.19	3.06	2.28	30.28	4.75	6.29	2.29	2.76	3.25
T ₁₅₀	h	3.44	1.74	1.98	2.57	2.15	1.96	1.91	1.53	1.72	1.50	2.23	1.72
N ₀	UFC/mL	31200000	42600000	33400000	27200000	29500000	27600000	27400000	31600000	26800000	25200000	23600000	20400000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.0899	-0.1199	-0.3305	-0.3509	-0.4000	-0.6604	-0.1473	-0.2110	-0.3214	-0.3357	-0.3907	-0.7115
T½α	h	7.71	5.78	2.10	1.97	1.73	1.05	4.70	3.28	2.16	2.06	1.77	0.97

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión, **T½α**: tiempo medio de declinación

5.4.3. PENICILINA G

Las Figuras 83 a 112 presentan las curvas de muerte bacteriana obtenidas para los aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de bovinos portadores de mastitis subclínica (promedio de seis cepas salvajes), como así también de la cepa de referencia ATCC 29213 frente a diferentes CIMs de penicilina G (PenG) en CMH pH 7.4, 6.5 y 5.0; en leche y en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

5.4.3.1. Penicilina G a pH 7.4

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de penicilina G (PenG) a pH 7.4, aunque la cepa de referencia se mostró ligeramente más sensible que los aislamientos obtenidos a campo. La CIM de penicilina G a pH 7.4 fue 0.25 µg/mL, obsérvese en las Figuras 83 y 84 que su actividad frente a *S. aureus* no se vio aumentada al aumentar las concentraciones de Pen G, demostrando su dependencia del tiempo de contacto. Este comportamiento fue luego corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 85 y 86 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (85 A y 86 A). Las curvas en ausencia de penicilina fueron analizadas por el modelo de Gompertz, como así también las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25 CIM (0.066 µg/mL) y a 0.5 CIM (0.125 µg/mL), ya que a esas concentraciones continuó un leve crecimiento bacteriano.

En las Figuras 87 y 88 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de penicilina (1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM, 16xCIM y 32xCIM) a pH 7.4, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todos los casos, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte, siendo el *S. aureus* ATCC 29213 más sensible frente a la penicilina G.

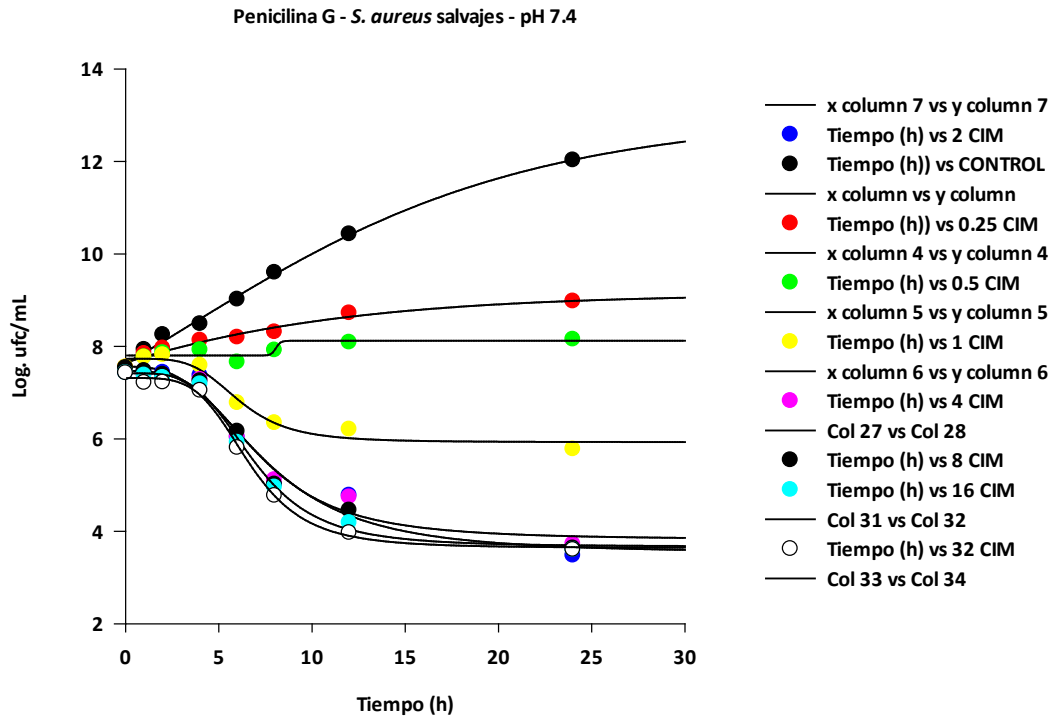


Figura 83. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Penicilina G en CMH pH 7.4.

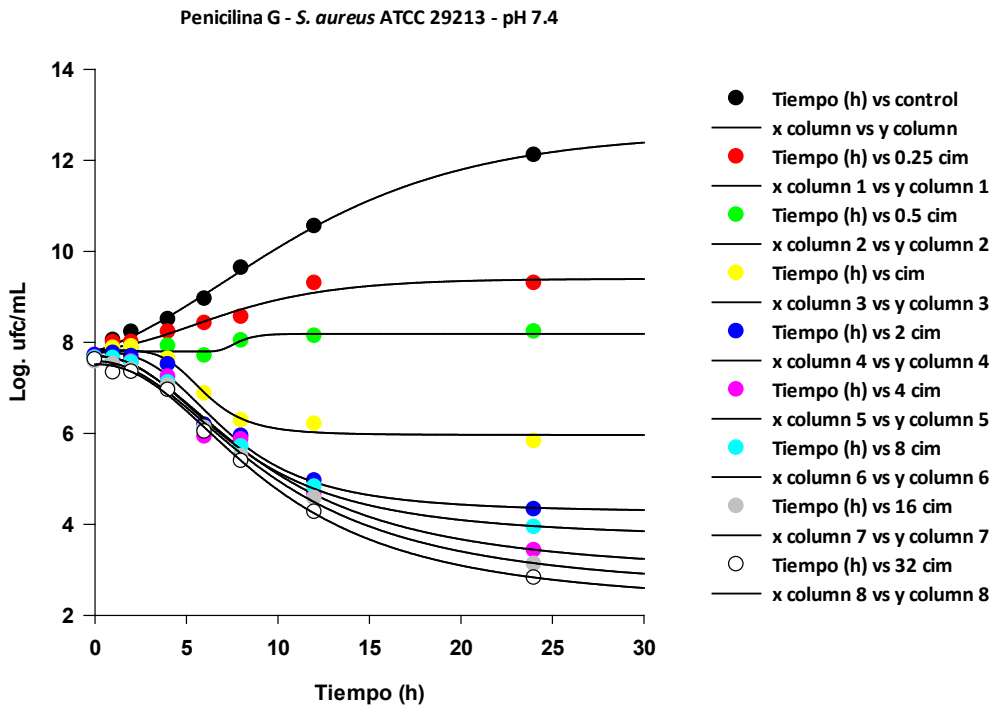


Figura 84. Curvas de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en CMH pH 7.4.

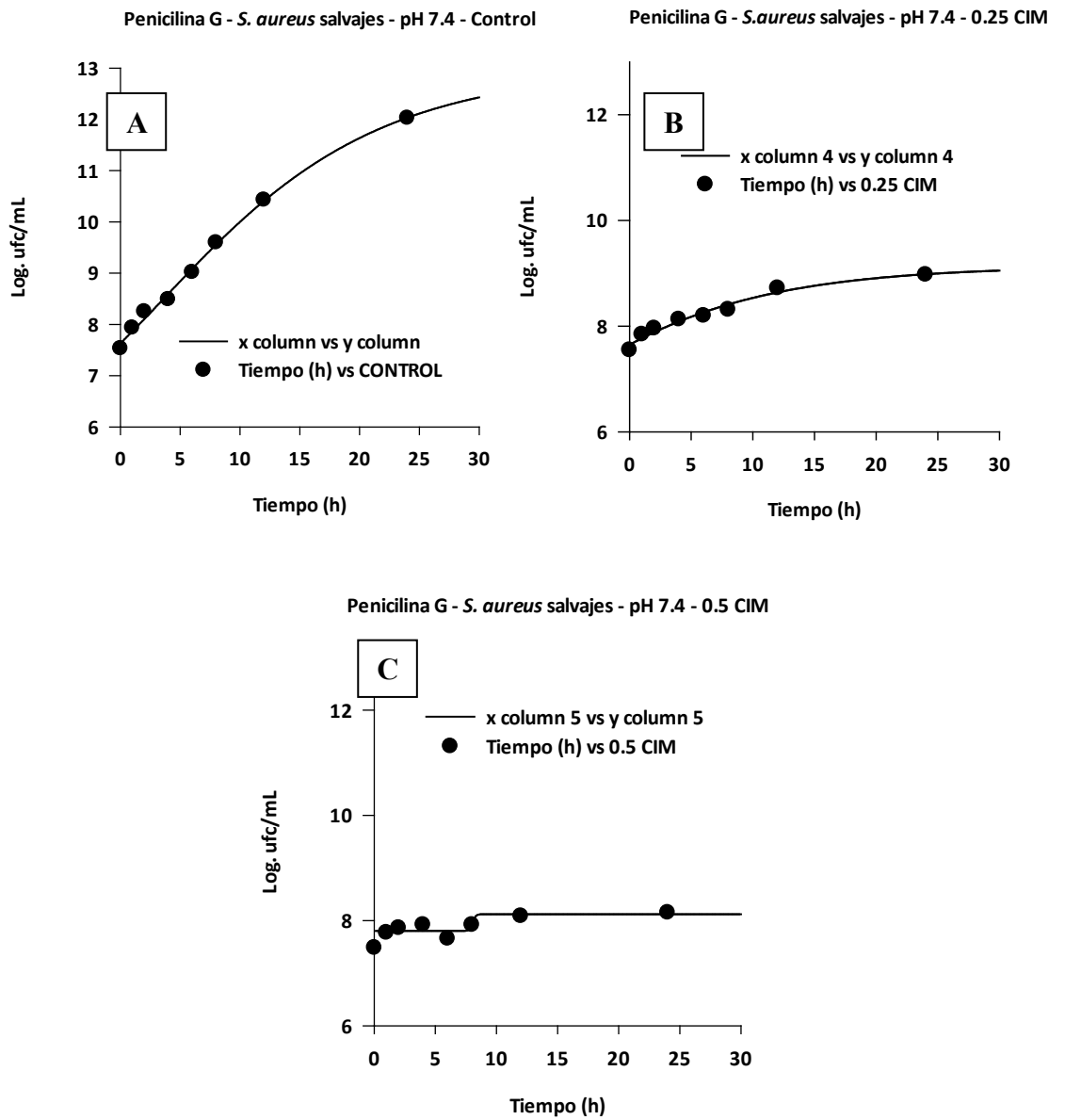


Figura 85. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin penicilina G) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

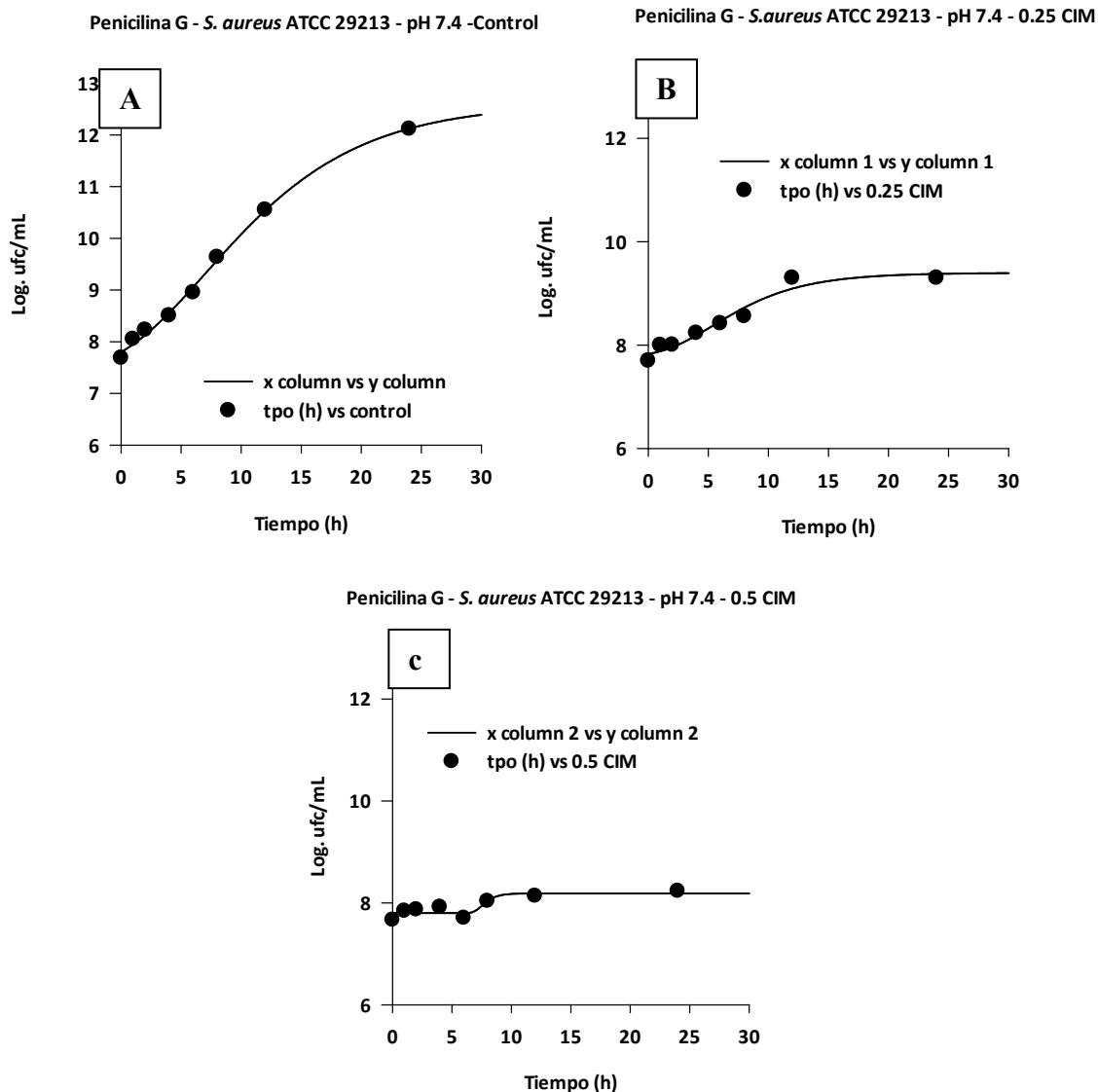


Figura 86. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin penicilina G) en CMH pH 7.4, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 39 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 39. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 sin penicilina G y frente a concentraciones inferiores a la CIM (0.25 µg/mL).

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH pH 7.4			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 7.4		
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM*	0.5 CIM*	control	0.25 CIM	0.5 CIM
R		0.9982	0.9895	0.8478	0.9984	0.9768	0.9026
c	Log ufc/mL	7.02	6.34	0.72	5.20	1.61	0.39
b	h ⁻¹	0.10	0.61	7.06	0.13	0.24	1.43
m	h	3.79	175.32	3.62	7.06	5.39	7.50
a	Log ufc/mL	5.96	7.55	7.49	7.42	7.79	7.80
µ	Log ufc/mL*h	0.25	1.42	1.87	0.25	0.14	0.21
LPD	h	29.25	285.77	0.37	46.62	18.29	4.55
MPD	Log ufc/mL	12.98	13.89	8.21	11.62	9.40	8.19
Kc	h ⁻¹	0.3138	0.0902	0.0401	0.3089	0.0826	0.0423
T½c	h	2.21	7.68	17.28	2.24	8.39	16.38

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **µ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

*0.25 y 0.5 CIM aislados a campo: no se pudieron modelar por Gompertz, se aplicó un análisis sigmoidal.

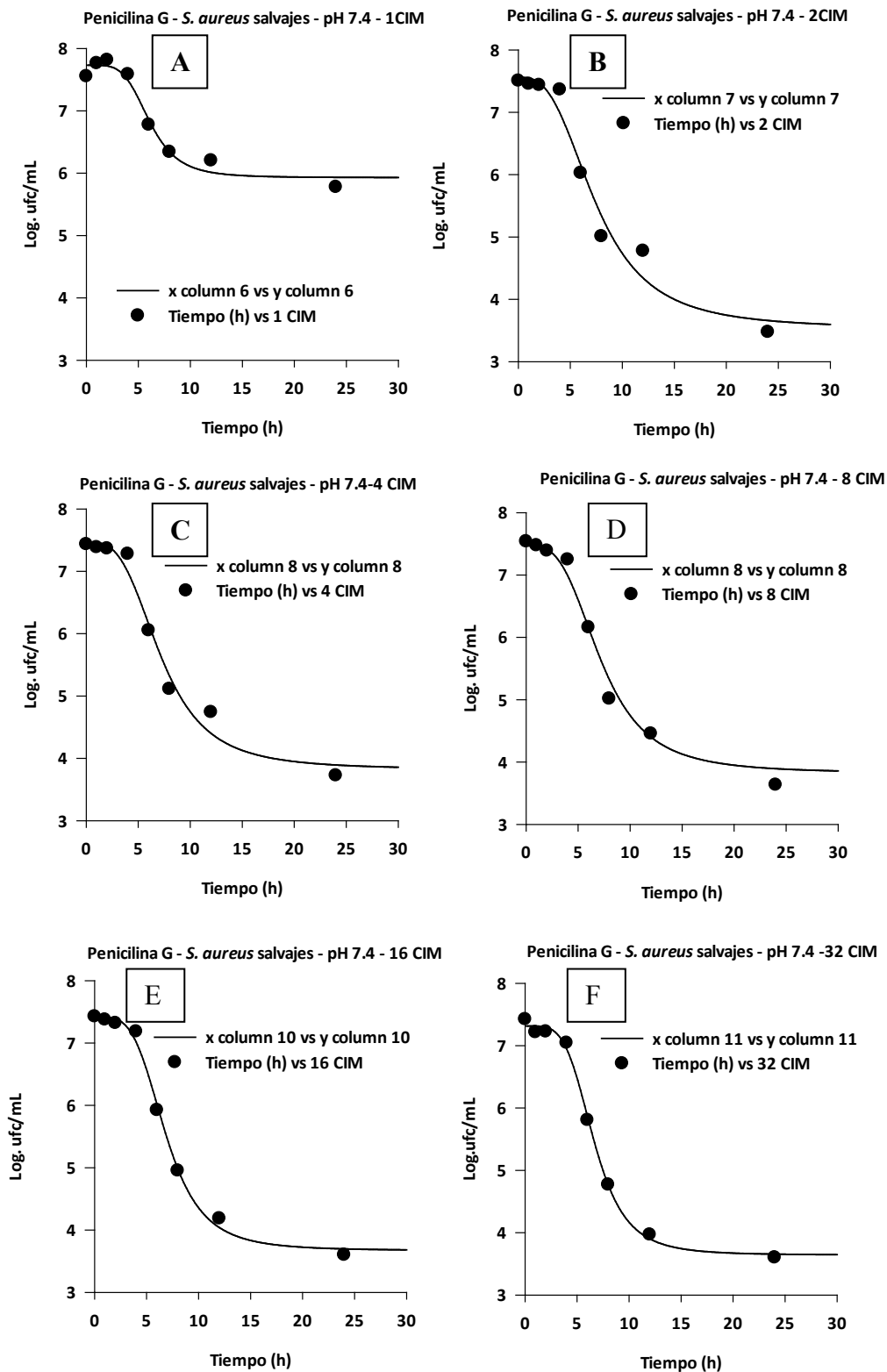


Figura 87. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 32xCIM de PenG (8 µg/mL).

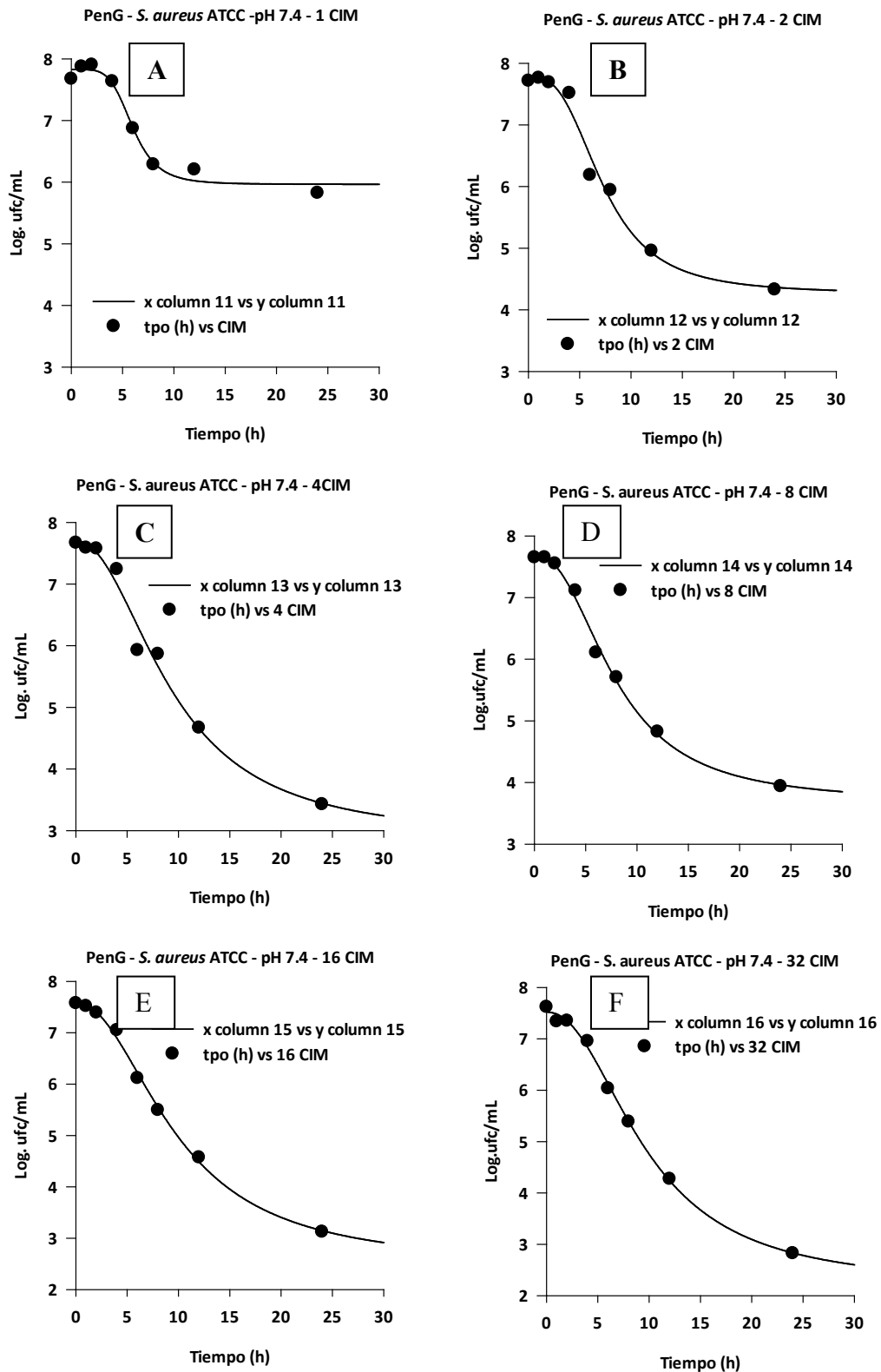


Figura 88. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 7.4. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 32xCIM de PenG (8 µg/mL).

En la Tabla 40 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base.

En la Tabla 40 se puede observar que el TI50 se mantiene relativamente constante aunque la concentración del ATB aumente, oscilando en valores entre 4.31 a 1.76 min, si bien los tiempos son mayores que en Dano, se mantiene la tendencia a la reducción.

Tabla 40. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 7.4 frente a diferentes concentraciones (CIM -0.25 µg/mL-, 2, 4, 8, 16 y 32 veces la CIM) de pencilina G

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - pH 7.4						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – pH 7.4					
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	32 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	32 CIM
R		0.9510	0.9960	0.9961	0.9841	0.9918	0.9645	0.9597	0.9958	0.9926	0.9989	0.9967	0.9787
N _{max}	UFC/mL	600000	3000	5333	4333	4000	4000	666666	21333	2666	8666	1333	667
Y		8.26	11.39	10.40	6.97	9.21	1.37	7.55	9.86	4.28	3.49	2.47	1.15
T ₁₅₀	H	4.49	4.49	4.47	4.21	4.26	2.75	4.32	4.20	3.60	3.02	2.73	1.77
N ₀	UFC/mL	35800000	32200000	27266666	34566667	26700000	26633333	47333333	51866667	46666666	44800000	37600000	41733333
α	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1704	-0.3868	-0.3559	-0.3744	-0.3670	-0.3669	-0.1776	-0.3249	-0.4072	-0.3563	-0.4270	-0.4603
T _{1/2} α	H	4.07	1.79	1.95	1.85	1.89	1.89	3.90	2.15	1.70	1.94	1.62	1.51

Modelo Sigmoidal. N_0 : concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), N_{max} : población bacteriana final, T_{150} : tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, Y : coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. α : pendiente de la regresión. $T_{1/2}\alpha$: tiempo medio de declinación

5.4.3.2. PENICILINA G pH 6.5

Tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron, nuevamente, un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de PenG, pero en este caso a pH 6.5. La CIM en pH 6.5 también fue de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en las Figuras 89 y 90 se puede corroborar su acción dependiente del tiempo. Sin embargo a pH 6.5 pareciera que la PenG presenta mayor acción bactericida, pues a 2, 4, 8 y 16 veces su CIM presenta una acción bactericida fuerte, aunque no muy diferente entre las mayores concentraciones. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 91 y 92 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (Figuras 91 A y 92 A). Las curvas en ausencia de PenG fueron analizadas por el modelo de Gompertz, conjuntamente con las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25 y 0.5 CIM, debido a que frente a esas concentraciones no se evidenció una gran inhibición del crecimiento bacteriano.

En las Figuras 93 y 94 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de PenG a pH 6.5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

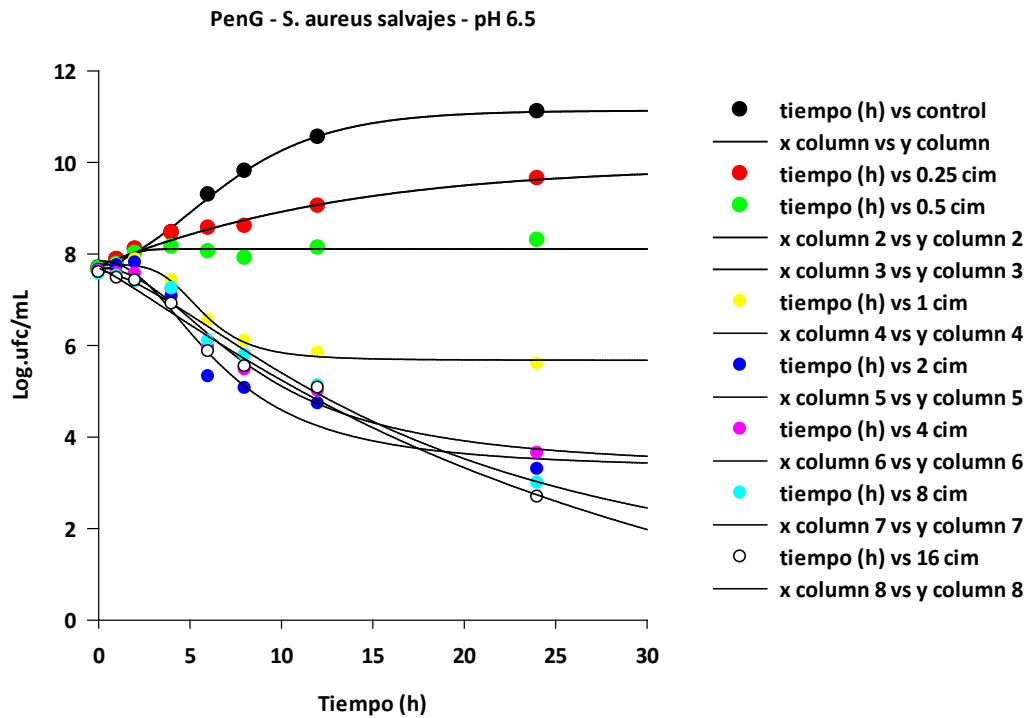


Figura 89. Curvas de muerte bacteriana promedio para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a PenG en CMH pH 6.5.

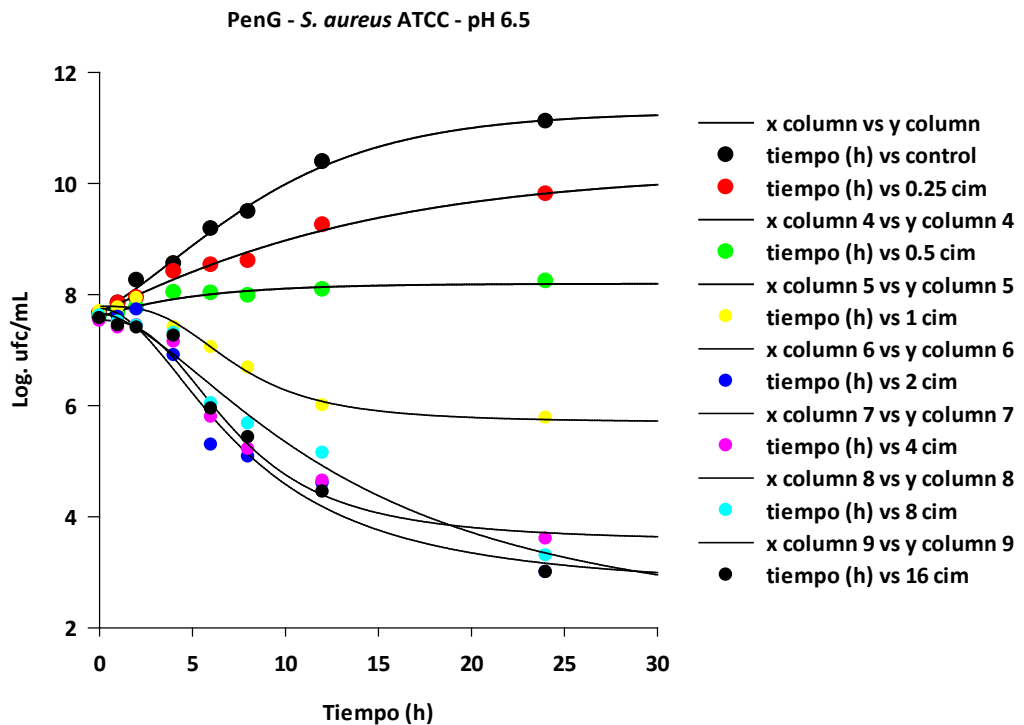


Figura 90. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a PenG en CMH pH 6.5.

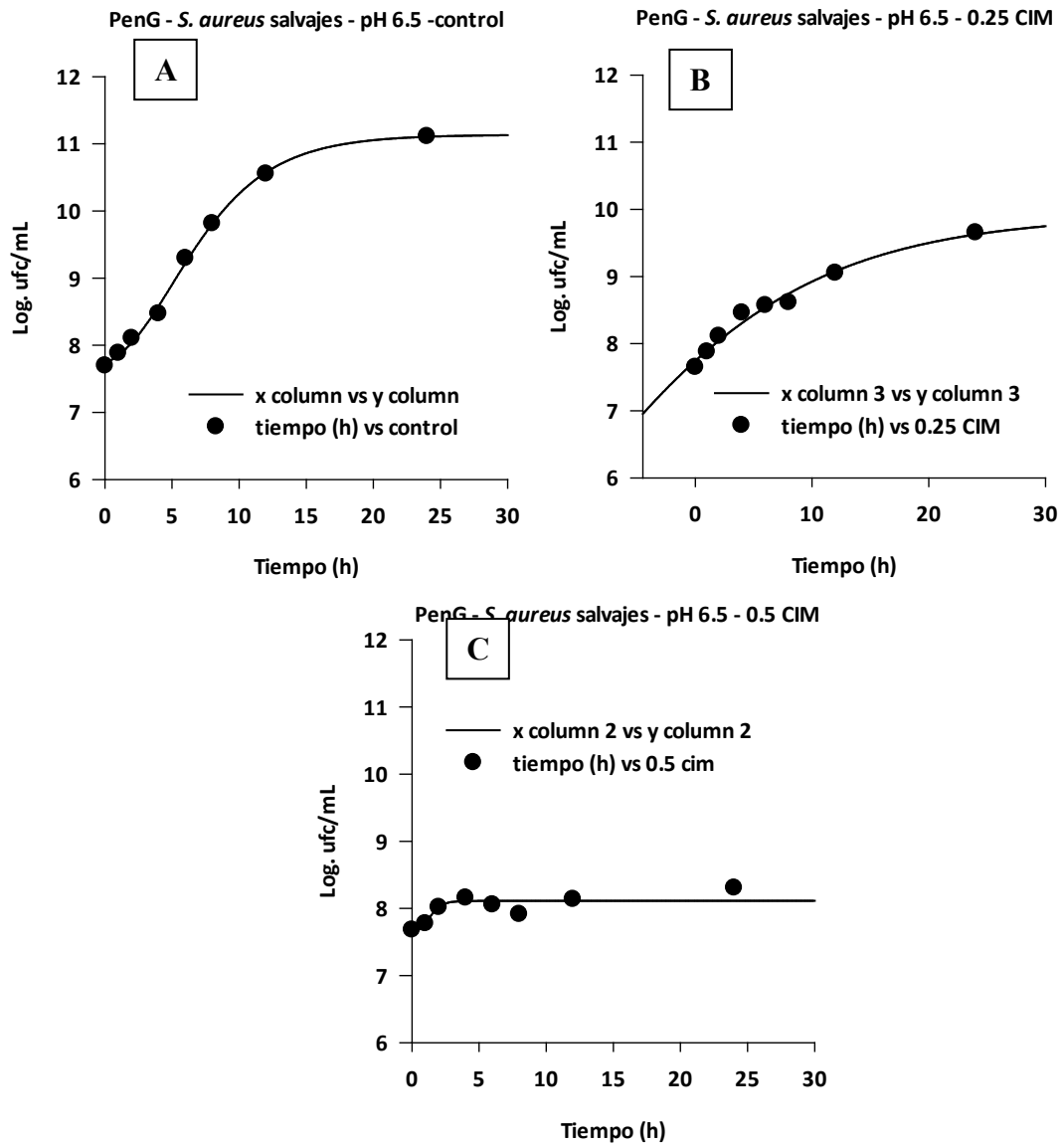
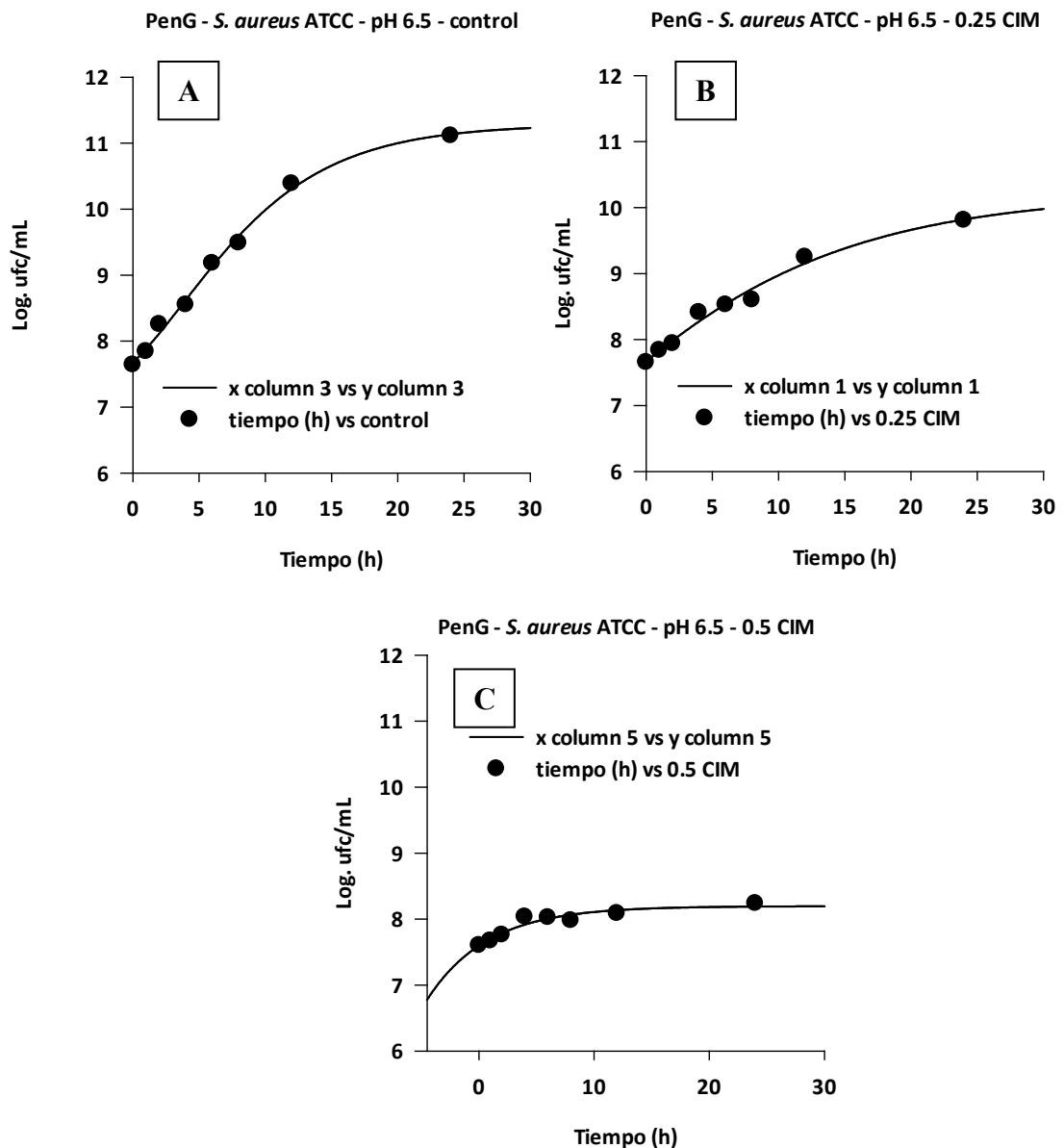


Figura 91. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CMH pH 6.5, C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en CMH pH 6.5.



Figur a 92. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 6.5, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el mismo medio de cultivo que la curva control.

En la Tabla 41 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 41. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH pH 6.5			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 6.5		
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM*	0.5 CIM	control	0.25 CIM	0.5 CIM*
R		0.9989		0.8515	0.9978	0.9922	
c	Log ufc/mL	3.50		0.43	4.24	5.84	
b	h ⁻¹	0.25		1.88	0.17	0.09	
m	h	5.06		1.24	3.93	-6.34	
a	Log ufc/mL	7.63		7.68	7.05	4.38	
μ	Log ufc/mL*h	0.32		0.30	0.26	0.19	
LPD	h	16.13		0.13	17.67	-83.79	
MPD	Log ufc/mL	11.13		8.11	11.29	10.22	
Kc	h ⁻¹	0.1520	0.1362	0.0387	0.1759	0.1418	0.0419
T½c	h	4.56	5.09	17.91	3.94	4.89	16.54

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

*0.25CIM (a campo) y 0.5CIM (ATCC): no se pudieron modelar por Gompertz

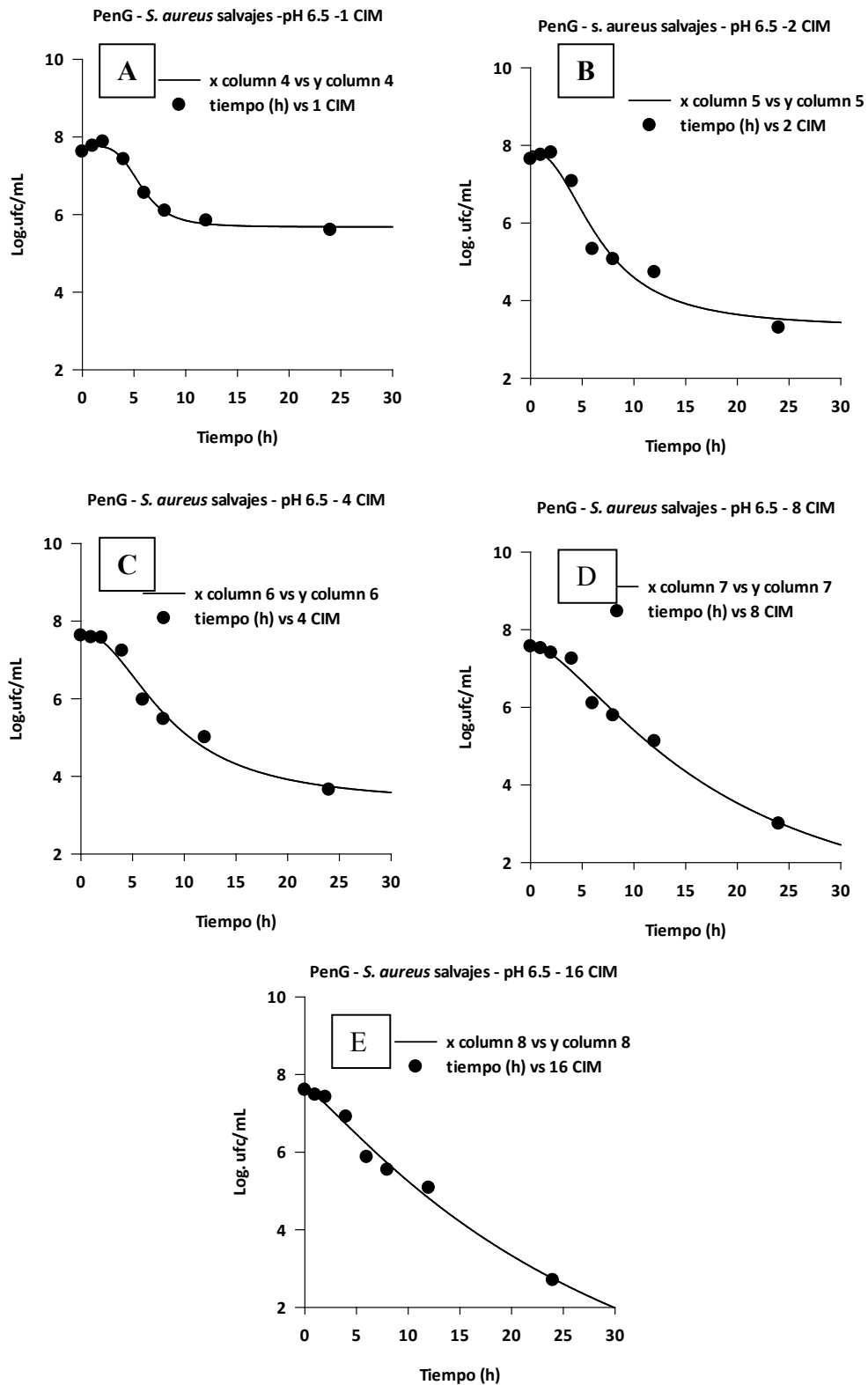


Figura 93. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 2xCIM de PenG (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 4xCIM de PenG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 8xCIM de PenG (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y E: 16xCIM de PenG (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

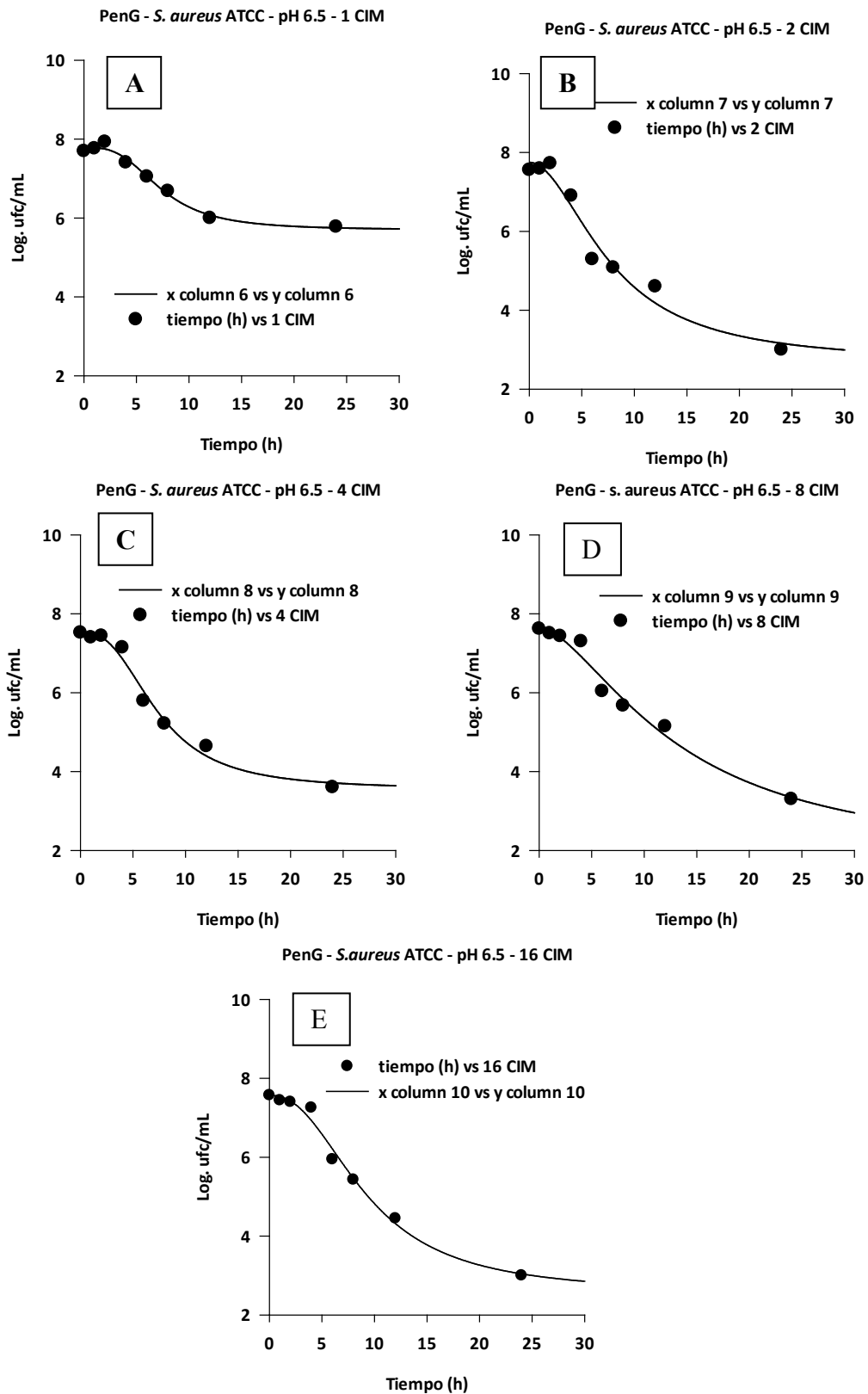


Figura 94. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana del *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 6.5. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 2xCIM de PenG (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 4xCIM de PenG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 8xCIM de PenG (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y E: 16xCIM de PenG (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la Tabla 42 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base. A pH 6.5 el TI50 se encontró por arriba de las 3 h, no variando mucho con el aumento de las concentraciones de penG.

Tabla 42. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 6.5 frente a diferentes concentraciones (CIM -0.25 µg/mL-, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de penicilina G.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - pH 6.5					<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – pH 6.5				
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.9532	0.9807	0.9972	0.9851	0.9905	0.9434	0.9774	0.9881	0.9753	0.9726
Nmax	UFC/mL	400000	2000	4500	1000	500	600000	1000	4000	2000	1000
Y		11.31	26.38	6.45	2.49	2.49	9.89	28.17	8.53	2.09	2.62
T150	h	3.92	3.81	3.83	3.39	2.56	3.78	3.79	3.98	3.30	3.61
N ₀	UFC/mL	41900000	44550000	42600000	37100000	40100000	49600000	36000000	33200000	41600000	37200000
α	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1939	-0.4172	-0.3815	-0.4385	-0.4706	-0.1840	-0.4372	-0.3761	-0.4144	-0.4386
T _{1/2} α	h	3.77	1.66	1.82	1.58	1.47	3.77	1.59	1.84	1.67	1.58

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α** : pendiente de la regresión. **T_{1/2} α** : tiempo medio de declinación

5.4.3.3. PENICILINA G pH 5

La CIM para PenG a pH 5 fue 0.125 µg/mL, en las Figuras 94 y 95 se evidencia nuevamente su acción dependiente del tiempo de contacto, pero además a este pH aumentó notablemente su actividad frente al *Staphylococcus aureus*, ya que la CIM fue varias veces inferior a lo observado a los pH 7.4 y 6.5. Nótese que a partir de 0.5 CIM la PenG presenta actividad frente al *S. aureus*, tornándose más evidente a mayores concentraciones, para a partir de 4 veces la CIM no mostrar mayor eficacia. Este comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 97 y 98 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. Las curvas en ausencia de PenG fueron analizadas por el modelo de Gompertz.

En las Figuras 99 y 100 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de PenG a pH 5, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. A todas las concentraciones, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

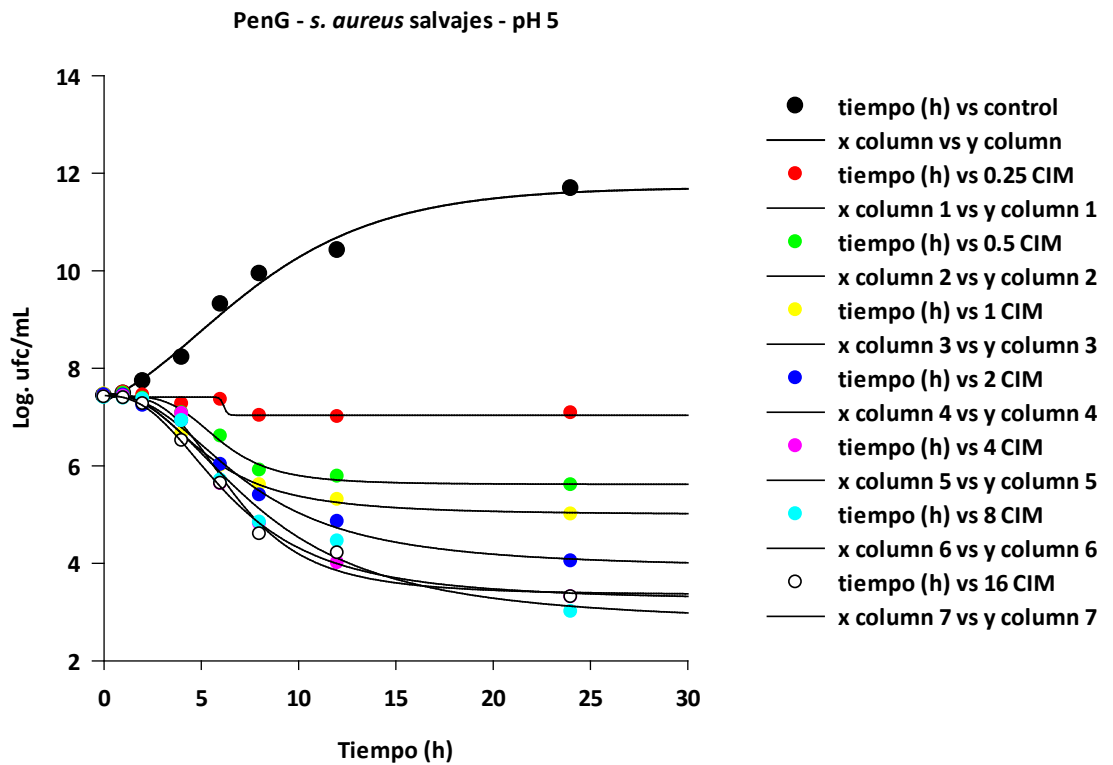


Figura 97. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a PenicilinaG en CMH pH 5.

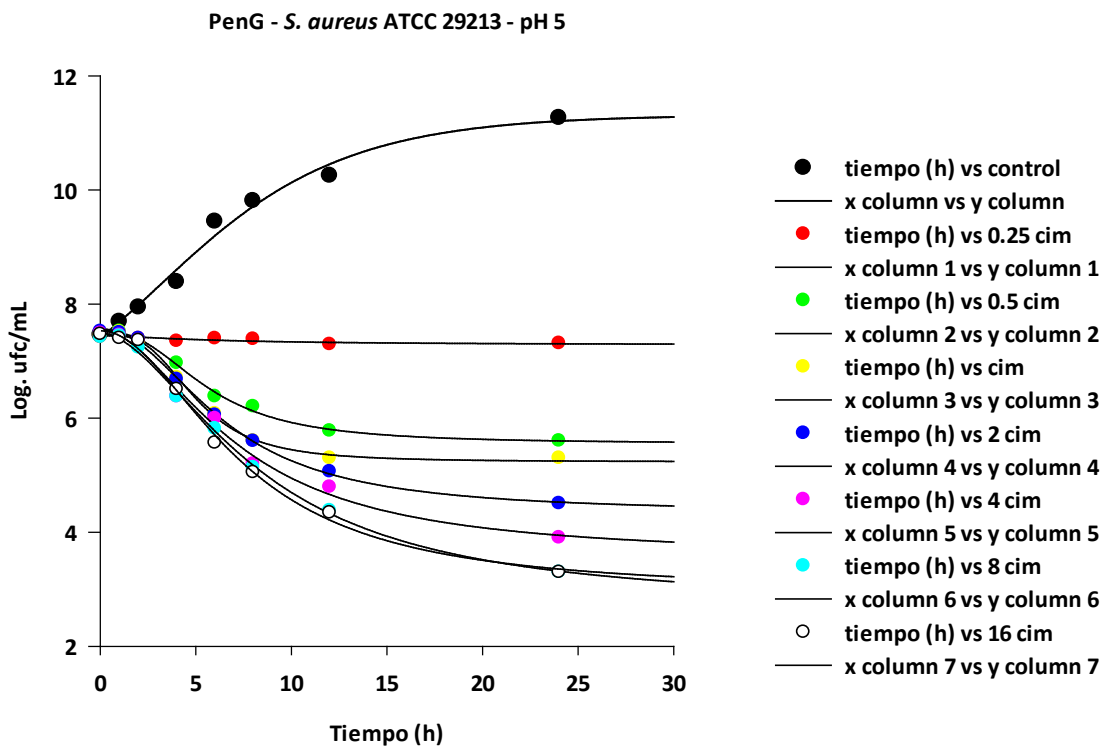


Figura 98. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en CMH pH 5.

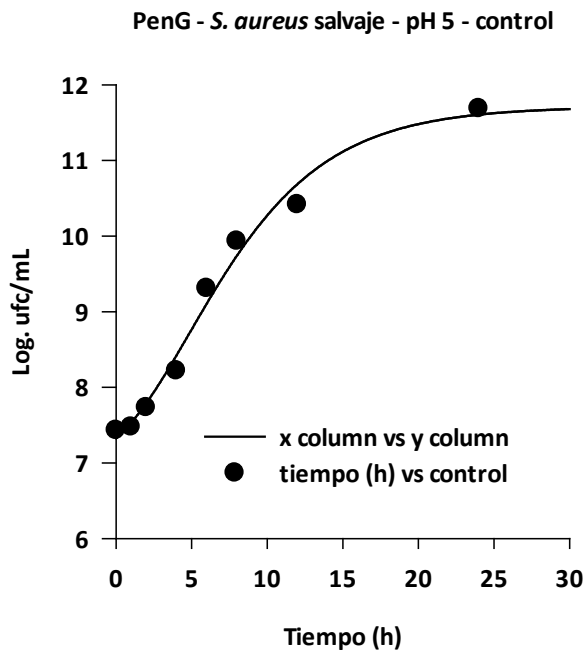


Figura 99. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 5

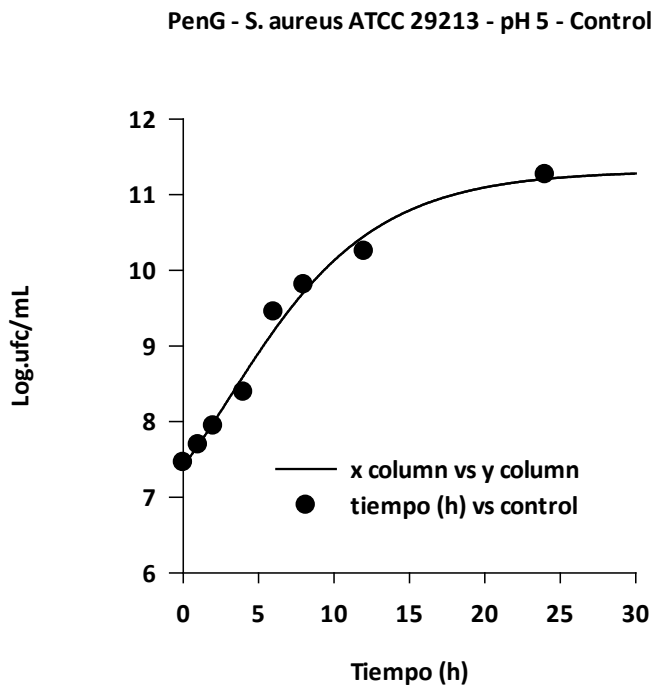


Figura 100. Modelado de Gompertz realizado a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH pH 5.

En la Tabla 43 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 43. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 sin Penicilina G.

		<i>S. aureus</i> salvajes – CMH pH 5	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – CMH pH 5
Parámetros	Unidad	control	control
R		0,9936	0,9936
c	Log ufc/mL	4.73	4.71
b	h ⁻¹	0.20	0.18
m	h	4.87	3.14
a	Log ufc/mL	6.98	6.60
μ	Log ufc/mL*h	0.35	0.31
LPD	h	19.35	11.89
MPD	Log ufc/mL	11.71	11.31
Kc	h ⁻¹	0.2518	0.2076
T½c	h	2.75	3.38

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares. Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno

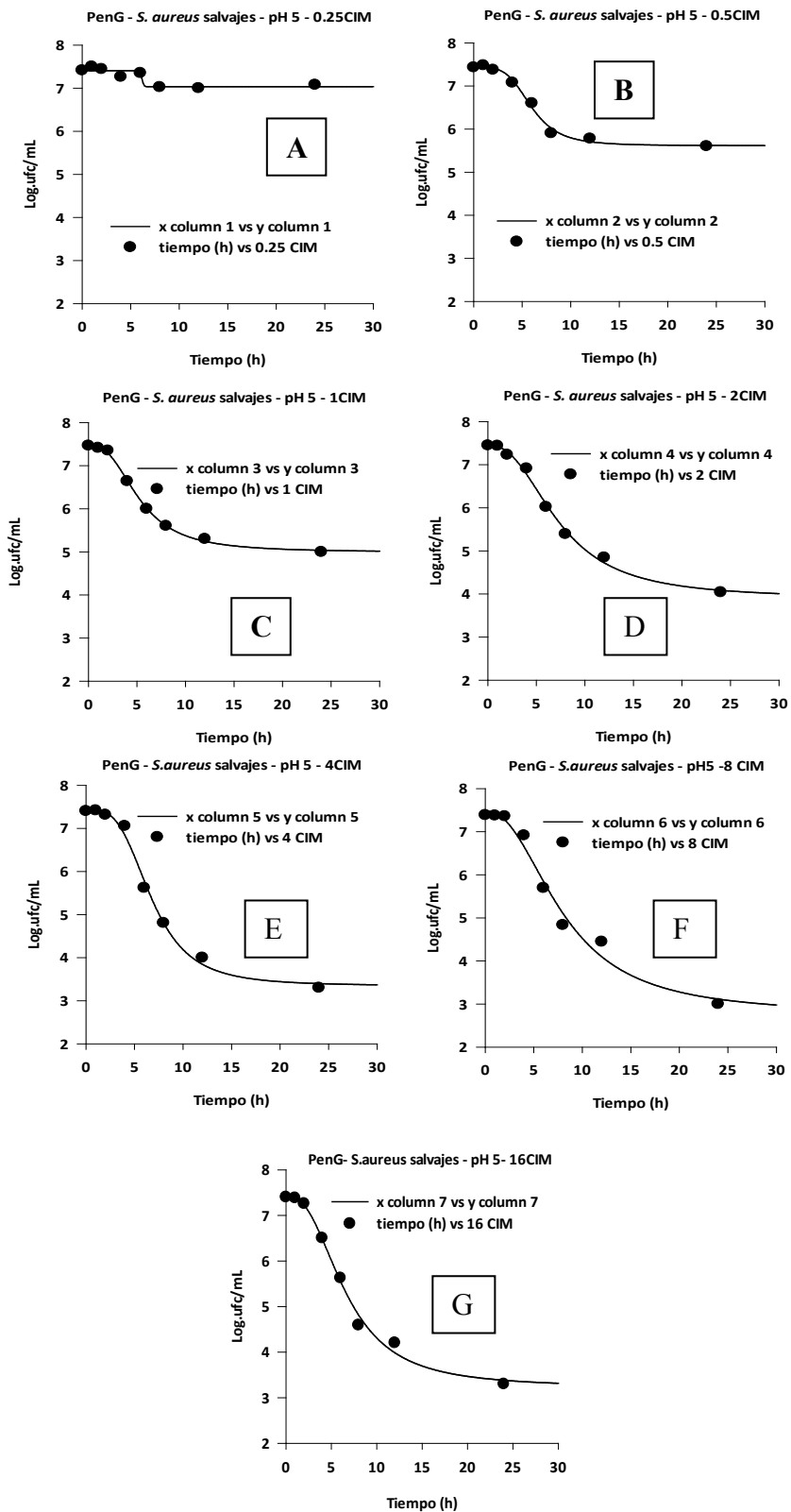


Figura 101. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH pH 5. A: 0.25xCIM; B: 0.5xCIM; C: 1xCIM (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$); D: 2xCIM; E: 4xCIM; F: 8xCIM y G: 16xCIM de PenG respectivamente.

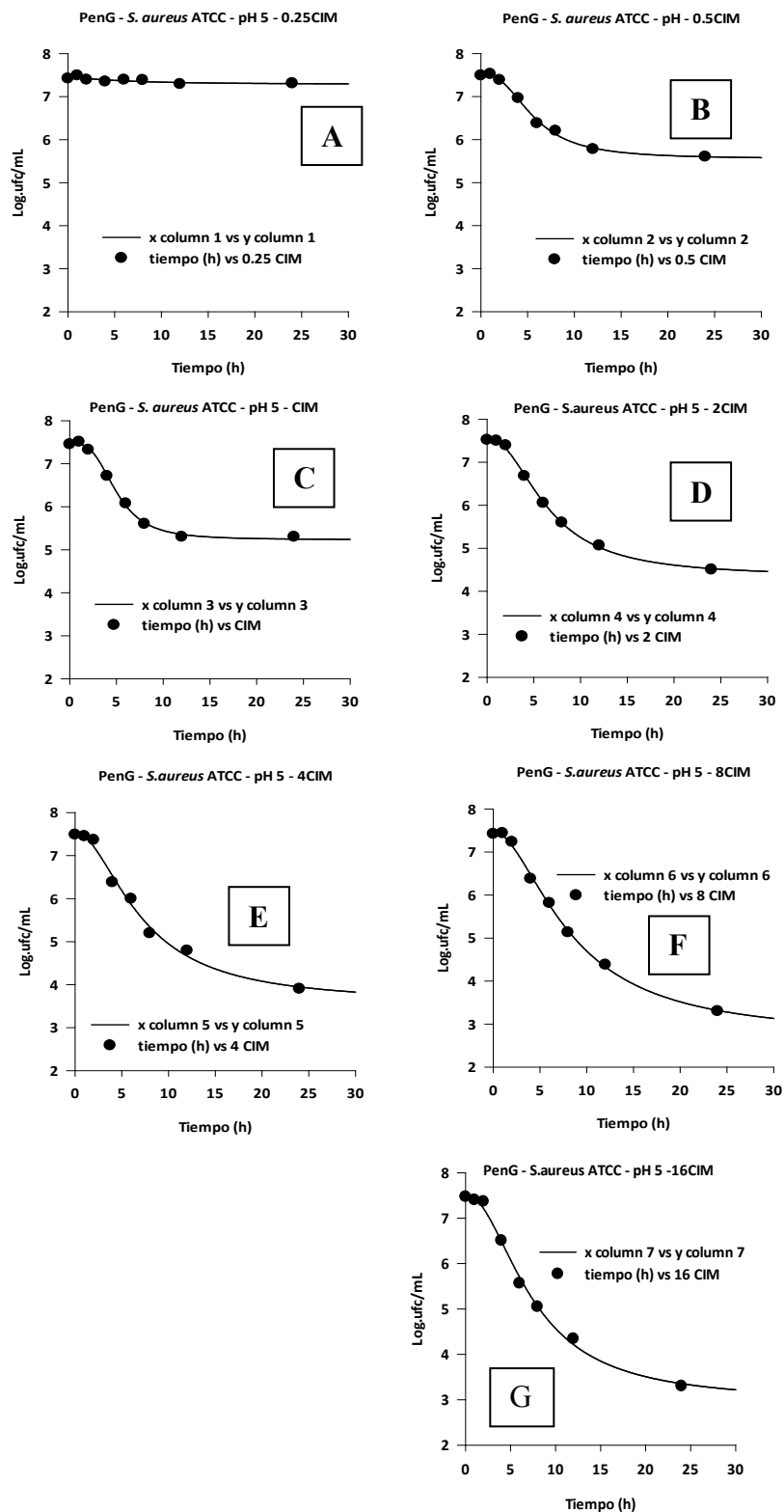


Figura 102. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH pH 5. A: 0.25xCIM; B: 0.5xCIM; C: 1xCIM (0.125 $\mu\text{g/mL}$); D: 2xCIM; E: 4xCIM; F: 8xCIM y G: 16xCIM de PenG respectivamente.

En la Tabla 44 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base. A este pH, los valores TI50 se mantienen estables a partir de la CIM.

Tabla 44. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH pH 5 frente a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de Penicilina G

Parámet.	Unidad	<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - pH 5							<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – pH 5						
		0.25CIM	0.5CIM	1CIM	2CIM	4CIM	8CIM	16CIM	0.25CIM	0.5CIM	1CIM	2CIM	4CIM	8CIM	16CIM
R		0.9159	0.9960	0.9982	0.9953	0.9934	0.9997	0.9999	0.7979	0.9975	0.9953	0.9998	0.9990	0,9991	0.9963
N _{max}	UFC/mL	12000000	400000	100000	11000	2000	1000	2000	20400000	400000	200000	32000	8000	2000	2000
Y		2.74	3.35	4.34	2.55	3.71	5.83	4.15	1.57	3.28	3.90	4.13	5.24	4.52	5.22
T ₁₅₀	h	4.80	3.56	2.73	2.53	3.60	3.57	2.54	5.01	2.89	2.53	2.62	2.53	2.26	2.73
N ₀	UFC/mL	26000000	27000000	29200000	28000000	25400000	24400000	25200000	26400000	31200000	28400000	33200000	30800000	26400000	29600000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.0322	-0.1755	-0.2366	-0.3268	-0.3938	-0.4210	-0.3935	-0.0107	-0.1816	-0.2065	-0.2894	-0.3441	-0.3954	-0.4002
T½α	h	21.52	3.95	2.93	2.12	1.76	1.65	1.76	64.77	3.82	3.36	2.39	2.01	1.75	1.73

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α**: pendiente de la regresión. **T½α**: tiempo medio de declinación.

5.4.3.4. Efecto de la leche sobre la actividad de Pencilina G

Penicilina G en leche, cuyo pH se encuentra entre 6.5-6.8, presentó cierta actividad frente al *S. aureus* a 0.5 CIM enlenteciendo su crecimiento. A partir de la CIM en leche (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comenzó a ejercer inhibición sobre el crecimiento microbiano. En las Figuras 103 y 104 se puede observar claramente lo mencionado, comportamiento fue corroborado con el modelado matemático.

En las Figuras 105 y 106 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (105 A y 106 A). Puede verse que el crecimiento del *S. aureus* en leche se ve alterado. Las curvas en ausencia de PenG fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25xCIM y 0.5xCIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En las Figuras 107 y 108 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de PenG en leche bovina, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

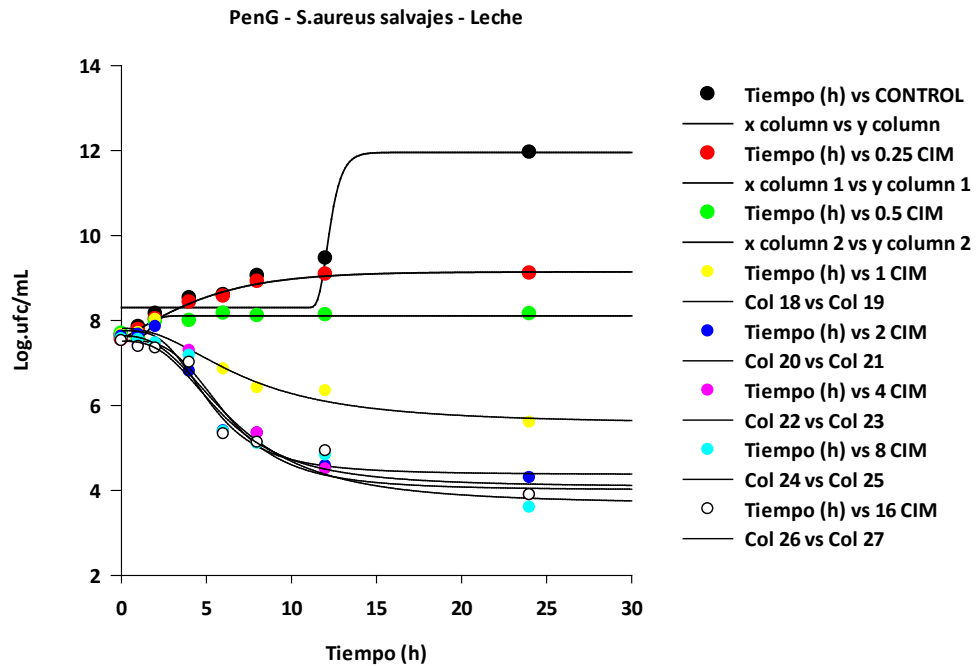


Figura 101. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a Penicilina G en leche.

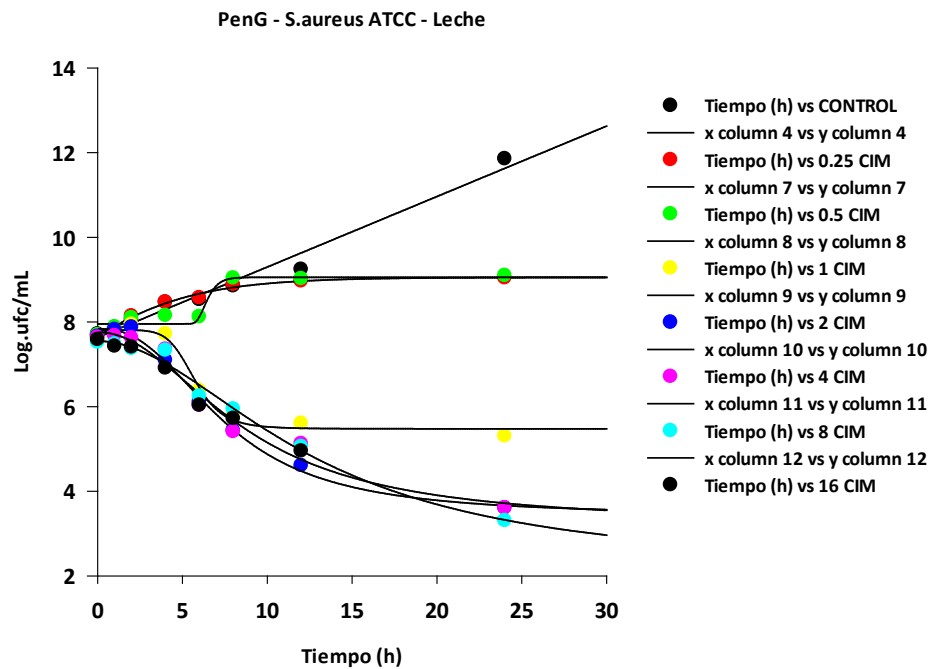


Figura 102. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a Penicilina G en leche.

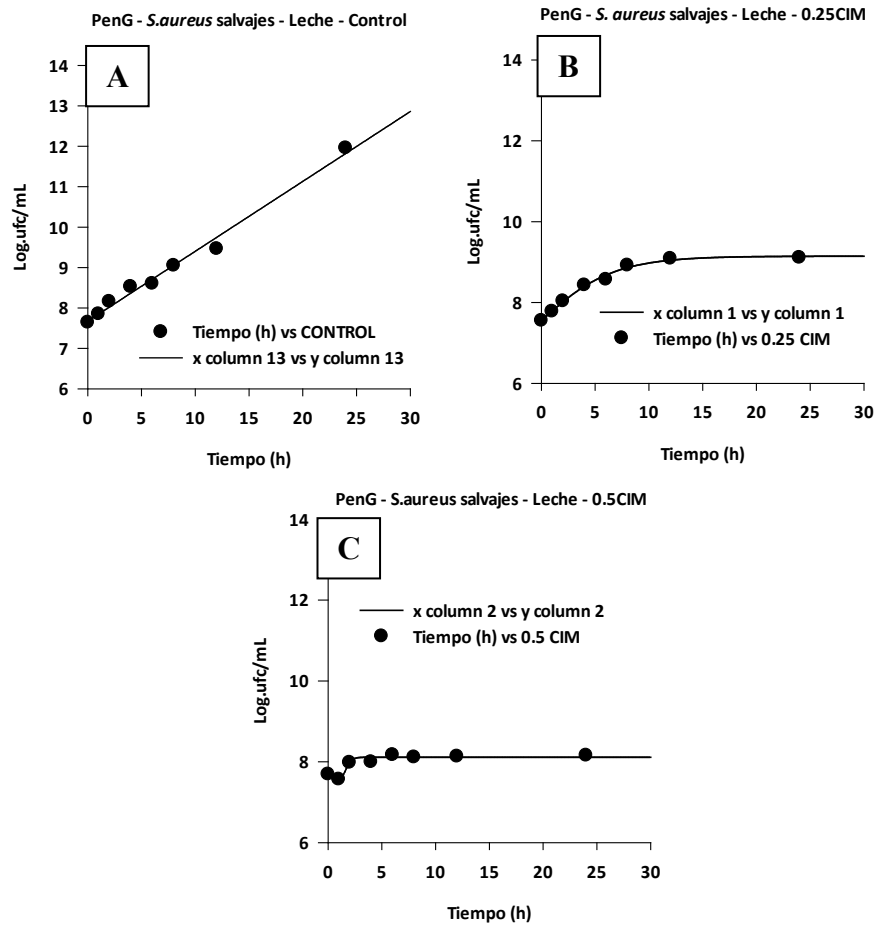


Figura 103. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en leche y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

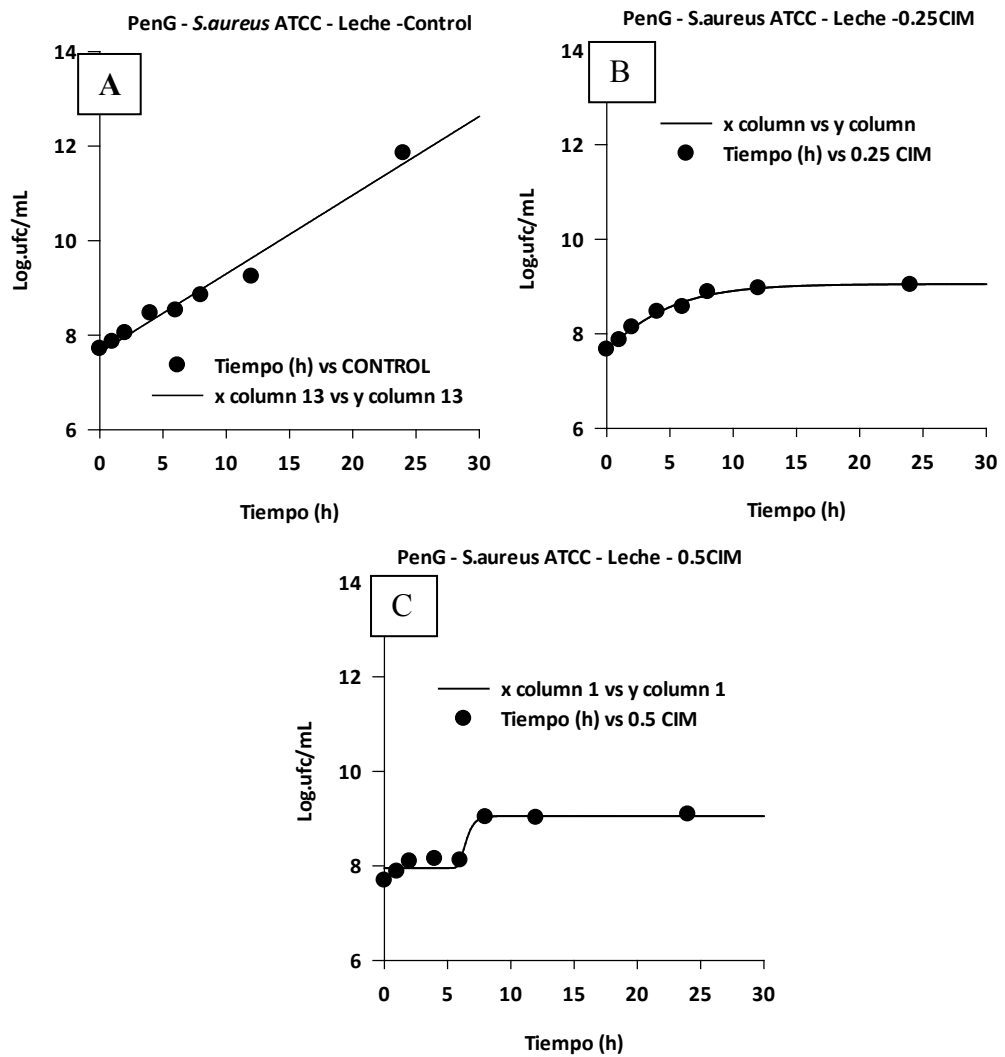


Figura 104. Modelado de Gompertz realizado al *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en leche, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 $\mu\text{g/mL}$) en leche y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 $\mu\text{g/mL}$).

En la Tabla 45 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 45. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en leche sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – Leche			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – Leche		
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM	0.5 CIM	Control*	0.25 CIM	0.5 CIM
R		0.9468	0.9962	0.9622	0.9779	0.9955	0.9695
c	Log ufc/mL	3.65	2.33	0.48		2.84	1.10
b	h ⁻¹	2.06	0.27	3.25		0.26	2.26
m	h	12.07	0.51	1.66		-1.48	6.28
a	Log ufc/mL	8.30	6.82	7.63		6.25	7.95
μ	Log ufc/mL*h	2.76	0.23	0.58		0.26	0.91
LPD	h	5.39	0.05	1.98		-0.14	5.22
MPD	Log ufc/mL	11.99	1.29	4.65		-3.40	18.39
Kc	h ⁻¹	0.4739	0.0654	0.0268	0.4961	0.0617	0.0670
T½c	h	1.46	10.59	25.86	1.40	11.23	10.34

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

**S.aureus* ATCC en leche sin penicilina (control) no pudo ser modelado por Gompertz

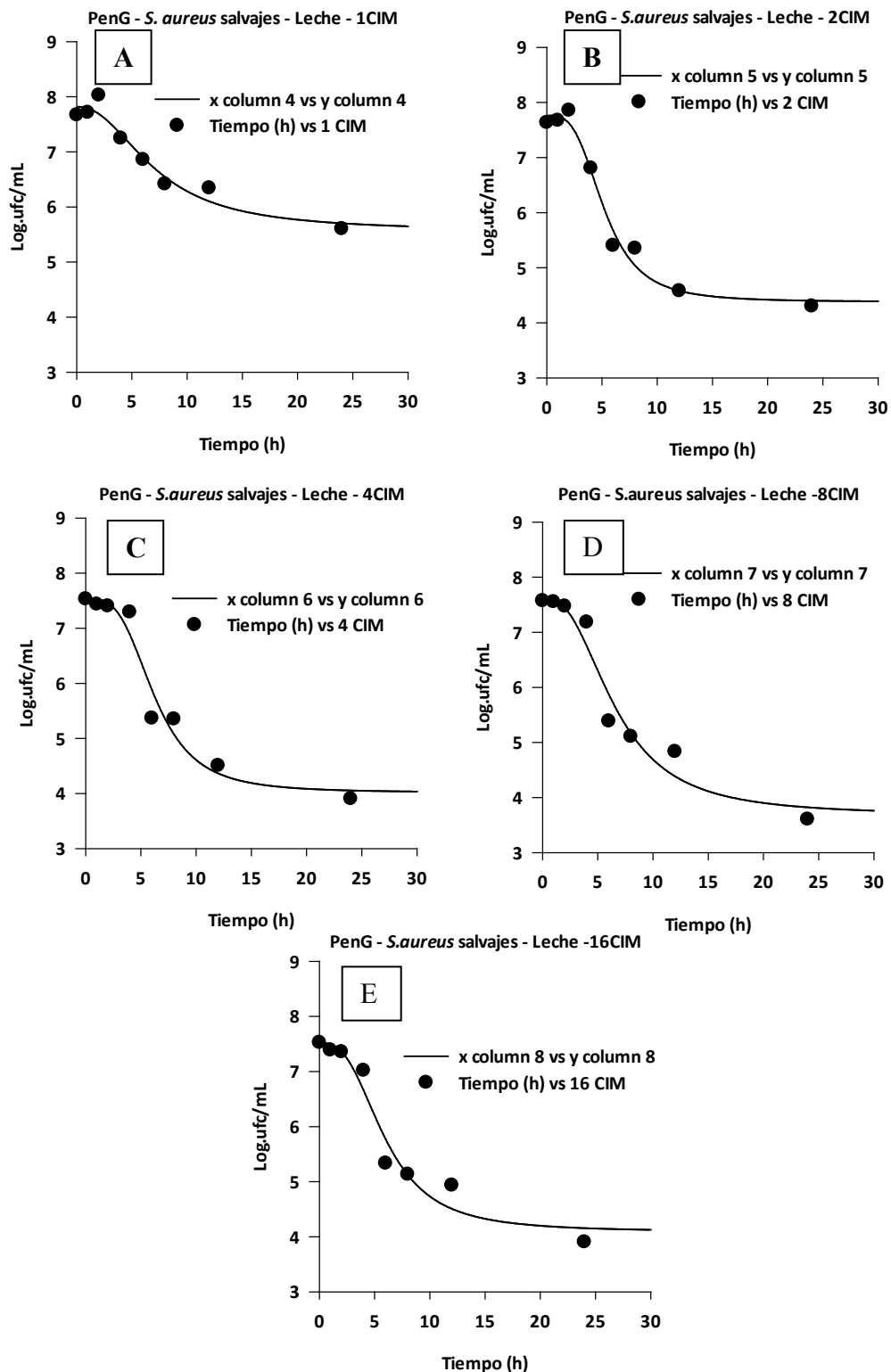


Figura 105. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en leche. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y, E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

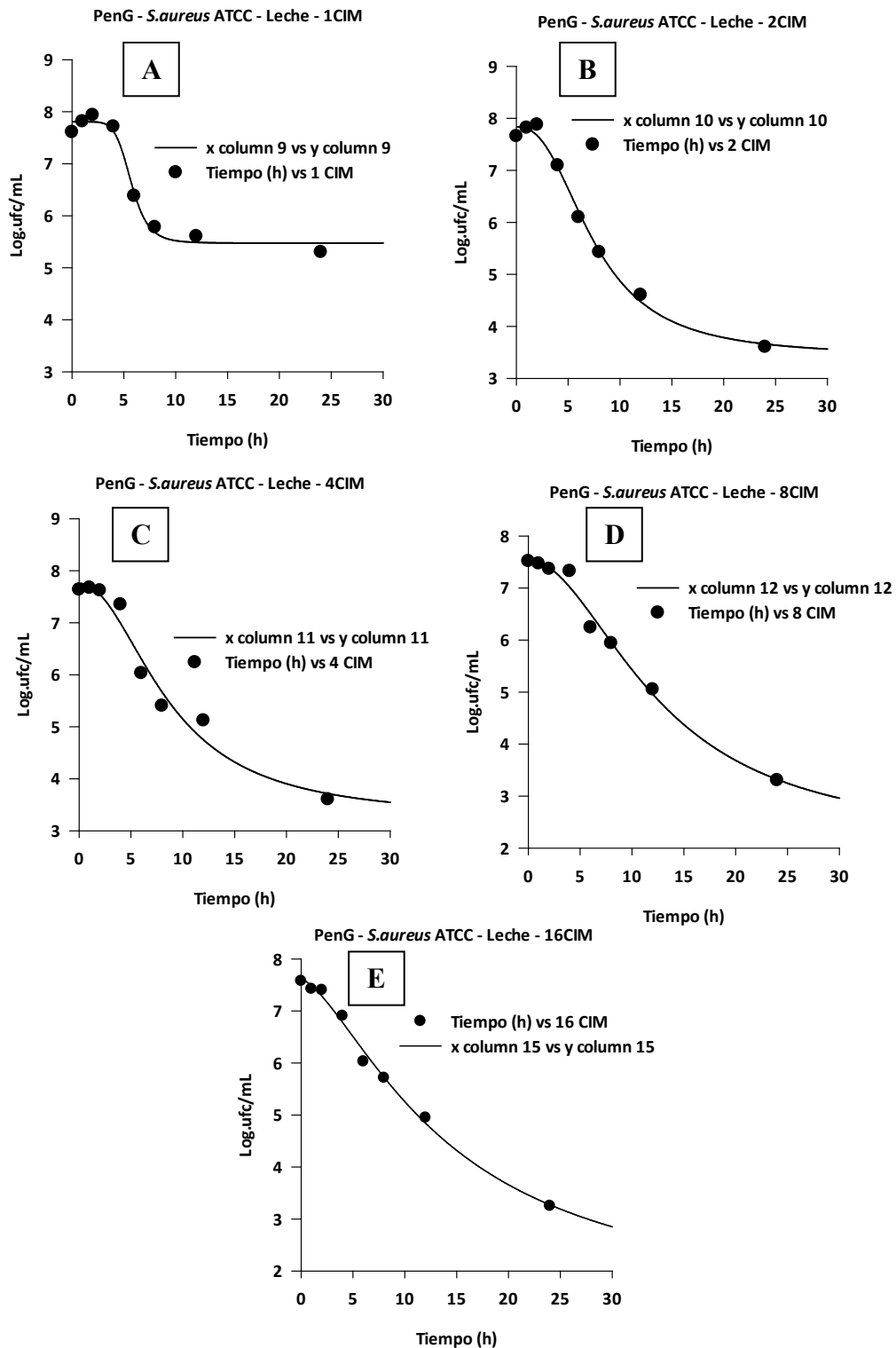


Figura 106. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en leche. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL) y, E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL).

En la Tabla 46 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base. En este caso TI50 osciló alrededor de las 4 h, excepto a 16 CIM, donde se necesitó un menor tiempo para inhibir el 50% del inóculo bacteriano (entre 2.6-2.8 h).

Tabla 46. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en leche frente a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8 y 16 veces la CIM) de Penicilina G.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH - Leche					<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – Leche				
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM
R		0.8774	0.9567	0.9857	0.9943	0.9841	0.9862	0.9666	0.9979	0.9832	0.9849
N _{max}	Log UFC/mL	400000	20000	8000	4000	8000	200000	4000	4000	2000	0
Y		18.27	32.54	14.35	3.59	2.25	-11.02	21.20	8.43	9.43	2.23
T ₁₅₀	h	3.74	3.76	4.22	3.48	2.82	4.29	3.74	4.02	4.47	2.57
N ₀	Log UFC/mL	46400000	42800000	34000000	37200000	33600000	40400000	45200000	43200000	32800000	37600000
<i>a</i>	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.1981	-0.3196	-0.3482	-0.3808	-0.3477	-0.2212	-0.3889	-0.3870	-0.4044	-0.5049
<i>T½_a</i>	h	3.50	2.17	1.99	1.82	1.99	3.13	1.78	1.79	1.71	1.37

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. ***a***: pendiente de la regresión, ***T½_a***: tiempo medio de declinación

5.4.3.5. Efecto del suero sobre la actividad de Penicilina G

La CIM de PenG para *S. aureus* cuando el CMH fue suplementado con 40% de suero bovino fue igual que la CIM obtenida en CMH a pH 7.4 (0.5 µg/mL). En las Figuras 107 y 108 se presentan las curvas de crecimiento y de letalidad bacteriana para las cepas aisladas a campo y para la cepa de referencia, respectivamente.

En las Figuras 109 y 110 se presentan las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente (109 A y 110 A). Las curvas en ausencia de PenG fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.25xCIM y 0.5xCIM, debido a que continuó el crecimiento bacteriano, aunque de manera mucho más lenta en comparación a la curva control.

En las Figuras 111 y 112 se presentan las curvas de muerte bacteriana para los aislamientos salvajes y de referencia, respectivamente. El modelado de las mismas, en presencia de diferentes concentraciones de PenG en CMH suplementado con 40 % de suero bovino, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

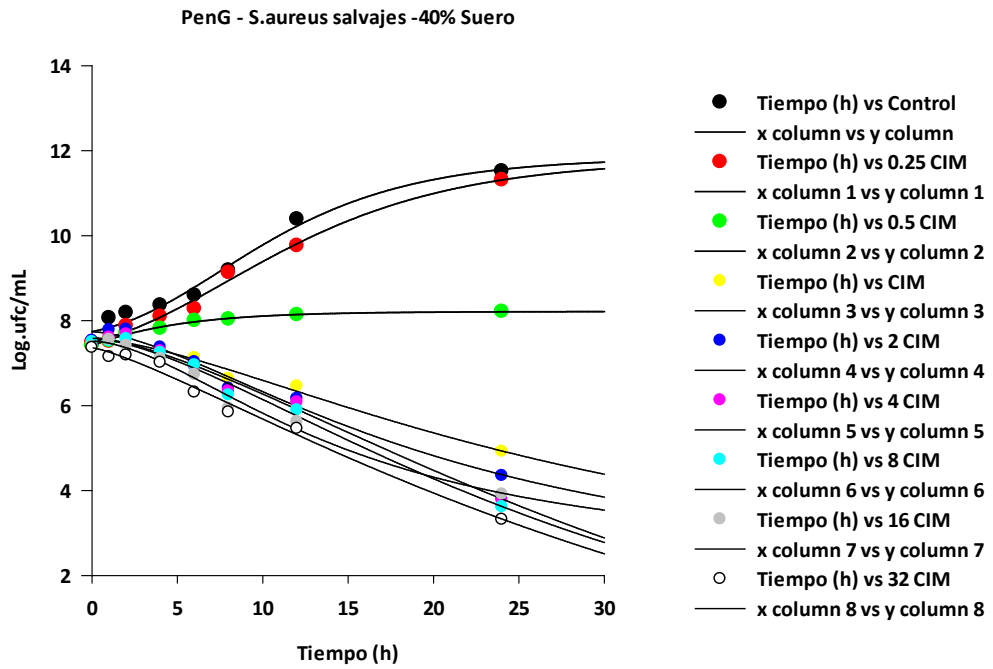


Figura 107. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para las cepas de *Staphylococcus aureus* (n=6) aisladas de bovinos portadores de mastitis subclínica frente a PenG en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

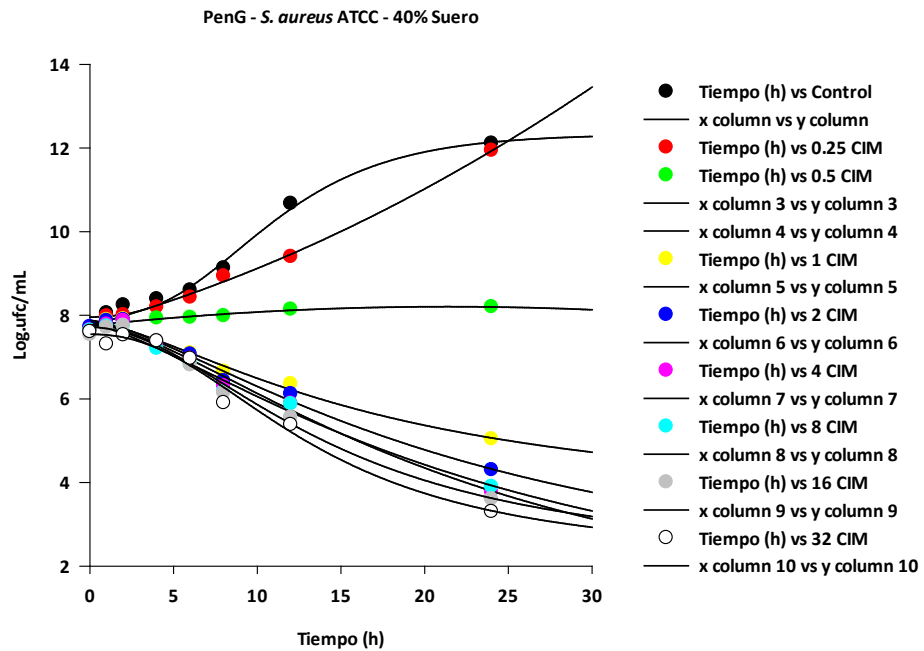


Figura 108. Curvas de crecimiento y de muerte bacteriana promedios para el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente a PenG en CMH suplementado con 40% de suero bovino.

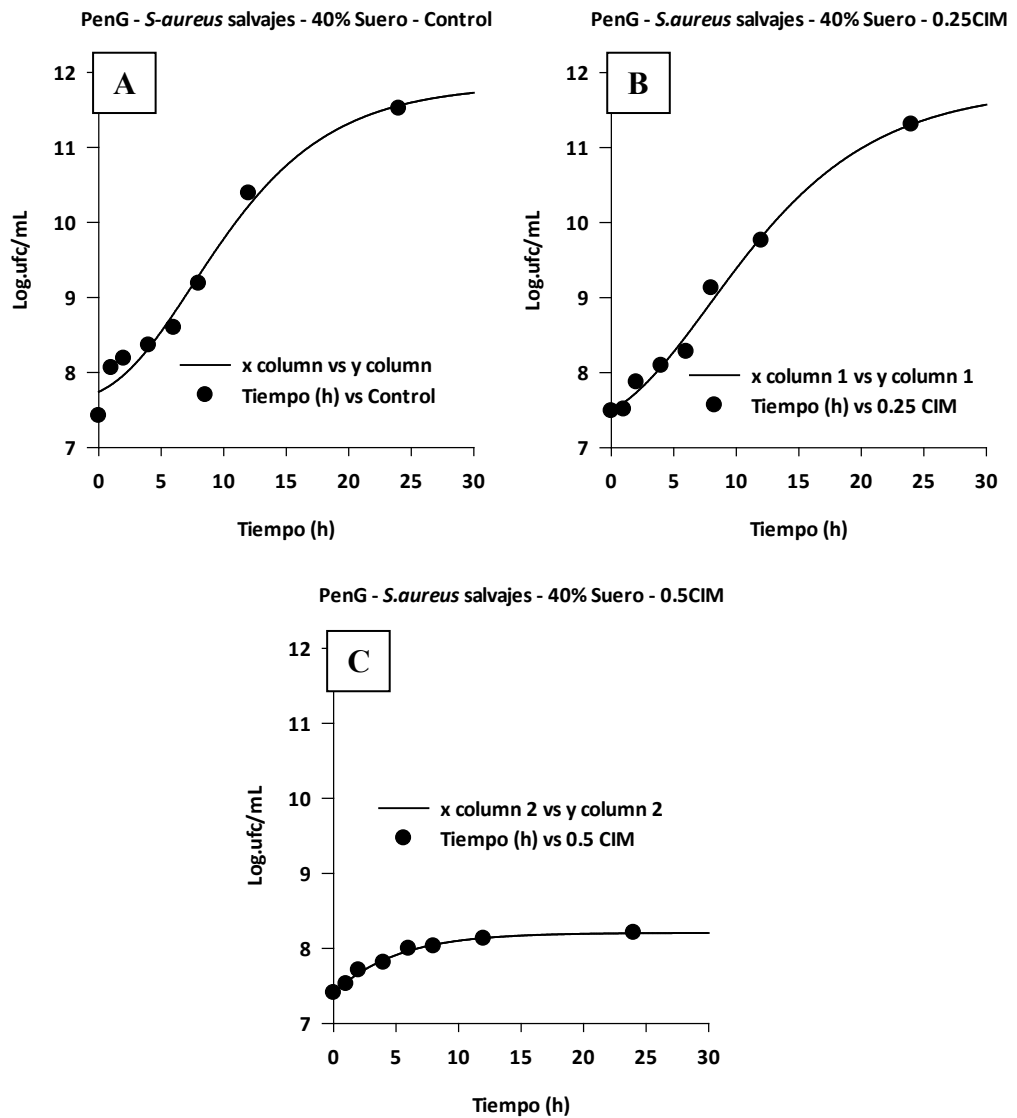


Figura 109. Modelado de Gompertz realizado a los aislamientos salvajes de *S. aureus*, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en CMH-40% suero bovino y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

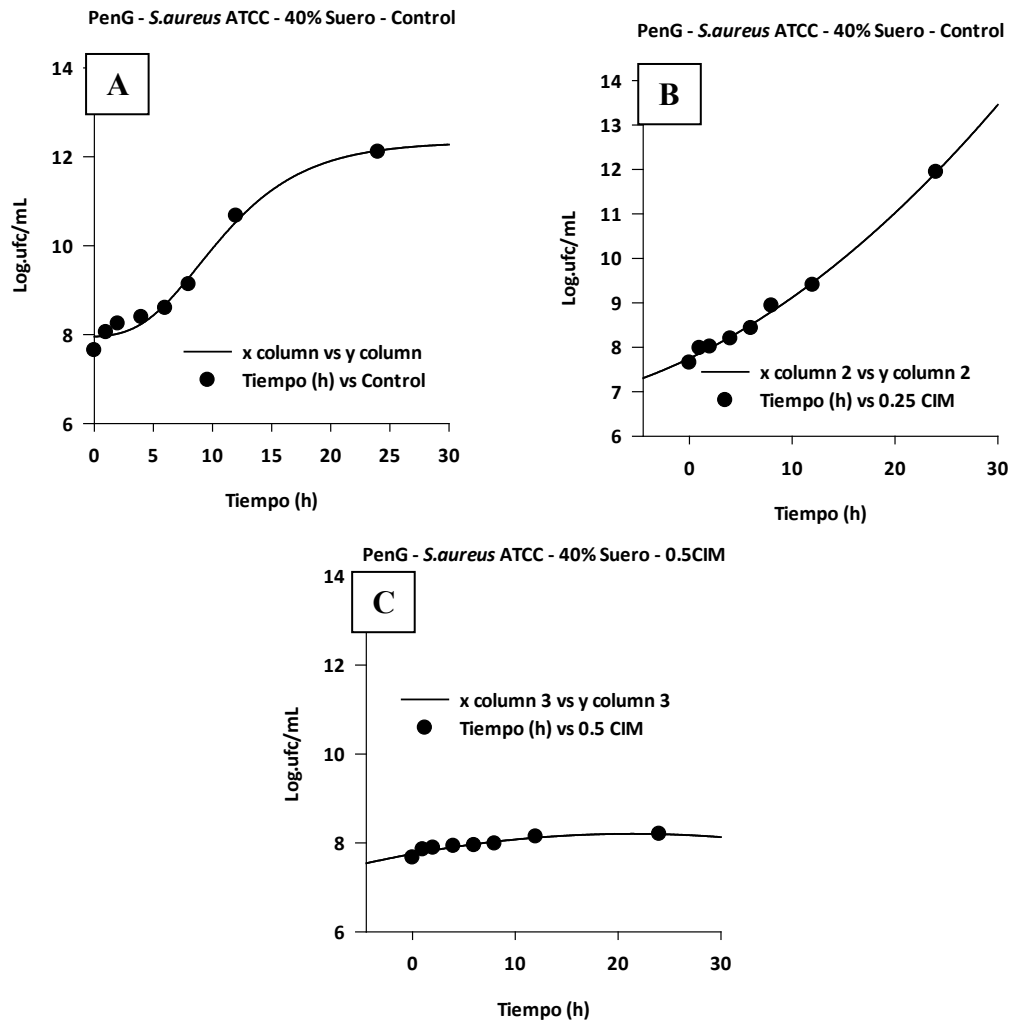


Figura 110. Modelado de Gompertz realizado a *S. aureus* ATCC 29213, A: curva de crecimiento control (sin PenG) en CMH-40% suero bovino, B: curva de crecimiento frente a 0.25 CIM de PenG (0.066 µg/mL) en CMH-40% suero bovino y C: curva de crecimiento frente a 0.5 CIM de PenG (0.125 µg/mL) en CMH-40% suero bovino.

En la Tabla 47 se presentan los parámetros obtenidos al aplicar el modelado de Gompertz (apartado 4.2.5.4. de Métodos).

Tabla 47. Aplicación del modelo de Gompertz y de crecimiento exponencial al desarrollo de *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino sin PenG y frente a concentraciones inferiores a la CIM.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – Suero			<i>S. aureus</i> ATCC 29213 – Suero		
Parámetros	Unidad	control	0.25 CIM	0.5 CIM*	control	0.25 CIM*	0.5 CIM*
R		0.9892	0.9955		0.9931		
c	Log ufc/mL	4.23	4.56		4.39		
b	h ⁻¹	0.16	0.13		0.20		
m	h	7.47	7.89		8.85		
a	Log ufc/mL	7.60	7.24		7.94		
μ	Log ufc/mL*h	0.25	0.22		0.32		
LPD	h	40.44	53.00		39.25		
MPD	Log ufc/mL	11.83	11.80		12.33		
Kc	h ⁻¹	0.2387	0.3027	0.0467	0.2902	0.4837	0.0358
T½c	h	2.90	2.29	14.84	2.39	1.43	19.36

Modelado de Gompertz. **R**: Coeficiente de correlación, **c**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente, **b**: velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m**, **m**: tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, **a**: Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, **μ**: velocidad específica de crecimiento, **LPD**: duración de la fase de latencia y **MPD**: máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares.

Crecimiento exponencial. **Kc**: constante de crecimiento de orden uno. **T½c**: tiempo medio de crecimiento.

*no se pudieron modelar por Gompertz, solo se analizó el crecimiento exponencial.

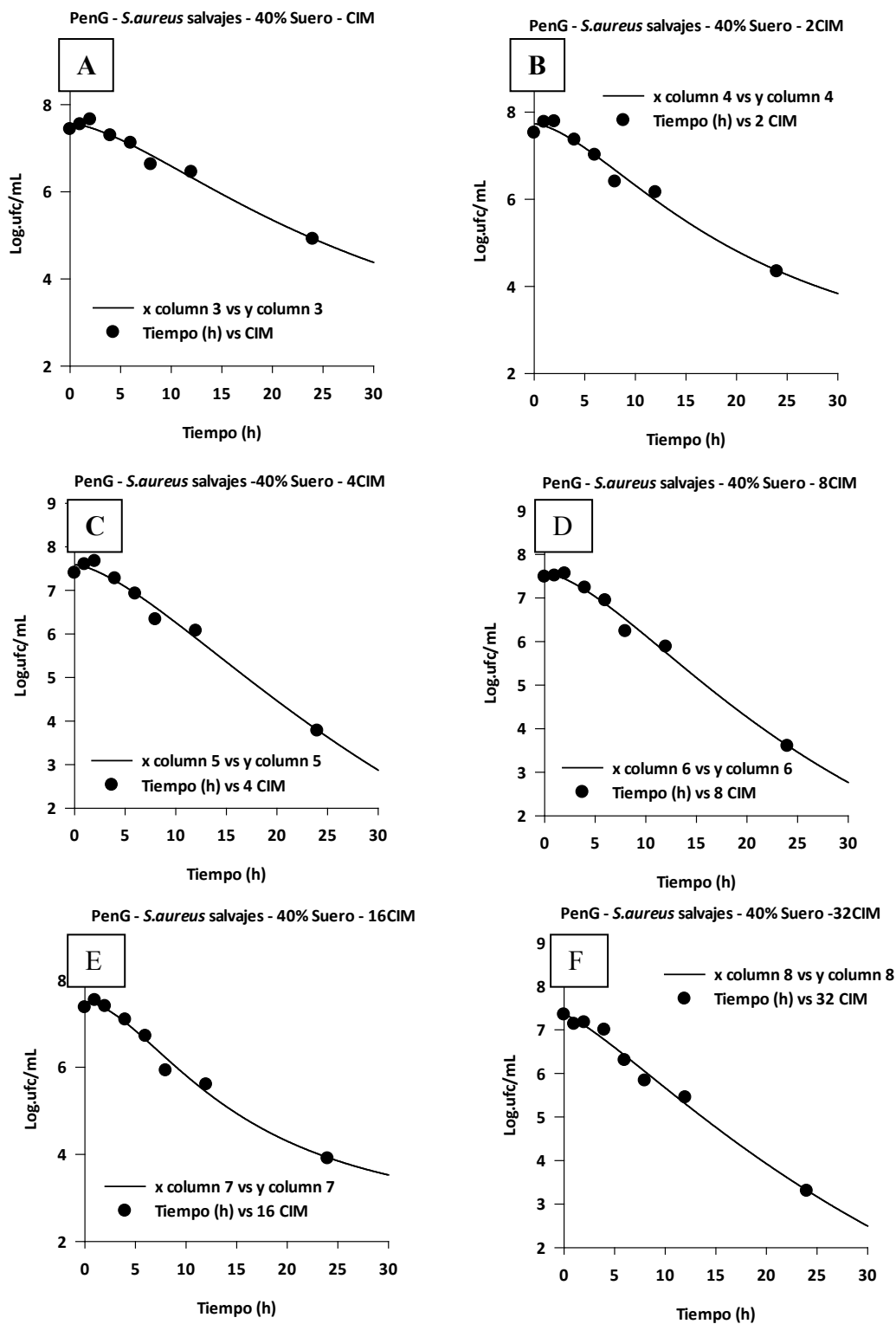


Figura 111. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de los aislamientos de *S. aureus* salvajes en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 µg/mL), B: 2xCIM de PenG (0.5 µg/mL), C: 4xCIM de PenG (1 µg/mL), D: 8xCIM de PenG (2 µg/mL), E: 16xCIM de PenG (4 µg/mL) y F: 16xCIM de PenG (8 µg/mL).

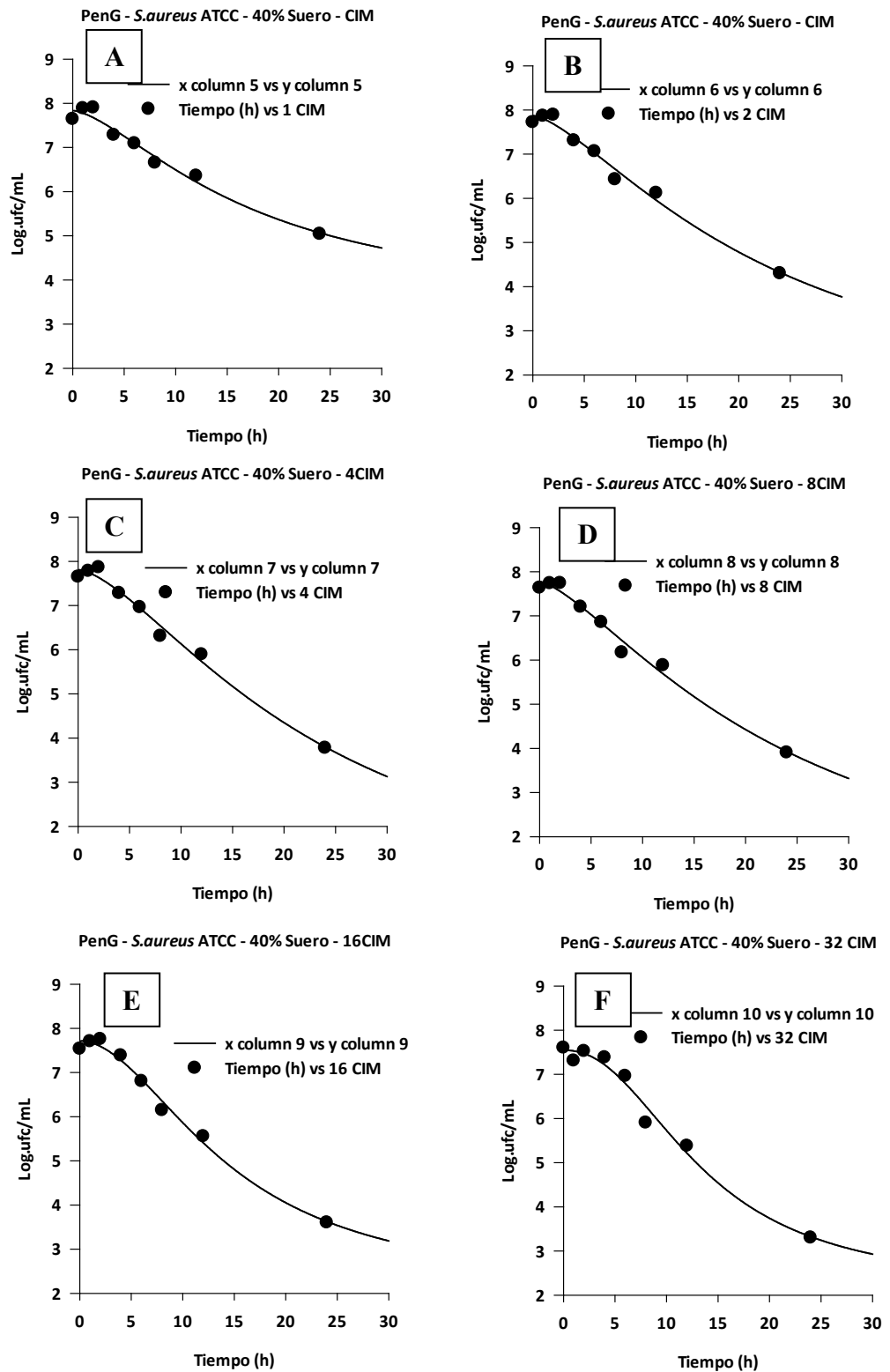


Figura 112. Modelado Sigmoideo realizado a las curvas de muerte bacteriana de *S. aureus* ATCC 29213 en CMH suplementado con 40% de suero bovino. A: *S. aureus* frente a 1xCIM de PenG (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), B: 2xCIM de PenG (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C: 4xCIM de PenG (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), D: 8xCIM de PenG (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), E: 16xCIM de PenG (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y F: 32xCIM de PenG (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la Tabla 48 se presentan los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales de UFC/mL en función del tiempo y a diferentes concentraciones, aplicando un modelo sigmoideo menos base. Se mantiene relativamente constante el TI50 frente a las diferentes concentraciones de penG, esto podría ser explicado ya que al ser un ATB acción bactericida tiempo dependiente, la variable que determina la eficacia del producto no es la concentración, sino, el tiempo de contacto.

En las Tablas 49 a 51 se presentan resumidamente los efectos del pH, de la leche y del suero sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 48. Aplicación del modelo Sigmoidal para evaluar la cinética de muerte del *Staphylococcus aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino frente a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16 y 32 veces la CIM) de Penicilina G.

		<i>S. aureus</i> aislados a campo – CMH – Suero						<i>S. aureus</i> ATCC – CMH – Suero					
Parámetros	Unidad	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	32 CIM	1 CIM	2 CIM	4 CIM	8 CIM	16 CIM	32 CIM
R		0.9406	0.9394	0.9395	0.9893	0.9744	0.9648	0.9399	0.9709	0.9605	0.9855	0.9613	0.9404
N _{max}	Log UFC/mL	82000	22000	6000	4000	8000	2000	110000	20000	6000	8000	4000	2000
Y		4.16	6.19	5.70	4.28	3.64	1.27	12.12	9.95	11.04	8.17	6.81	5.61
T ₁₅₀	H	4.60	3.90	4.10	4.25	3.75	3.08	3.63	3.61	3.69	3.59	4.05	5.07
N ₀	Log UFC/mL	27200000	33600000	25200000	30800000	23600000	22400000	44000000	52800000	44800000	43200000	34400000	40000000
A	(UFC/mL) ⁻¹ h ⁻¹	-0.2419	-0.3055	-0.3477	-0.3729	-0.3329	-0.3886	-0.2497	-0.3283	-0.3717	-0.3582	-0.3775	-0.4187
T½α	H	2.86	2.27	1.99	1.86	2.08	1.78	2.78	2.11	1.86	1.93	1.84	1.86

Modelo Sigmoidal. **N₀**: concentración del inóculo inicial (10⁶ UFC/mL), **N_{max}**: población bacteriana final, **T₁₅₀**: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la inhibición bacteriana máxima, **Y**: coeficiente de sigmoidicidad.

Modelo regresión lineal. **α** : pendiente de la regresión. **T½ α** : tiempo medio de declinación

Tabla 49. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de azitromicina

Caldo-pH	CIM	µg/mL	µ	LPD	MPD	Kc	T½c
CMH-7.4	0	0	0.28	19.89	11.84	0.2514	2.27
	0.125	0.25	0.31	27.82	11.37	0.2173	3.19
	0.25	0.5	0.27	-132.57	8.61	0.0529	13.1
	0.5	1	46.32	-409.65	8.24	0.0354	19.58
CMH-6.5	0	0	0.32	30.46	12.27	0.2520	2.75
	0.25	2	0.26	9.24	10.42	0.1415	4.9
	0.5	4	0.22	8.13	9.34	0.0755	9.18
	1	8	-17.46	-0.09	7.71	nc	nc
CMH-5	0	0	0.40	21.7	12.31	0.1919	3.61
	0.25	16	0.38	11.15	10.37	0.1461	4.74
	0.5	32	0.33	14.14	10.33	0.1286	5.39
LECHE	0	0	0.30	29.37	11.71	0.2675	2.59
	0.125	1	0.06	18.43	7.95	0.0441	15.71
CMH-40%Suero	0	0	0.38	35.22	12.72	0.3795	1.83
	0.25	0.5	0.06	15.48	8.26	0.0508	13.64

Tabla 50. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de danofloxacina

Caldo-pH	CIM	µg/mL	µ	LPD	MPD	Kc	T½c
CMH-7.4	0	0	0.31	27.10	11.36	0.2434	2.85
	0.25	0.25	0.19	17.93	9.43	0.1174	5.90
CMH-6.5	0	0	0.24	26.65	11.03	0.2047	3.39
	0.25	0.25	0.32	9.12	9.23	0.0984	7.04
	0.5	0.5	0.11	7.69	7.69	0.0187	37.06
CMH-5	0	0	0.29	35.62	11.51	0.2721	2.55
	0.25	0.5	0.16	27.52	9.18	0.1248	5.55
	0.5	1	0.46	10.83	0.07	0.1410	4.91
	1	2	1.26	0.68	7.99	0.0488	14.20
LECHE	0	0	0.44	16.95	12.78	0.2843	2.44
	0.25	0.25	0.13	9.83	8.73	0.0771	8.99
CMH-40%Suero	0	0	0.29	35.90	11.51	0.4446	1.56
	0.25	0.25	0.16	27.91	9.27	0.0278	24.93

Tabla 51. Resumen de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes pHs, en leche y en presencia de suero bovino frente a diferentes concentraciones sub-CIM de penG

Caldo-pH	CIM	µg/mL	µ	LPD	MPD	Kc	T½c
CMH-7.4	0	0	0.25	29.25	12.98	0.3138	2.21
	0.25	0.0625	1.42	285.77	13.89	0.0902	7.68
	0.5	0.125	1.87	0.37	8.21	0.0401	17.28
CMH-6.5	0	0	0.32	16.13	11.13	0.1520	4.56
	0.25	0.0625	---	---	---	0.1362	5.09
	0.5	0.125	0.30	0.13	8.11	0.0387	17.91
CMH-5	0	0	0.35	19.35	11.71	0.2518	2.75
LECHE	0	0	2.76	5.39	11.99	0.4739	1.46
	0.25	0.0625	0.23	0.05	1.29	0.0654	10.59
	0.5	0.125	0.58	1.98	4.65	0.0268	25.86
CMH-40%Suero	0	0	0.25	40.44	11.83	0.2387	2.90
	0.25	0.0625	0.22	53.00	11.80	0.3027	2.27
	0.5	0.125	---	---	---	0.0467	14.84

5.5. ÍNDICE DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El índice de actividad antibacteriana (E), se cuantificó como la diferencia entre los valores Log_{10} del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio ($n_{t=0}$) y al final del ensayo ($n_{t=24}$) según la siguiente ecuación:

$$E = n_{t=24} - n_{t=0} \quad \text{Ec. 10}$$

Para evaluar E , aplicamos tres puntos de corte teóricos: a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en valor de $n_{t=0}$; b) Efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \text{ log}_{10}$ de $n_{t=0}$ por eliminación del 99.9% de las bacterias iniciales y c): Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \text{ Log}_{10}$ (eliminación del 99.99%) respecto del Log de $n_{t=0}$.

Basándonos en estos puntos de corte establecidos para eficacia antibacteriana, podemos decir que la actividad de las diferentes concentraciones de un antibiótico puede ser valorada considerando dos bandas en las cuales se situaría el recuento de bacterias al

final del ensayo. La primera banda se corresponde con la reducción del número de bacterias entre $-3 \log_{10}$ (99.9%) y $-4 \log_{10}$ (99.99%) respecto del \log_{10} de $n_{t=0}$ (efecto bactericida) y que podría ser compatible con la cura clínica. La segunda banda se corresponde con la erradicación virtual de bacterias logrando una reducción $\geq -4 \log_{10}$ (>99.99%) del \log_{10} de $n_{t=0}$, pudiendo esta banda ser compatible con la cura bacteriológica.

5.5.1. AZITROMICINA

Las Tablas 52 a 56 presentan el índice de la actividad antibacteriana (E) obtenido para azitromicina (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 xCIM) en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas (pH 7.4, pH 6.5, pH 5, leche y suero). Mientras que en las Figuras 113 a 117, se grafican las relaciones entre las concentraciones logarítmicas de azitromicina y la diferencia entre los valores del \log_{10} del conteo de bacterias viables (ufc/mL) de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH pH 7.4, 6.5, 5, en leche y en suero. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos mencionados anteriormente.

En CMH-pH 7.4 solamente se obtuvo un efecto bacteriostático (E=0), es decir prácticamente no hubo cambios en el valor de $n_{t=0}$, o bien que tras 24 h de contacto con concentraciones entre la CIM (2 $\mu\text{g/mL}$) y 8 veces la CIM (16 $\mu\text{g/mL}$) no pasó de efecto bacteriostático a bactericida (Figura 113).

Tabla 52. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 7.4

AZT- CMH - pH 7.4			<i>S.aureus</i> Salv.	<i>S.aureus</i> ATCC
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ufc}24\text{-}0\text{h}$	$\Delta \text{ufc}24\text{-}0\text{h}$
8xCIM	16	1.204	-1.38	-1.38
4xCIM	8	0.903	-1.44	-1.47
2xCIM	4	0.602	-1.44	-1.41
CIM	2	0.301	-1.37	-1.37
0.5xCIM	1	0.000	0.52	0.60
0.25xCIM	0.5	-0.301	0.78	0.95
0.125xCIM	0.25	-0.602	3.60	2.57
Control	0		3.94	3.82

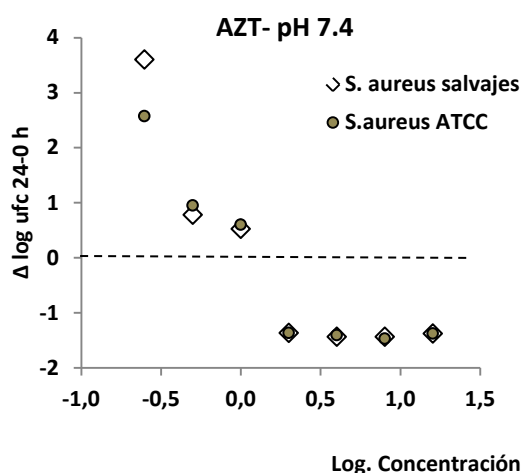


Figura 113: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 7.4. La línea punteada representa el punto de corte teórico de la eficacia de AZT: efecto bacteriostático.

En CMH-pH 6.5 (Tabla 53) ocurre exactamente lo mismo pero a una concentración 4 veces mayor, ya que la CIM de azitromicina a pH 6.5 fue 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Solamente se obtuvo efecto bacteriostático ($E=0$), y tras 24 h de contacto con concentraciones en entre la CIM (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 8 veces la CIM (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tampoco pasó a tener un efecto bactericida (Figura 113). Queda claramente demostrado que la azitromicina a medida que el pH se acidifica pierde potencia, necesitando concentraciones mayores para lograr el mismo efecto que a pH 7.4 (ambientes extracelulares). Aunque a este pH, a mayores concentraciones de azitromicina se comienza a evidenciar pequeños aumentos en su actividad.

Tabla 53. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 6.5

AZT - CMH - pH 6.5			<i>S. aureus</i> Salv.	<i>S. aureus</i> ATCC
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ufc}24-0\text{h}$	$\Delta \text{ufc}24-0\text{h}$
8xCIM	64	1.806	-1.24	-1.06
4xCIM	32	1.505	-1.09	-1.07
2xCIM	16	1.204	-0.89	-0.87
CIM	8	0.903	-0.72	-0.78
0.5xCIM	4	0.602	1.79	3.24
0.25xCIM	2	0.301	2.83	3.11
Control	0		4.47	4.46

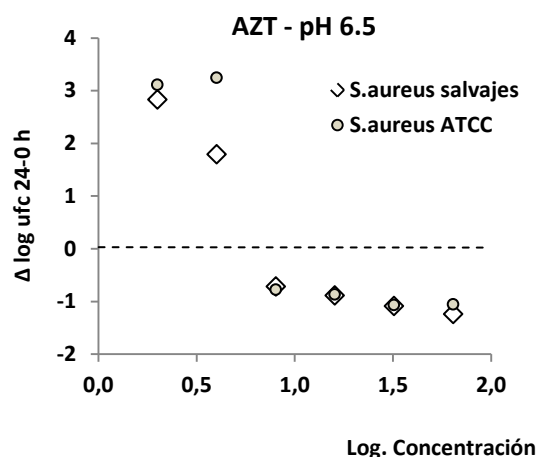


Figura 114: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 6.5. La línea punteada representa el punto de corte teórico de la eficacia de AZT: efecto bacteriostático.

En CMH-pH 5 (Tabla 54) azitromicina logra efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$), pero a concentraciones muy altas, en el orden de 4 veces la CIM, que a este pH es 8 veces superior (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a su CIM a pH 6.5. Frente a concentraciones equivalentes a la CIM y 2xCIM solamente se obtuvo efecto bacteriostático ($E=0$) (Figura 114). Como mencionamos para el caso del CMH-pH 6.5, la azitromicina a medida que el pH desciende va perdiendo potencia, por lo que requiere de concentraciones mayores para lograr el mismo efecto. Sin embargo a este pH se vio un efecto bactericida compatible con la cura clínica, a pesar de ser un antimicrobiano que por su mecanismo de acción (inhibición de la síntesis proteica a nivel bacteriano) se destaca por presentar efecto de tipo bacteriostático.

Tabla 54. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH-pH 5

AZT – CMH - pH 5.0			<i>S. aureus</i> salv.	<i>S. aureus</i> ATCC
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$
4xCIM	250	2.398	-3.22	-3.03
2xCIM	125	2.097	-2.26	-2.01
CIM	64	1.806	-0.37	-0.38
0.5xCIM	32	1.505	2.98	2.95
0.25xCIM	16	1.204	3.02	3.29
Control	0		4.66	4.79

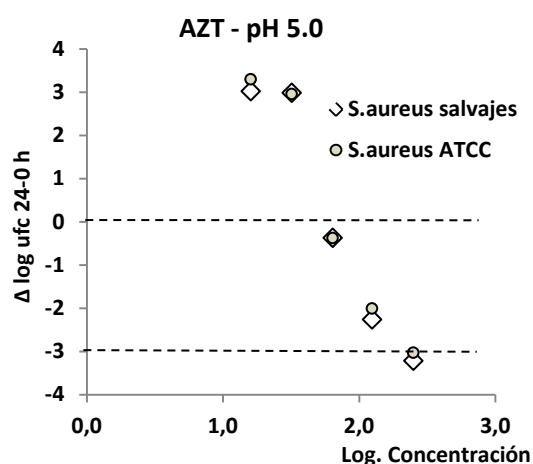


Figura 115: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 5. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de AZT: efecto bacteriostático ($E=0$) y efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$).

Cuando empleamos como caldo de cultivo leche bovina, para emular lo acontecido en la glándula mamaria (Tabla 55), azitromicina se comporta de manera similar a lo observado en CMH-pH 6.5, es decir logra solo efecto bacteriostático. La CIM en este medio de cultivo fue $8 \mu\text{g/mL}$, igual a la CIM obtenida en CMH-pH 6.5 (Figura 115). Como mencionamos para el caso del CMH-pH 6.5, la azitromicina a medida que el pH desciende va perdiendo potencia, por lo que requiere de concentraciones mayores para lograr el mismo efecto.

Tabla 55. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en leche bovina empleada como caldo de cultivo

	AZT - Leche		<i>S. aureus</i> salv.	<i>S. aureus</i> ATCC
	Cc $\mu\text{g/mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ufc}_{24-0\text{h}}$	$\Delta \text{ufc}_{24-0\text{h}}$
8xCIM	64	1.806	-1.74	-2.06
4xCIM	32	1.505	-1.58	-1.37
2xCIM	16	1.204	-0.76	-0.89
CIM	8	0.903	-0.64	-0.79
0.5xCIM	4	0.602	-0.40	-0.50
0.25xCIM	2	0.301	-0.45	-0.53
0.125xCIM	1	0.000	0.55	0.65
Control	0		4.12	4.31

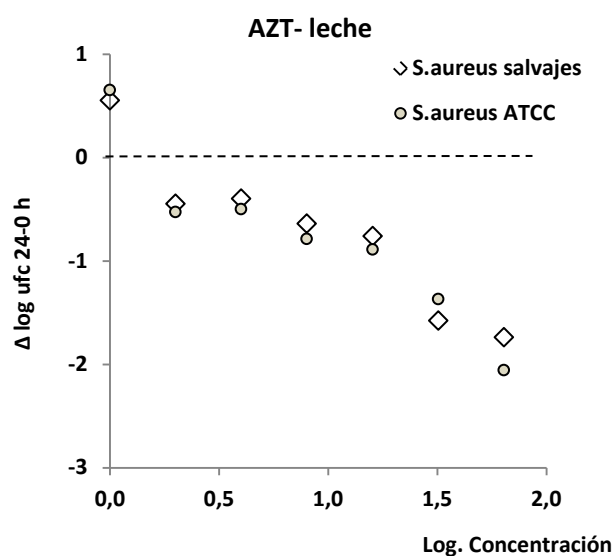


Figura 116: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en leche bovina. La línea punteada representa el punto de corte teórico de la eficacia de AZT: efecto bacteriostático.

En CMH suplementado con 40% de suero bovino (Tabla 56), azitromicina se comporta de manera similar a lo observado en CMH-pH 7.4, es decir logra solo efecto bacteriostático. La CIM en este medio de cultivo fue 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, igual a la CIM obtenida en CMH-pH 6.5 (Figura 115). Sin embargo a 16 veces la CIM se observa efecto bactericida, con valores de $E \geq -3$ (-3.21).

Tabla 56. Índice de la actividad antibacteriana (E) de azitromicina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH suplementado con 40% de suero bovino

AZT - suero			S.aureus salv.	S.aureus ATCC
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$
16xCIM	32	1.505	-3.21	-3.12
8xCIM	16	1.204	-2.67	-2.33
4xCIM	8	0.903	-2.24	-2.12
2xCIM	4	0.602	-2.13	-1.99
CIM	2	0.301	-2.10	-1.71
0.5xCIM	1	0.000	-1.60	-1.40
0.25xCIM	0.5	-0.301	0.66	1.33
Control	0		4.93	5.39

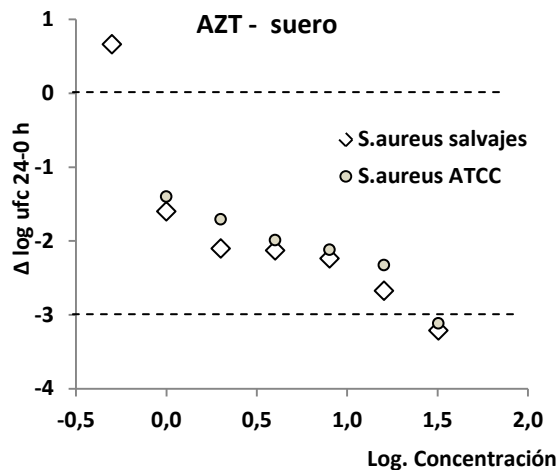


Figura 117: Representación gráfica del efecto antibacteriano de azitromicina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH suplementado con 40% de suero bovino. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de AZT: efecto bacteriostático ($E=0$) y efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$).

5.5.2. DANOFLOXACINA

En las Tablas 57 a 61 se presentan los índices de la actividad antibacteriana (E) obtenidos para danofloxacina (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 xCIM) en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas (pH 7.4, pH 6.5, pH 5, leche y suero). Mientras que en las Figuras 118 a 122, se grafican las relaciones entre las concentraciones logarítmicas de danofloxacina y la diferencia entre los valores del \log_{10} del conteo de bacterias viables (ufc/mL) de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH pH 7.4, 6.5, 5, en leche y en suero. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos mencionados anteriormente.

Danofloxacina es un antimicrobiano acción bactericida concentración dependiente, por esa razón ya en CMH-pH 7.4 se obtuvo efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$) a partir de las concentraciones correspondientes a 2xCIM (Tabla 57 y Figura 118). Las cepas aisladas a campo mostraron mayor sensibilidad que la cepa de referencia ATCC 25923, pues a concentraciones superiores presentaron efecto de erradicación virtual de bacterias ($E \geq -4 \log_{10}$) con eliminación del 99.99% respecto del Log de $n_{t=0}$.

Tabla 57. Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en CMH-pH 7.4

CMH - pH 7.4			<i>S.aureus</i> Salv.	<i>S.aureus</i> ATCC
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$
			DANO pH 7.4	DANO pH 7.4
16xCIM	16	1.204		
8xCIM	8	0.903	-4.32	-3.63
4xCIM	4	0.602	-4.31	-3.65
2xCIM	2	0.301	-3.64	-3.51
1xCIM	1	0.000	-2.46	-2.35
0.5xCIM	0.5	-0.301	-1.07	-1.08
0.25xCIM	0.25	-0.602	1.93	1.98
Control	0	0.000	3.84	3.85

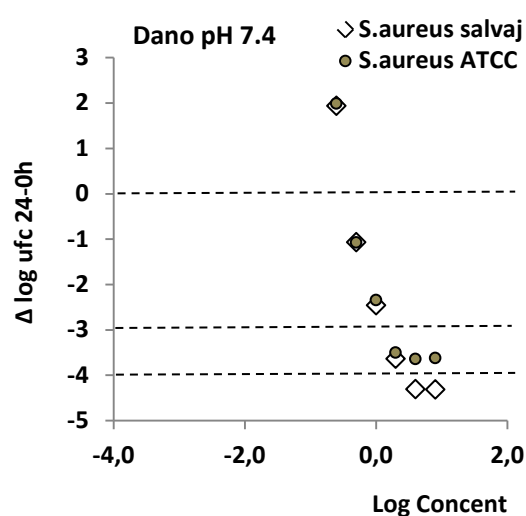


Figura 118. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 7.4. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de danofloxacina.

En CMH-pH 6.5 (Tabla 58) también a partir de 2xCIM (2 $\mu\text{g/mL}$) se visualiza el efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$), pero a partir de 4xCIM se da el efecto de erradicación virtual ($E \geq -4 \log_{10}$) (Figura 119), siendo bien categórico a partir de 8xCIM. Es importante remarcar que a concentraciones inferiores a 2xCIM muestra claramente un efecto bacteriostático, situación que puede ejercer presión de selección sobre las subpoblaciones son susceptibilidad a danofloxacina disminuída.

Tabla 58. Índice de la actividad antibacteriana (*E*) de danofloxacina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en CMH-pH 6.5

CMH - pH 6.5			<i>S.aureus</i> Salv.	<i>S.aureus</i> ATCC
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	DANO pH 6.5	DANO pH 6.5
16xCIM	16	1.204	-4.70	-4.71
8xCIM	8	0.903	-4.05	-4.59
4xCIM	4	0.602	-4.00	-4.00
2xCIM	2	0.301	-3.77	-3.51
1xCIM	1	0.000	-2.59	-2.35
0.5xCIM	0.5	-0.301	-1.47	-1.08
0.25xCIM	0.25	-0.602	2.03	1.98
Control	0	0.000	3.88	3.42

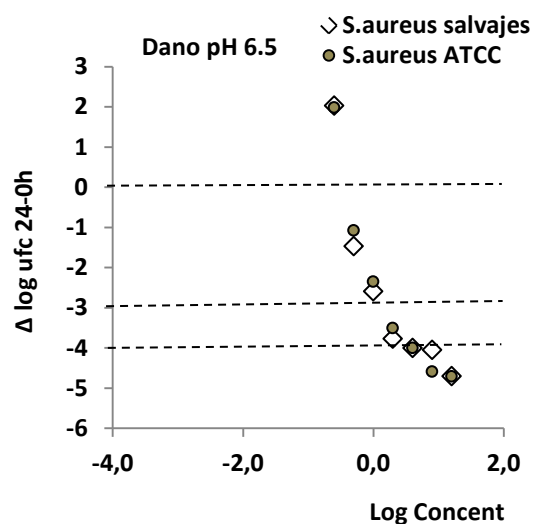


Figura 119. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 6.5. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de danofloxacina.

En CMH-pH 5 (Tabla 59) danofloxacina pierde potencia, su CIM sube a 2 $\mu\text{g/mL}$ presentando efecto bacteriostático ($E = 0$), recién a partir de 4xCIM se da el efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$) compatible con cura clínica (Figura 120), y a 8xCIM presenta efecto de erradicación virtual que es compatible con cura bacteriológica. A este pH concentraciones inferiores a 4xCIM arrojan un efecto bacteriostático.

Tabla 59. Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en CMH-pH 5

CMH - pH 5			<i>S.aureus</i> Salv.	<i>S.aureus</i> ATCC
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	DANO pH 5	DANO pH 5
16xCIM	32	1.505	-4.88	-4.75
8xCIM	16	1.204	-4.31	-4.5
4xCIM	8	0.903	-3.62	-3.2
2xCIM	4	0.602	-2.55	-1.84
1xCIM	2	0.301	0.43	0.49
0.5xCIM	1	0.000	1.37	1.55
0.25xCIM	0.5	-0.301	1.55	1.47
Control	0	0.000	3.66	3.76

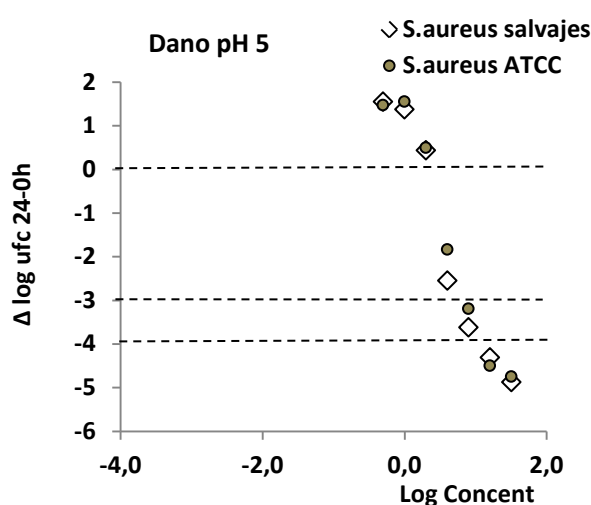


Figura 120. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH-pH 5. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de danofloxacina.

El comportamiento de danofloxacina en leche, presentado en la Tabla 60, muestra efecto bacteriostático a concentraciones de 1xCIM, pero, a partir de 2xCIM (2 $\mu\text{g/mL}$) se visualiza un cambio drástico, presentándose un efecto de erradicación virtual ($E \geq -4 \log_{10}$), el cual como se ha comentado, es compatible con el concepto de cura bacteriológica, siendo un poco más marcado en la cepa ATCC que en las cepas de campo.

Tabla 60 Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacina (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en leche.

CMH – LECHE			<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i> salvajes
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	DANO LECHE	DANO LECHE
16xCIM	16	1.204	-5.3	-5.33
8xCIM	8	0.903	-4.99	-5.02
4xCIM	4	0.602	-4.41	-4.51
2xCIM	2	0.301	-4.16	-4.33
1xCIM	1	0.000	-1.01	-1.51
0.5xCIM	0.5	-0.301	-0.36	-1.16
0.25xCIM	0.25	-0.602	1.35	1.29
Control	0	0.000		

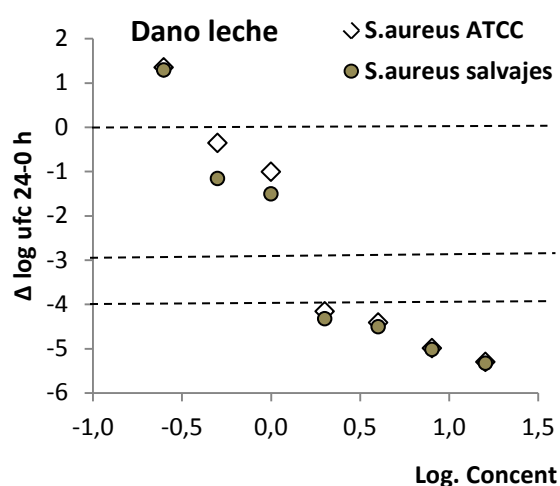


Figura 121. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacina frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en leche. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de danofloxacina.

En CMH suplementado con 40% de suero bovino (Tabla 61) danofloxacina presenta efecto bacteriostático a la concentración de 1 xCIM, luego a 2 y 4 veces la CIM demuestra efecto bactericida compatible con cura clínica ($E \geq -3 \log_{10}$). El efecto de erradicación virtual, compatible con cura bacteriológica se a concentraciones de 8xCIM.

Tabla 61 Índice de la actividad antibacteriana (E) de danofloxacin (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en suero bovino.

CMH – SUERO			<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i> salvajes
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	DANO SUERO	DANO SUERO
16xCIM	16	1.204		
8xCIM	8	0.903	-4.07	-4.17
4xCIM	4	0.602	-3.50	-3.66
2xCIM	2	0.301	-3.35	-3.44
1xCIM	1	0.000	-2.20	-1.25
0.5xCIM	0.5	-0.301	-1.53	-0.94
0.25xCIM	0.25	-0.602	0.51	0.33
Control	0	0.000		

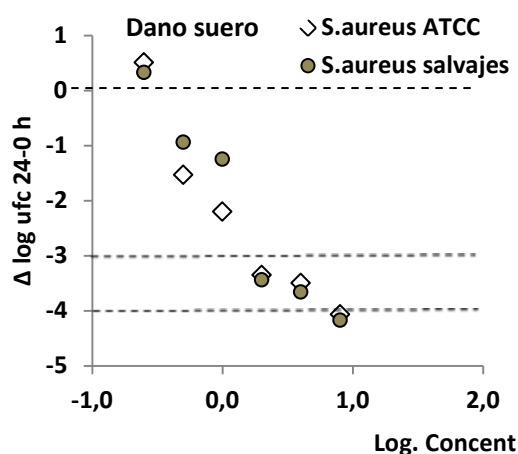


Figura 122. Representación gráfica del efecto antibacteriano de danofloxacin frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en suero bovino. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de danofloxacin.

5.5.3. PENICILINA G

En las Tablas 62 a 66 se presentan los índices de la actividad antibacteriana (E) obtenidos para penG (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 xCIM) en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas (pH 7.4, pH 6.5, pH 5, leche y suero). Mientras que en las Figuras 123 a 127, se grafican las relaciones entre las concentraciones logarítmicas de penG y la diferencia entre los valores del \log_{10} del conteo de bacterias viables (ufc/mL) de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH pH 7.4, 6.5, 5,

en leche y en suero. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos mencionados anteriormente.

PenicilinaG, antimicrobiano acción bactericida tiempo dependiente, en CMH-pH 7.4, tal como se observa en la Tabla 62, a la concentración equivalente a 1xCIM presenta efecto bacteriostático ($E= 0$). El efecto bactericida se visualiza a 2xCIM y el efecto de erradicación virtual compatible con cura bacteriológica a 4xCIM ($E \geq -4 \log_{10}$). Podemos observar que a la concentración de 8xCIM se presenta un efecto paradójico, descrito con antelación, donde el efecto vuelve a ser bactericida, para luego a 16 veces la CIM recobrar el efecto de cura bacteriológica.

Tabla 62 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en CMH pH 7.4

CMH - pH 7.4			<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i> salvajes
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	$\mu\text{g/mL}$	Log Cc	PenG pH 7.4	PenG pH 7.4
32xCIM	8	0.903	-4.797	-4.124
16xCIM	4	0.602	-4.450	-4.125
8xCIM	2	0.301	-3.713	-3.902
4xCIM	1	0.000	-4.243	-3.709
2xCIM	0.5	-0.301	-3.386	-4.031
1xCIM	0.25	-0.602	-1.851	-2.173
0.5xCIM	0.125	-0.903	0.568	-1.079
0.25xCIM	0.066	0.000	1.603	-0.878
Control	0	0	4.433	4.497

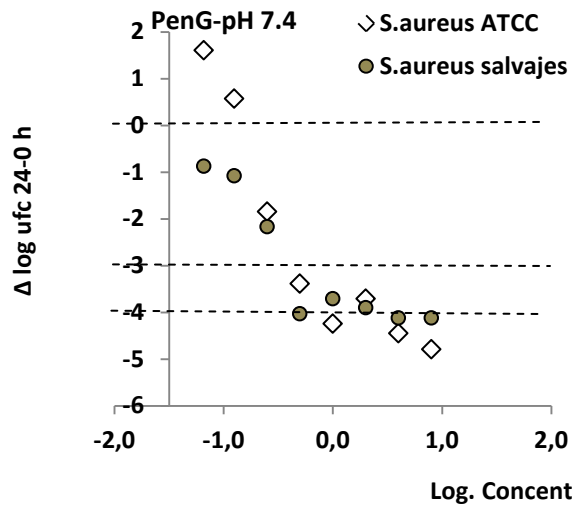


Figura 123. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 7.4. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de PenG.

La CIM de penicilina en CMH- pH 6.5, tal como se muestra en la Tabla 63, continúa siendo de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a este pH continúa ejerciendo efecto bacteriostático ($E= 0$) a la concentración de 1xCIM, como se observó en CMH-pH 7.4. A 2xCIM, cambia drásticamente el efecto y produce efecto de erradicación virtual ($E= \geq -4 \log_{10}$), observándose nuevamente el efecto paradójico a 4 veces la CIM ($E= \geq -3 \log_{10}$). Para finalmente a concentraciones equivalentes a 8 y 16xCIM recuperar el efecto de erradicación virtual, compatible con la cura bacteriológica (Figura 124).

Tabla 63 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH pH 6.5

CMH - pH 6.5			<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> salvajes
			$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$	$\Delta \text{ ufc}24\text{-}0\text{h}$
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Log Cc	PenG pH 6.5	PenG pH 6.5
16xCIM	4	0.602	-4.904	-4.571
8xCIM	2	0.301	-4.569	-4.318
4xCIM	1	0.000	-3.976	-3.919
2xCIM	0.5	-0.301	-4.348	-4.556
1xCIM	0.25	-0.602	-2.020	-1.917
0.5xCIM	0.125	-0.903	0.623	-1.602
0.25xCIM	0.066	-1.180	2.003	2.154
Control	0	0.000	3.418	3.472

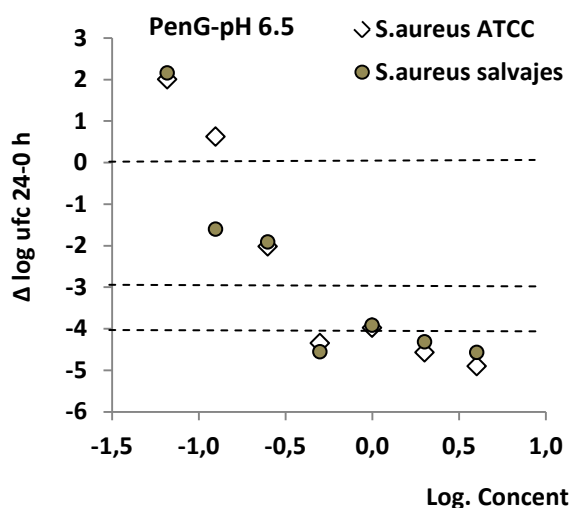


Figura 124. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 6.5. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de PenG.

Penicilina G, en CMH- pH 5.0, tal como se muestra en la tabla 64, aumenta su eficacia reduciendo su CIM a la mitad siendo de 0.125 µg/mL; a este pH, se presenta el efecto bacteriostático a valores de 1xCIM, continuando con efecto bactericida ($E = \geq -3\log_{10}$) a 2 y 4 veces la CIM. A este pH no observamos efecto paradójico como cuando se cultivó a pH 7.4 y 6.5. El efecto compatible con la cura bacteriológica se vio a concentraciones de 8 y 16 veces la CIM.

Tabla 64 Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S. aureus* en CMH pH 5.0

CMH - pH 5			<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> salvajes
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	µg/mL	Log Cc	PenG pH 5	PenG pH 5
16xCIM	2	0.301	-4.170	-4.100
8xCIM	1	0.000	-4.121	-4.387
4xCIM	0.5	-0.301	-3.585	-4.104
2xCIM	0.25	-0.602	-3.016	-3.406
1xCIM	0.125	-0.903	-2.152	-2.465
0.5xCIM	0.066	-1.180	-1.892	-1.829
0.25xCIM	0.033	-1.481	-0.112	-0.336
Control	0	0.000	3.805	4.255

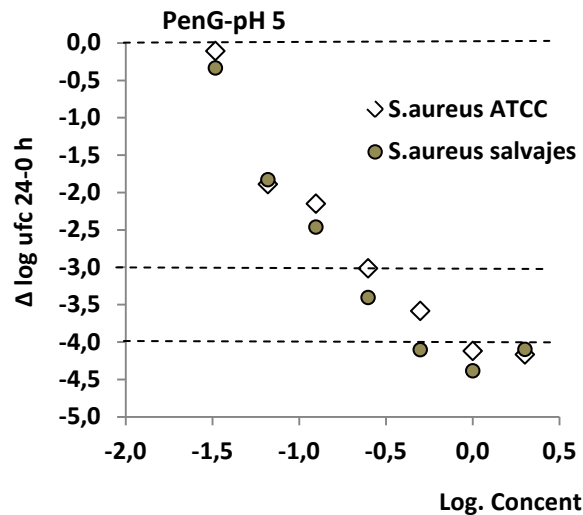


Figura 125. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en CMH a pH 5.0. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de PenG.

PenicilinaG en leche tiene una CIM de 0.25 µg/mL, cuando realizamos las curvas de muerte bacteriana en esta matrix, se observó a 1xCIM efecto bacteriostático (E= 0). A de 2xCIM hasta 8xCIM, presentó efecto bactericida, no alcanzándose el efecto de erradicación virtual, compatible con cura bacteriológica en ninguna de las concentraciones estudiadas frente a los aislamientos salvajes, sin embargo frente a la cepa de referencia se evidenció efecto de erradicación virtual a partir de 2xCIM.

Tabla 65. Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en Leche.

LECHE			<i>S.aureus</i> salvajes	<i>S.aureus</i> ATCC
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	µg/mL	Log Cc	PenG LECHE	PenG LECHE
16xCIM	4	0.602	-3.620	
8xCIM	2	0.301	-3.970	-4.210
4xCIM	1	0.000	-3.630	-4.030
2xCIM	0.5	-0.301	-3.330	-4.050
1xCIM	0.25	-0.602	-2.060	-2.310
0.5xCIM	0.125	-0.903	0.460	1.400
0.25xCIM	0.066	-1.180	1.560	1.370
Control	0	0.000	4.320	4.140

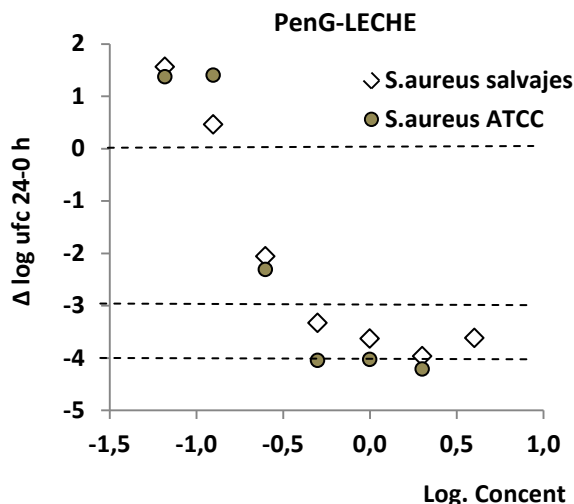


Figura 126. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en leche. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de PenG.

Penicilina en CMH suplementado con 40% de suero bovino, repite el patrón de comportamiento evidenciado en las condiciones de los medios de cultivos anteriormente expuestos. Presenta efecto bacteriostático (Tabla 66) a 1xCIM. Desde 2 hasta 16 veces la CIM, presenta efecto bactericida y a 32xCIM efecto de erradicación virtual, compatible con cura bacteriológica. No se observaron grandes diferencias entre las cepas de campo y la cepa ATCC (Figura 127).

Tabla 66. Índice de la actividad antibacteriana (E) de penicilina G (concentraciones sub-CIM, CIM y supra-CIM) frente a *S.aureus* en suero bovino.

SUERO			<i>S.aureus</i> salvajes	<i>S.aureus</i> ATCC
			Δ ufc24-0h	Δ ufc24-0h
	μg/mL	Log Cc	PenG SUERO	PenG SUERO
32XCIM	8	0.903	-4.050	-4.300
16xCIM	4	0.602	-3.470	-3.930
8xCIM	2	0.301	-3.890	-3.730
4xCIM	1	0.000	-3.620	-3.870
2xCIM	0.5	-0.301	-3.180	-3.420
1xCIM	0.25	-0.602	-2.520	-2.600
0.5xCIM	0.125	-0.903	0.800	0.530
0.25xCIM	0.066	-1.180	3.820	4.290
Control	0	0.000	4.100	4.460

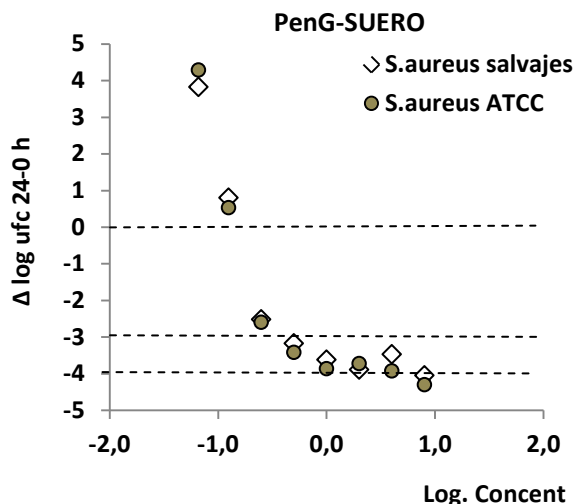


Figura 127. Representación gráfica del efecto antibacteriano de penicilina G frente a cepas de *S. aureus* salvajes y ATCC 25923 al final y al comienzo de las curvas de muerte construidas en suero bovino. Las líneas punteadas representan los puntos de corte teóricos de la eficacia de penicilina G.

5.6 EFECTO POSTANTIBIOTICO

El efecto postantibiótico (PAE) se define como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano (Mc. Donald *et al.*, 1997). Esta definición llama la atención sobre el hecho de que el PAE es debido a una acción previa del antimicrobiano y no a concentraciones subinhibitorias de éste.

El mecanismo por el cual los antimicrobianos inducen PAE en los microorganismos es en parte desconocido, ya que las diferencias en la duración de este efecto en las distintas combinaciones antimicrobiano-microorganismo, sugieren que deben existir varios mecanismos implicados. La explicación más acertada es que el PAE es debido a los daños no letales producidos por los antimicrobianos y/o a la persistente unión de éstos en determinados lugares bacterianos, lo que se traduce en un retraso en el crecimiento normal de la bacteria.

Los antimicrobianos que actúan a nivel del ribosoma (por ejemplo, aminoglucósidos, y macrólidos), inhiben la síntesis de proteínas. Así, el PAE podría significar un período de resíntesis de estas proteínas necesarias para el metabolismo o el crecimiento bacteriano y si la unión del antimicrobiano es irreversible la actividad persiste aunque éste haya sido

retirado (Preston *et al.*, 1998). En el caso de los betalactámicos, se unen específicamente a proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), enzimas implicadas en la síntesis de peptidoglicano. Una posible explicación es que el PAE sería el tiempo requerido por la célula para sintetizar nuevamente estas proteínas (Vogelman & Craig, 1985).

Las diferencias observadas en el PAE para las distintas combinaciones de microorganismo-antimicrobiano, se deberían posiblemente a otros muchos factores además del propio mecanismo de acción del antibiótico:

- Diferente afinidad del antibiótico por su diana,
- Distinta capacidad de penetración a través de la membrana en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
- Empleo de diferentes técnicas en la evaluación del PAE.
- Utilización de distintas cepas bacterianas, etc.

En el desarrollo de esta tesis realizamos la determinación del efecto postantibiótico in-vitro a 2 cepas de *S. aureus*, una la cepa de referencia ATCC 29213 y la otra una cepa salvaje aislada de un cuarto mamario de una vaca portadora de mastitis subclínica. Este ensayo se llevó a cabo tanto en CMH como en leche, para simular las condiciones medioambientales imperantes en infecciones a nivel de la glándula mamaria.

5.6.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO IN-VITRO.

5.6.1.1. AZITROMICINA

5.6.1.1.1. AZITROMICINA EN CMH

En la Figura 128 se presenta el comportamiento de las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y aisladas a campo (n= 2) (B), control y tratadas con azitromicina en función del tiempo.

En ambos casos, la gráfica describe el comportamiento desde -2h, cultivo inicial, pasando por la hora 0, momento en el cual el antimicrobiano fue retirado por el método de dilución, hasta las 6 horas posteriores, según lo descrito en el apartado de metodología.

Cabe destacar, que la concentración de antibacteriano a la cual fue expuesto el cultivo tratado corresponde a la concentración terapéutica, la cual fue establecida teniendo en cuenta los predictores de eficacia definidos por las características farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) de los diferentes antimicrobianos tal como se documentó en el apartado 4.2.6.1., que en el caso de azitromicina fue 5 µg/mL y que corresponde a 5 veces la CIM de este antimicrobiano sobre *S. aureus* a pH 7.4.

En la gráfica, se puede observar la representación semilogarítmica de la evolución de la población bacteriana en función del tiempo para *S. aureus* ATCC 29213 (A) y cepas salvajes (n = 2) (B) en el ensayo de PAE. El PAE (horas) se estableció como la diferencia de tiempo en el que los inóculos expuestos a azitromicina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de los controles.

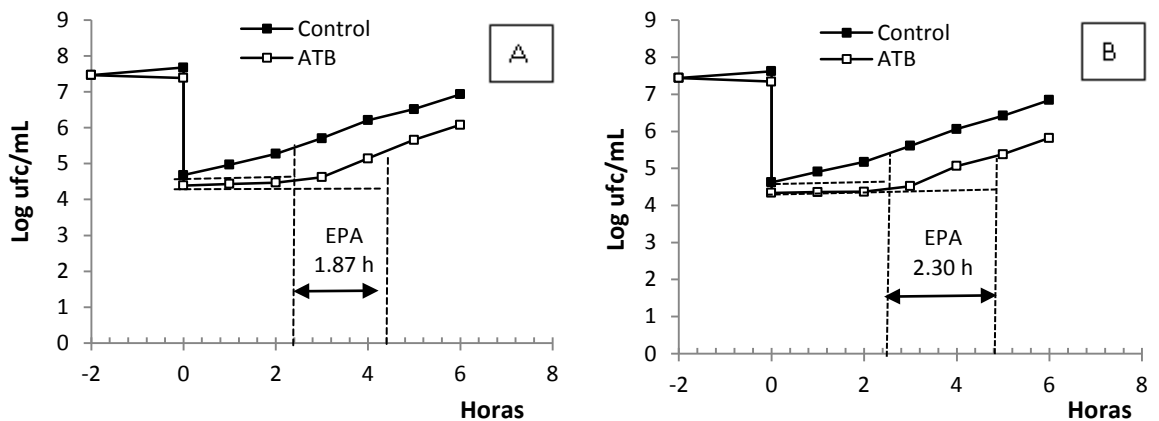


Figura 128. Estimación del EPA (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a azitromicina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin azitromicina) en CMH.

En la tabla 67, se resumen los resultados de la estimación del PAE para las cepas salvajes y de referencia. Se presentan las bacterias viables expresadas como log₁₀ de las ufc/mL observadas al momento de la dilución (T1) de los inóculos control y expuestos a 5 µg/mL de azitromicina (5xCIM) durante 2 horas. T2 es el momento en que se incrementa el número de bacterias viables en un 1 log₁₀.

Tabla 67. PAE presentado por azitromicina frente a *S. aureus* cepa ATCC 29213 y cepas aisladas a campo en CMH-pH 7.4.

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.68	2.38	5.68	
ATB	0	4.39	4.25	5.39	1.87
	CEPAS SALVAJES (n=2)				
Control	0	4.62	2.41	4.62	
ATB	0	4.34	4.71	5.34	2.30

En las cepas salvajes, el tiempo en el cual se presentó un aumento de 1 log₁₀ en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 2.41 horas y el cultivo tratado aumentó 1 log₁₀ luego de 4.71 h después de la retirada del antimicrobiano, con lo cual la diferencia entre estos 2 valores nos representa el tiempo durante el cual azitromicina presentó PAE, que en este caso fue de 2.30 horas. Frente a la cepa ATCC 29213, el tiempo en el cual aumentó 1 log₁₀ el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 2.38 h y el cultivo tratado aumentó 1 Log₁₀ luego de 4.25 h tras la retirada del antimicrobiano, arrojando un PAE de 1.87 h. Azitromicina frente a los aislamientos a campo presentó un efecto ligeramente más prolongado que frente a *S. aureus* ATCC 29213.

5.6.1.1.2. AZITROMICINA EN LECHE

Cuando evaluamos la existencia de PAE de azitromicina en leche, cuyo pH en condiciones de mastitis subclínica es 6.5 – 6.8, y que, según demostramos en los ensayos anteriores, azitromicina pierde potencia a medida que el pH disminuye; encontramos también una menor persistencia de este efecto con respecto al estimado para CMH 7.4 (Figura 129 y Tabla 68). En este medio, la concentración de azitromicina a la cual fue expuesto el cultivo tratado, fue 40 µg/mL (5 veces la CIM –8 µg/mL- de azitromicina obtenida a pH 6.5).

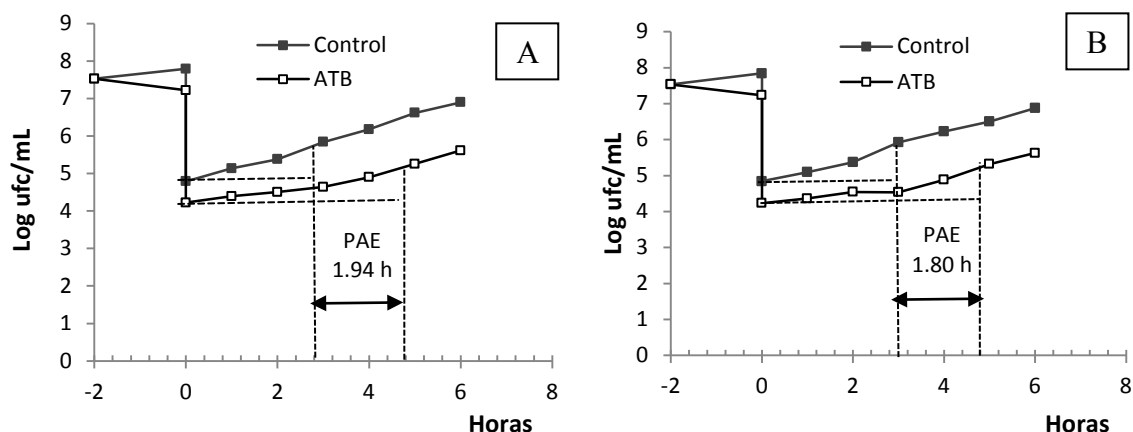


Figura 129. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a azitromicina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin azitromicina) en leche.

En las cepas salvajes, el tiempo en el cual se presentó un aumento de 1 log₁₀ en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 3.01 horas y el cultivo tratado aumento 1 log₁₀ luego de 4.81 h después de la retirada del antimicrobiano, con lo cual la diferencia entre estos 2 valores nos representa el valor de PAE, que en este caso fue de 1.80 horas. En el caso de la cepa ATCC 25932, el tiempo en el cual aumentó 1 log₁₀ el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 2.88 h y el cultivo tratado aumentó 1 Log₁₀ luego de 4.82 h tras la retirada del antimicrobiano, arrojando un PAE de 1.94 h (Tabla 68). Es decir en leche azitromicina mantiene su PAE alrededor de la s 2 horas, pero necesita como hemos demostrado una concentración varias veces por arriba a la plasmática.

Tabla 68. PAE presentado por azitromicina en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.79	2.88	5.79	
TRAT-ATB	0	4.22	4.82	5.22	1.94
CEPAS SALVAJES (n=2)					
Control	0	4.84	3.01	5.84	
TRAT-ATB	0	4.24	4.81	5.24	1.80

5.6.1.2. DANOFLOXACINA

5.6.1.2.1. DANOFLOXACINA EN CMH

En la Figura 130 se presenta el comportamiento de las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de cepas aisladas a campo (n= 2) (B), control y tratadas con danofloxacina en función del tiempo. La concentración de antibacteriano a la cual fue expuesto el cultivo tratado y tratándose de un antimicrobiano cuya acción es concentración dependiente (ver apartado 4.2.6.1.), fue 10 µg/mL (10xCIM en CMH-pH 7.4).

En ambos casos, la gráfica describe el comportamiento desde -2h, cultivo inicial, pasando por la hora 0, momento en el cual el antimicrobiano fue retirado por el método de dilución, hasta las 6 horas posteriores, según lo descrito en el apartado de metodología.

En la gráfica, se puede observar la representación semilogarítmica de la evolución de la población bacteriana en función del tiempo para *S. aureus* ATCC 29213 (A) y cepas salvajes (n = 2) (B) en el ensayo de PAE. El PAE (horas) se estableció como la diferencia de tiempo en el que los inóculos expuestos a danofloxacina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de los controles.

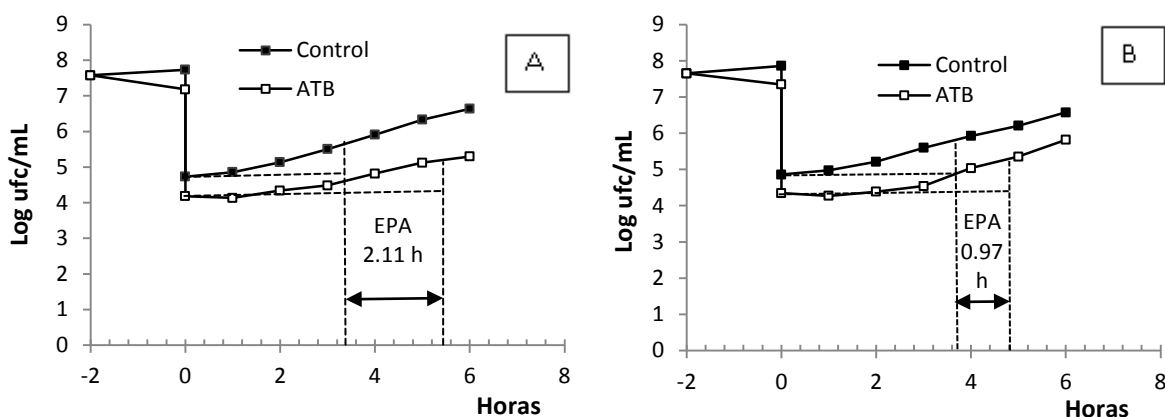


Figura 130. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a danofloxacina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin danofloxacina) en CMH.

En la tabla 69, se resumen los resultados de la estimación del PAE para las cepas salvajes y de referencia. Se presentan las bacterias viables expresadas como log₁₀ de las ufc/mL observadas al momento de la dilución (T1) de los inóculos control y expuestos a 10 µg/mL de danofloxacina (10xCIM) durante 2 horas. T2 es el momento en que se incrementa

el número de bacterias viables en un $1 \log_{10}$. Noté que frente a las cepas salvajes danofloxacina demostró un PAE la mitad más breve.

Tabla 69. PAE de danofloxacina en CMH frente *S. aureus* ATCC 29213 y cepas asiladas de animales portadores de mastitis subclínica

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.73	3.42	5.73	
ATB	0	4.18	5.53	5.18	2.11
CEPAS SALVAJES (n=2)					
Control	0	4.86	3.80	5.86	
ATB	0	4.34	4.77	5.34	0.97

En las cepas salvajes, el tiempo en el cual se presentó un aumento de $1 \log_{10}$ en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 3.80 horas y el cultivo tratado aumentó $1 \log_{10}$ luego de 4.77 h después de la retirada del antimicrobiano, de manera que la diferencia entre ambos valores nos arroja un PAE de 0.97 horas. Frente a la cepa ATCC de referencia, el tiempo en el cual aumentó $1 \log_{10}$ el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 3.42 h, mientras que el cultivo tratado aumentó $1 \log_{10}$ luego de 5.53 h tras la retirada del antimicrobiano dando un PAE de 2.11 h. Danofloxacina frente a los aislamientos a campo presentó un efecto post antibiótico más de la mitad menos persistente que frente a la cepa de referencia (0.97 vs 2.11 h).

5.6.1.2.2. DANOFLOXACINA EN LECHE

Cuando evaluamos la existencia de PAE de la danofloxacina en leche (pH 6.5 – 6.8) encontramos una menor persistencia de este efecto con respecto al estimado para CMH 7.4 (Figura 131 y Tabla 70). En leche, la concentración de danofloxacina a la cual fue expuesto el cultivo tratado, fue la misma que en CMH, $10 \mu\text{g/mL}$ (10 veces la CIM $-1 \mu\text{g/mL}$ de deanofloxacina obtenida a pH 6.5).

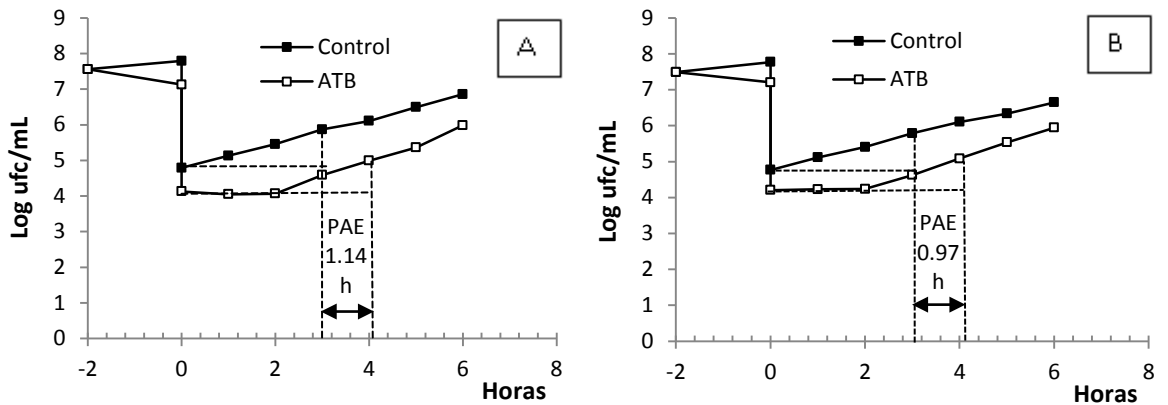


Figura 131. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a danofloxacina incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin danofloxacina) en leche.

En las cepas salvajes, el tiempo en el cual se presentó un aumento de 1 log₁₀ en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 3.11 horas y el cultivo tratado aumentó 1 log₁₀ luego de 4.08 h después de la retirada del antimicrobiano, con lo cual la diferencia entre estos 2 valores nos representa el valor de PAE, que en este caso fueron escasas 0.97 horas. Frente a la cepa de referencia, el tiempo en el cual aumentó 1 log₁₀ el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 2.93 h y el cultivo tratado aumentó 1 Log₁₀ luego de 4.07 h tras la retirada del antimicrobiano, arrojando un PAE de 1.14 h (Tabla 70). En leche, frente a las cepas aisladas a campo, danofloxacina se comportó de manera similar que en CMH, presentando igual extensión su PAE.

Tabla 70. PAE presentado por danofloxacina en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.79	2.93	5.79	
ATB	0	4.13	4.07	5.13	1.14
	CEPAS SALVAJES (n=2)				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.77	3.11	5.77	
ATB	0	4.2	4.08	5.2	0.97

5.6.1.3. PENICILINA G

5.6.1.3.1. PENICILINA G EN CMH

En la Figura 132 se presenta el comportamiento de las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de cepas aisladas a campo (n= 2) (B), control y tratadas con penicilina G en función del tiempo. La concentración de antibacteriano a la cual fue expuesto el cultivo tratado correspondió a 4 veces la CIM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenida en CMH-pH 7.4 (CIM 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), según los predictores de eficacia definidos por las características farmacocinéticas y farmacodinámicas (PK/PD) para penG, considerada un antimicrobiano cuya acción bactericida es dependiente del tiempo de contacto ($T > \text{CIM}$) (ver apartado 4.2.6.1.). El PAE (horas) se estableció como la diferencia de tiempo en el que los inóculos expuestos a penG incrementaron el número de bacterias viables en 1 \log_{10} respecto de los controles.

En ambos casos, la gráfica describe el comportamiento desde -2h, cultivo inicial, pasando por la hora 0, momento en el cual el antimicrobiano fue retirado por el método de dilución, hasta las 6 horas posteriores, según lo descrito en el apartado de metodología.

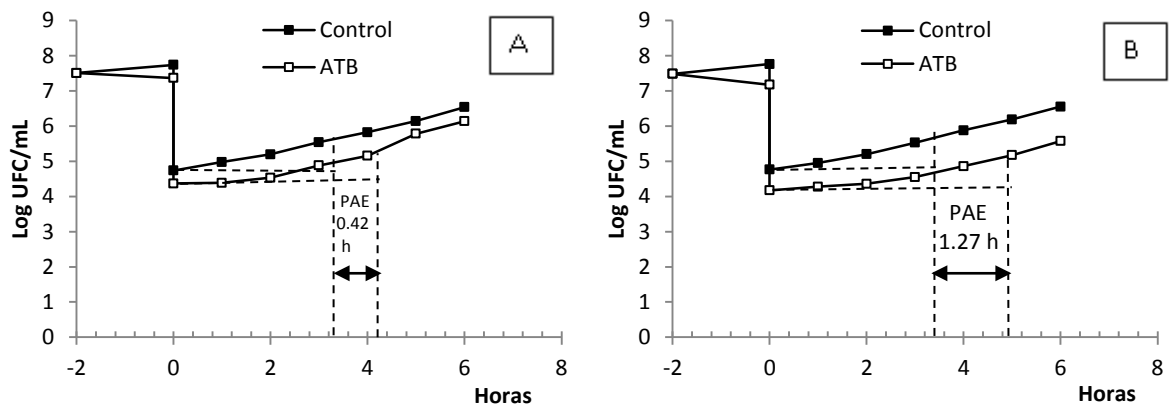


Figura 132. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a penicilina G incrementaron el número de bacterias viables en 1 \log_{10} respecto de controles (sin penicilina G) en CMH

En la cepa de referencia ATCC, el tiempo en el cual se presentó un aumento de 1 \log_{10} en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 3.58 horas y el cultivo tratado aumentó 1 \log_{10} luego de 3.99 h después de la retirada del antimicrobiano, con lo cual la diferencia entre estos 2 valores nos representa el valor de PAE, que en este caso fueron escasas 0.42 horas. Frente a las cepas salvajes, el tiempo en el cual aumentó 1 \log_{10} el

cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 3.58 h y el cultivo tratado aumentó 1 Log₁₀ luego de 4.86 h tras la retirada del antimicrobiano, arrojando un PAE de 1.27 h (Tabla 71).

Tabla 71. PAE presentado por danofloxacina en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	PAE
Control	0	4.74	3.58	5.74	
ATB	0	4.37	3.99	5.37	0.42
CEPAS SALVAJES (n=2)					
Control	0	4.76	3.58	5.76	
ATB	0	4.17	4.86	5.18	1.27

5.6.1.3.2. PENICILINA G EN LECHE.

Cuando evaluamos la existencia de PAE para penG en leche (pH 6.5 – 6.8) encontramos un aumento en la persistencia de este efecto con respecto al estimado para CMH 7.4 (Figura 132 y Tabla 71). En leche, la concentración de penicilina G a la cual fue expuesto el cultivo tratado, fue la misma que en CMH, 1µg/mL (4 veces la CIM –0.25 µg/mL- de penicilina G obtenida a pH 6.5).

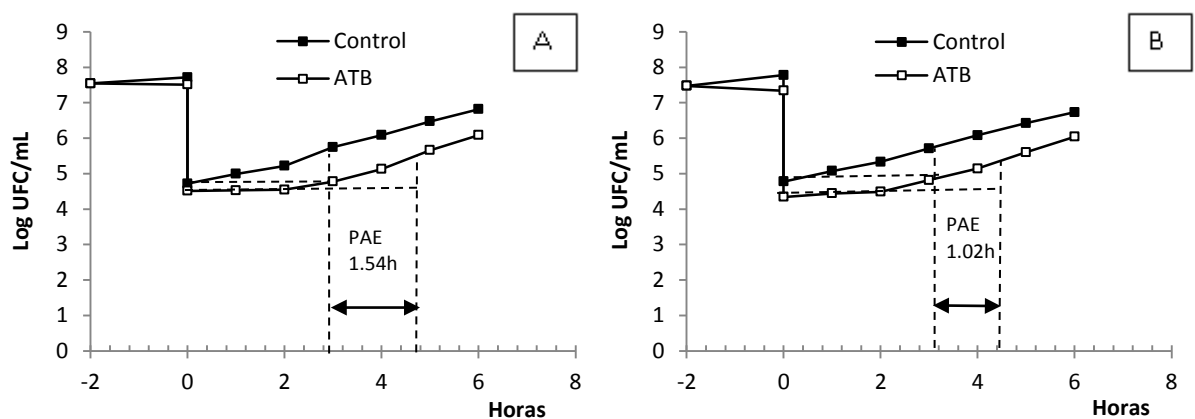


Figura 133. Estimación del PAE (horas) como la diferencia de tiempo en el que los inóculos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y de aislamientos salvajes (n = 2)(B) expuestos a penicilina G incrementaron el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto de controles (sin penicilina G) en leche.

En la cepa ATCC 29213, el tiempo en el cual se presentó un aumento de 1 log₁₀ en el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue de 3 horas y el cultivo tratado aumento 1 log₁₀

luego de 4.54 h después de la retirada del antimicrobiano, con lo cual la diferencia entre estos 2 valores nos representa el valor de PAE, que en este caso fueron 1.54 horas. Frente a las cepas salvajes, el tiempo en el cual aumentó 1 \log_{10} el cultivo control, a partir del tiempo 0 fue 3.14 h y el cultivo tratado aumentó 1 \log_{10} luego de 4.16 h tras la retirada del antimicrobiano, arrojando un PAE de 1.02 h (Tabla 72).

Tabla 72. PAE presentado por danofloxacina en leche frente a *S. aureus* ATCC 29213 y cepas aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica.

	ATCC 29213				
	T1 (h)	Log ufc/mL	T2 (h)	Log ufc/mL	EPA
Control	0	4.72	3.00	5.75	
ATB	0	4.51	4.54	5.52	1.54
CEPAS SALVAJES (n=2)					
Control	0	4.78	3.14	5.78	
ATB	0	4.34	4.16	5.34	1.02

5.6.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO IN-VIVO

El efecto postantibiótico (PAE) es uno de los parámetros más ampliamente estudiados, obteniéndose gran cantidad de información en estudios tanto in vitro como in vivo.

El PAE In vivo es generalmente definido de acuerdo a la fórmula: $PAE = T - C$, donde T es el tiempo requerido para que el número de UFC en los animales tratados se incremente 1 \log_{10} a partir del tiempo en que los niveles plasmáticos de antibacteriano descienden de la CIM y, C es el tiempo requerido para que el número de UFC en animales control incremente 1 \log_{10} a partir del momento 0 (Craig y Gudmundsson, 1996).

La determinación del PAE in vivo de danofloxacina frente a *S. aureus*, utilizando la metodología descrita por Craig en 1996, mostró una duración de 2.26 ± 0.48 horas, es decir presentó un efecto post antibiótico ligeramente más prolongado que el obtenido en los ensayos in vitro, tanto en CMH como en leche.

En la Tabla 73, se presentan los datos que nos permitieron determinar el PAE in vivo para danofloxacin frente a *S. aureus* ATCC 29213 en un modelo de infección en muslo de ratón neutropénico.

Tabla 73. Determinación del PAE in vivo para danofloxacin mediante un modelo de infección en muslo de ratón neutropénico (Promedio \pm DE).

Tiempo Horas	Log ₁₀ ufc/mL Tratados		Log ₁₀ ufc/mL Control		Concentración muscular μ g/g		Concentración sérica μ g/mL	
	Promedio T	DE	Promedio C	DE	μ g/g	DE	μ g/mL	DE
-2	6.48	0.26	6.03	0.44	0	0	0	0
0	6.55	0.07	6.31	0.49	0	0	0	0
1	6.82	0.10	6.98	0.02	6.51	1.94	1.95	0.41
2	6.44	0.36	7.07	0.01	7.81	6.09	2.21	0.50
3	6.42	0.11	7.36	0.09	7.02	1.17	1.46	0.31
4	6.58	0.12	7.54	0.08	2.04	0.62	0.69	0.09
5	6.38	0.25	8.01	0.01	1.78	0.60	0.49	0.03
6	6.37	0.18	8.38	0.07	1.71	0.38	0.40	0.02
7	6.77	0.15	8.64	0.15	1.41	0.35	0.30	0.03
8	6.99	0.30	9.07	0.09	1.05	0.23	0.24	0.04
9	7.29	0.39	9.49	0.14	0.77	0.18	0.19	0.03
10	7.99	0.23	9.89	0.14	0.64	0.09	0.12	0.03

Donde:

Promedios T: Log₁₀ de las ufc/mL obtenidas a partir de los animales tratados (n = 4) a los diferentes tiempos de muestreo.

Promedios C: Log₁₀ ufc/mL obtenidas de los animales control (n = 2) a los diferentes tiempos de muestreo.

Concentración sérica de danofloxacin: concentraciones promedio \pm DE de danofloxacin obtenidas en los animales del grupo tratado, expresadas en μ g/mL. Se debe considerar el tiempo en el cual las concentraciones (en cada uno de los 4 animales tratados) caen por debajo de los valores de CIM, en nuestro caso se dio a las 4 horas en todos los animales (se identifica en la Tabla 73 en color rojo).

Al tiempo en que las ufc/mL en los cultivos tratados aumentan 1 log, a partir de la hora 4 (T^1) y que en promedio corresponde a 9.16 ± 0.48 h, lo denominamos T^{1b} , por lo tanto definimos T^2 como $T^{1b} - T^1$

A su vez, el cultivo control tarda 2.90 horas en incrementar 1 log₁₀ su número de ufc/mL a partir del tiempo 0 = C

En la Tabla 74 se presentan los cálculos efectuados para determinar el PAE de danofloxacin en cada uno de los animales experimentales utilizados.

Tabla 74. PAEs de danofloxacin obtenidos in vivo aplicando un modelo de infecci3n por *Staphylococcus aureus* en muslo de rat3n

	(h)	Log ₁₀ ufc/mL	T ^{1b} (h)	T ² (h)	Pr.C (h)	Log ₁₀ ufc/mL	PAE (h)	Pr.(h)	DE(h)
ATB 1	T ¹ =4	6.41	9.38	5.38		7.41	2.48		
ATB 2	T ¹ =4	6.61	9.20	5.2		7.61	2.30	2.26	0.48
ATB 3	T ¹ =4	6.69	8.48	4.48		7.69	1.58		
ATB 4	T ¹ =4	6.61	9.58	5.58		7.61	2.68		
Control 1	C=0	6.66		3.83	} 2.90	7.66			
Control 2	C=0	5.96		1.97		6.96			

De esta manera definimos el PAE como T²- C:

$$\text{PAE 1} = 5.38 - 2.90 = 2.48 \text{ h;}$$

$$\text{PAE 2} = 5.20 - 2.90 = 2.30 \text{ h;}$$

$$\text{PAE 3} = 4.48 - 2.90 = 1.58 \text{ h;}$$

$$\text{PAE 4} = 5.58 - 2.90 = 2.68 \text{ h}$$

En la Figura 134 se presenta la evoluci3n de las UFC de *S. aureus* ATCC 29213/mL de homogenato en funci3n del tiempo en cada uno de los animales control (n = 2) y en cada uno de los animales tratados con danofloxacin (n = 4) tras realizar la infecci3n en el muslo.

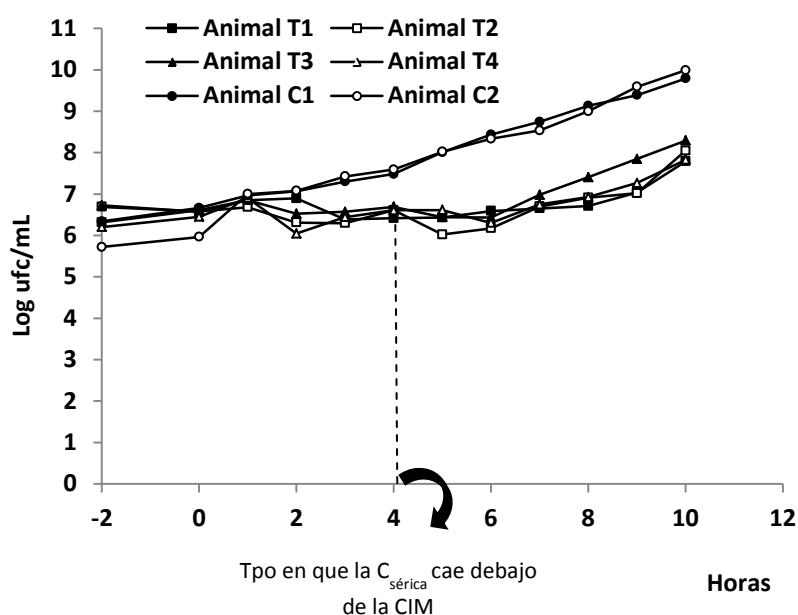


Figura 134. Evolución de las ufc/mL de *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección en muslo de ratones para evaluar la duración del PAE in vivo.

5.6.1.1. Cuantificación de danofloxacina

La cuantificación de danofloxacina en suero y en homogenato de músculo de ratón, fue realizada por cromatografía líquida de alta presión con detección por fluorescencia tras su extracción en fase líquida, siguiendo una metodología analítica validada en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) (Mestorino. *et al.*, 2009).

Bajo las condiciones analíticas empleadas se determinó que el tiempo de retención de danofloxacina fue 6.6 ± 0.2 min.

Se preparó una solución estándar de danofloxacina conteniendo $0.100 \mu\text{g/mL}$ (100 ng/mL) 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, obteniéndose luego de veinte inyecciones un coeficiente de variación (CV) de 5.23 %. No existió con la técnica utilizada interferencias en los tiempos de retención correspondientes a los picos de danofloxacina, comprobando así la especificidad de la misma.

En cuanto a la linealidad, se preparó por duplicado una batería de 6 diluciones stock del analito en el rango de concentraciones mencionadas. 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. Las rectas de calibración de los estándares en ácido, suero y músculo pueden observarse en la Figura 135 (A, B y C, respectivamente).

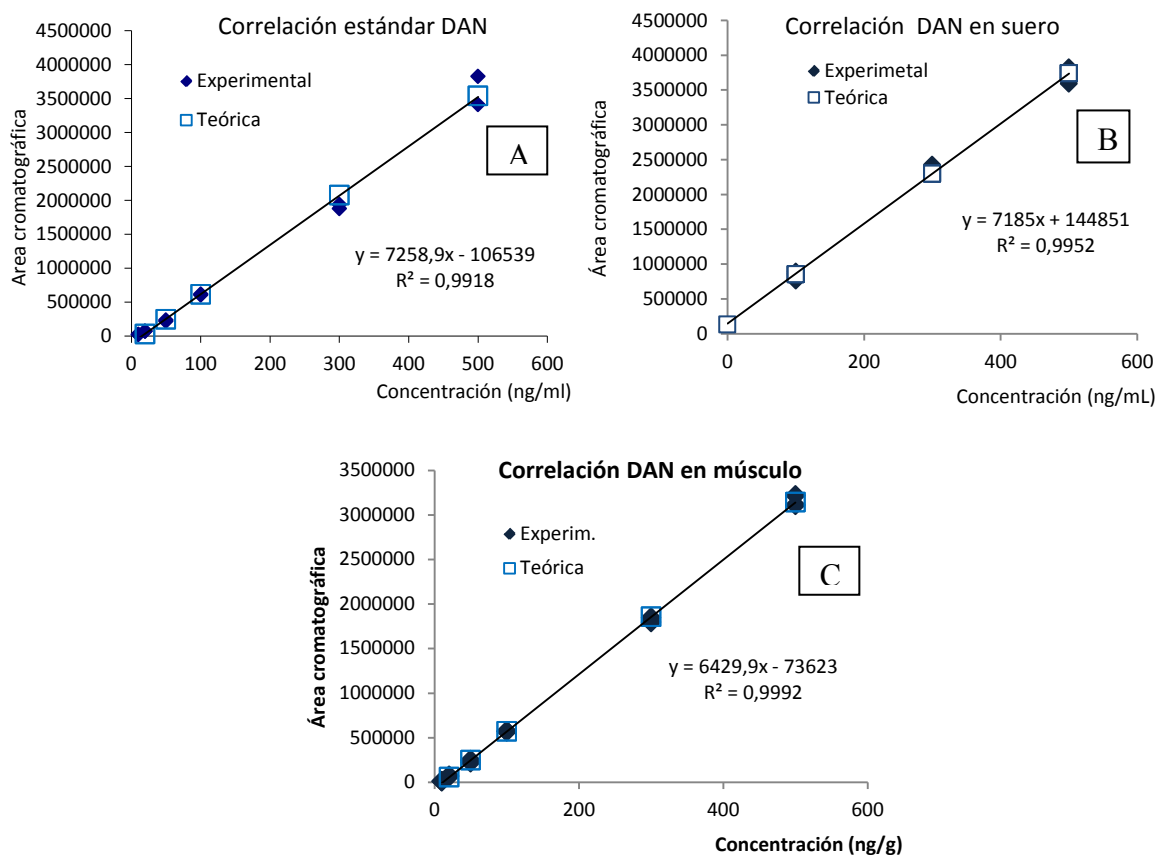


Figura 135. Rectas de calibración mediante ajuste lineal del área de pico cromatográfico de estándares de danofloxacina en ácido fosfórico 0.05 M (A), en suero (B) y en músculo (C) en un rango de concentración 10 a 500 ng/0.2 mL.

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de danofloxacina en suero fueron 0.005 y 0.010 $\mu\text{g/mL}$ y en músculo 0.006 y 0.010 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

En la Tabla 75 se presentan los parámetros de la re-validación de la técnica analítica en suero y en músculo intra-día e inter-día (% de recuperación, % de exactitud (RSD) y % de precisión (CV).

Tabla 75. Resultados de la re-validación de danofloxacin en suero y en músculo de ratón

Matriz	r	µg/mL	Intra-día			Inter-día (n=3)		
			Rec. (%), n=6	Exactitud (%), n=6	Precisión (%), n=6	Rec. (%)	Exactitud (%)	Precisión (%)
Suero	0.9959 (0.1-0.5 µg/mL)	0.100	96.38	-3.62	7.85	98.15	-1.50	1.63
		0.300	103.81	3.81	1.53	98.72	2.23	2.60
		0.500	98.89	-1.11	2.99	97.42	-1.87	2.19
Músculo	0.9996 (0.01- 0.5 µg/mL)	0.010	128.94	28.94	0.38	129.29	29.29	0.91
		0.020	109.11	9.11	3.00	106.80	6.80	3.40
		0.050	95.24	-4.76	5.54	91.51	-8.49	3.30
		0.100	100.24	0.24	0.01	100.23	0.23	1.02
		0.300	98.05	-1.95	1.84	96.77	-3.23	2.27
		0.500	100.65	0.65	2.31	99.01	-0.99	2.15

5.6.1.2. Concentraciones de danofloxacin en suero y en músculo

Las concentraciones individuales y promedio \pm desvío estándar (DE) de danofloxacin en suero y en músculo obtenidas tras la administración de 10 mg/kg de DAN intramuscularmente a los ratones utilizados en el ensayo de PAE in vivo se presentan en las Tablas 76 y 77 respectivamente. Mientras que en la Figura 134 se integran las concentraciones de danofloxacin en muslo y en suero con la evolución de las ufc/mL obtenidas tras la infección experimental ocasionada tanto en los animales tratados como en el grupo control.

En la grafica se puede apreciar que a partir de las 3 h post tratamiento, las concentraciones de danofloxacin comienzan a descender tanto en suero como en el muslo para caer en suero por debajo de la CIM de danofloxacin frente a *S. aureus* a las 4 horas. Recordemos que 4 h, es el momento T¹ en suero de los animales tratados. A partir de este momento, aproximadamente a las 2.26 h se evidencia el recrecimiento del *S. aureus* en los animales tratados.

Es interesante observar que coincidiendo con la concentración máxima alcanzada (C_{max}) tanto en suero como en músculo, las ufc/mL, en el grupo tratado, sufren un descenso.

Tabla 76. Concentraciones séricas individuales y promedio \pm DE obtenidas tras la administración de 10 mg/kg de DAN por la vía intramuscular

Concentraciones séricas de DAN						
Tiempo (h)	1 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	Promedio $\mu\text{g/mL}$	DE
-2	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1	1.38	2.33	1.93	2.16	1.95	0.41
2	2.78	2.24	1.80	2.02	2.21	0.42
3	1.16	1.59	1.59	1.50	1.46	0.20
4	0.75	0.68	0.65	0.69	0.69	0.04
5	0.48	0.50	0.46	0.50	0.49	0.02
6	0.38	0.42	0.37	0.42	0.40	0.03
7	0.31	0.28	0.30	0.30	0.30	0.01
8	0.22	0.26	0.23	0.23	0.24	0.02
9	0.18	0.18	0.20	0.19	0.19	0.01
10	0.14	0.13	0.11	0.11	0.12	0.02

Tabla 77. Concentraciones musculares individuales y promedio \pm DE en músculo de ratones tras la administración de 10 mg/kg de DAN por la vía intramuscular

Concentraciones musculares de DAN						
Tiempo (h)	1 $\mu\text{g/g}$	2 $\mu\text{g/g}$	3 $\mu\text{g/g}$	4 $\mu\text{g/g}$	Promedio $\mu\text{g/g}$	DE
-2	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1	6.33	4.00	8.67	7.05	6.51	1.94
2	12.49	2.69	13.64	2.42	7.81	6.09
3	5.30	7.90	7.51	7.36	7.02	1.17
4	2.75	1.51	1.54	2.37	2.04	0.62
5	1.92	2.51	1.62	1.07	1.78	0.60
6	2.15	1.22	1.68	1.79	1.71	0.38
7	1.11	1.10	1.74	1.69	1.41	0.35
8	0.97	0.83	1.01	1.37	1.05	0.23
9	0.79	0.51	0.92	0.87	0.77	0.18
10	0.61	0.63	0.56	0.77	0.64	0.09

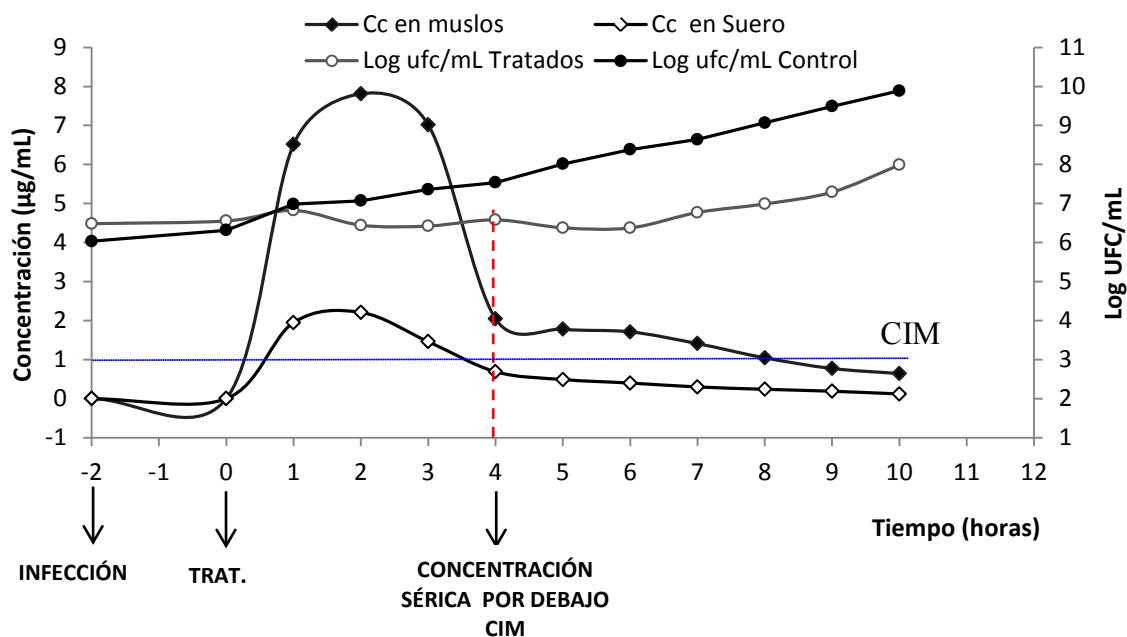


Figura 136. Perfil de las concentraciones séricas y tisulares seguido por DAN tras su administración intramuscular en ratones. Integración con la evolución de las ufc/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC control y tratadas con DAN obtenidas luego de realizar la infección en los ratones para evaluar el PAE de la danofloxacina in vivo.

A partir de las concentraciones obtenidas en suero y en músculo tras la administración intramuscular de DAN a razón de 10 mg/kg se realizó un análisis farmacocinético aplicando un modelo no compartimental en ambos casos, mediante el paquete informático WinNonlin Professional versión 6.4 (Pharsight Corp. 2012). Para el cálculo del área bajo la curva concentración plasmática en función del tiempo (ABC) se utilizó la regla trapezoidal lineal.

Entre los parámetros de relevancia clínica se encuentran la concentración máxima alcanzada en suero y en músculo (C_{max} , µg/mL o µg/g); el tiempo máximo que corresponde al tiempo en que se alcanza la C_{max} (T_{max} , h), la constante de eliminación (λ , h^{-1}), la semivida de eliminación ($T_{1/2}$, h); el área bajo la curva concentración sérica o tisular en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo final (ABC_{0-10h} , µg.h/mL o µg.h/g), el área bajo la curva concentración sérica o tisular extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$, µg.h/mL o µg.h/g) y el tiempo medio de residencia (TMR, h) que también puede ser hasta el último momento analizado o extrapolado al infinito y se refiere al promedio del tiempo que permanece una partícula en el sistema. Los parámetros farmacocinéticos mencionados se presentan en la Tabla 78.

Los parámetros necesarios para llevar a cabo la integración PK/PD y establecer los parámetros predictores de eficacia son C_{max} , % de tiempo en que las concentraciones se ubican por encima de la CIM durante el intervalo de dosis y el ABC_{0-24h} .

Tabla 78. Parámetros farmacocinéticos individuales y promedio \pm DE en suero y en músculo obtenidos por análisis no compartimental tras la administración intramuscular de danofloxacina a ratones neutrópicos en el ensayo de PAE in vivo

Parámetro	Unidad	1	2	3	4	Promedio	DE
Suero							
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$	2.78	2.33	1.93	2.16	2.30	0.36
T_{max}	h	2	1	1	1	1.25	0.50
λ	h^{-1}	0.25	0.35	0.27	0.29	0.29	0.04
$T_{1/2}$	h	2.77	2.00	2.60	2.41	2.45	0.33
ABC_{0-10h}	$\mu\text{g.h/mL}$	7.56	8.45	7.50	7.98	7.87	0.44
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.h/mL}$	8.12	8.82	7.91	8.37	8.31	0.39
$ABMC_{0-10h}$	$\mu\text{g.h.h/mL}$	24.35	25.64	23.67	24.70	24.59	0.82
$ABMC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.h.h/mL}$	32.20	30.47	29.34	29.87	30.47	1.24
TMR_{0-10h}	h	3.22	3.03	3.16	3.09	3.13	0.08
$TMR_{0-\infty}$	h	3.96	3.45	3.71	3.57	3.67	0.22
Músculo							
C_{max}	$\mu\text{g/g}$	12.49	7.9	13.64	7.36	10.35	3.18
T_{max}	h	2	3	2	3	2.50	0.58
λ	h^{-1}	0.23	0.28	0.35	0.28	0.29	0.05
$T_{1/2}$	h	2.99	2.47	1.98	2.46	2.48	0.41
ABC_{0-10h}	$\mu\text{g.h/g}$	33.38	21.60	37.50	25.77	29.56	7.20
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.h/g}$	36.01	23.85	39.10	28.51	31.87	6.95
$ABMC_{0-10h}$	$\mu\text{g.h.h/g}$	106.07	78.56	112.56	92.74	97.48	15.07
$ABMC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.h.h/g}$	143.71	109.05	133.17	129.85	128.95	14.52
TMR_{0-10h}	h	3.18	3.64	3.00	3.60	3.35	0.31
$TMR_{0-\infty}$	h	3.99	4.57	3.41	4.55	4.13	0.55

5.7. CAPTACION Y ACTIVIDAD INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS

La relacion existente entre los antibacterianos y los neutrófilos PMNs, genera una sinergia que posibilita y hace mas eficaz la acción antibacteriana por parte de estos últimos; de hecho, los diferentes mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos hacen a las bacterias más susceptibles a la muerte por acción de los neutrófilos, incluso a concentraciones subinhibitorias (Mandell y Coleman, 2001).

De la misma manera y como lo hemos comentado con antelación, en la lucha contra las bacterias de vida intracelular, obligatoria o facultativa, como es el caso del *S. aureus*, necesitamos conocer cuales aquellos antibacterianos que mejor penetran, se concentran y actúan en el interior celular, a fin de diseñar planes terapéuticos más eficaces.

Para determinar la penetración y actividad antibacteriana de azitromicina, danofloxacina y penicilina G, diseñamos un ensayo que constó de las siguientes etapas:

- 1. Separación celular de PMNs de sangre y leche bovina.**
- 2. Exposición de los PMNs a cada antibacteriano.**
- 3. Evaluación de la captación Intracelular de cada antimicrobiano.**

Todos estos procedimientos están documentados y explicados en el apartado 4.2.7. de materiales y métodos.

5.7.1. CAPTACIÓN CELULAR DE LOS ANTIMICROBIANOS

5.7.1.1. Cuantificación intra y extracelular de azitromicina y penicilina G

La cuantificación intra y extracelular de Azitromicina y Penicilina G fue realizada por método microbiológico empleando *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*Sarcina lútea*) como microorganismo testigo, técnica cilindro placa validada en nuestro laboratorio, según detallamos en el apartado de materiales y métodos (punto 4.2.7.8.2.).

Las rectas de calibración de los estándares de azitromicina y de penicilina G en buffer fosfato, solución fisiológica y RPMI pueden observarse en las Figura 137 y 138 (A, B y C,

respectivamente). Mientras que en las Tablas 79 y 80 se presentan los coeficientes de correlación, intersección y pendiente para azitromicina y para penicilina G en Buffer, solución fisiológica y RPMI, respectivamente.

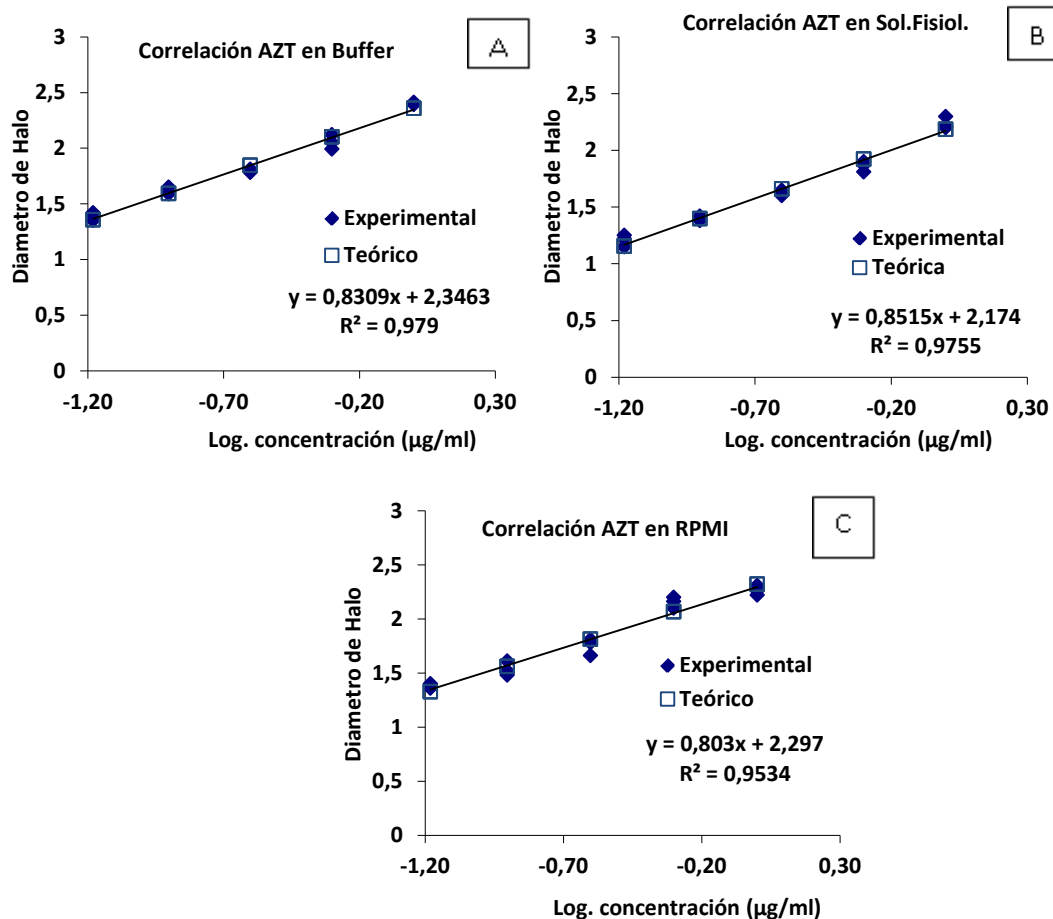


Figura 137. Rectas de calibración mediante ajuste lineal del diámetro del halo de inhibición de estándares de azitromicina en Buffer fosfato de Na 0.1M pH 8 (A), en solución fisiológica (B) y en RPMI (C) en un rango de concentración 0.0625 a 1 µg/mL (expresadas en logaritmo).

Tabla 79. Coeficientes de correlación, intersección y pendientes obtenidos para azitromicina en buffer fosfato pH 8, solución fisiológica y RPMI

AZT (0.625 - 1) µg/mL	r	Intersección	Pendiente
Buffer fosfato pH 8	0.98944	-2.78	1.18
Sol. Fisiológica	0.98765	-2.51	1.15
RPMI	0.97642	-2.75	1.19

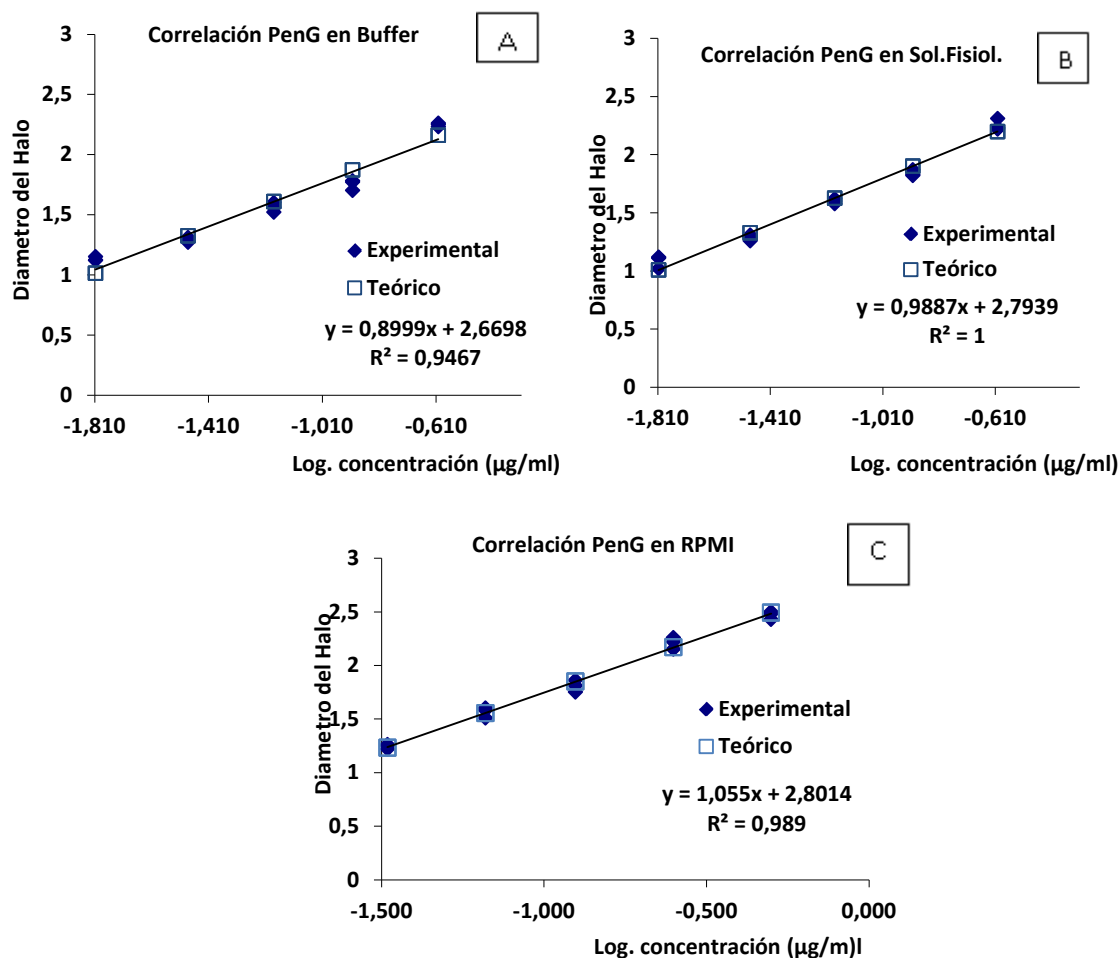


Figura 138. Rectas de calibración mediante ajuste lineal del diámetro del halo de inhibición de estándares de Penicilina G en Buffer fosfato de Na 0.1M pH 6 (A), en solución fisiológica (B) y en RPMI (C) en un rango de concentración 0.0156 a 0.25 µg/mL (expresadas en logaritmo).

Tabla 80. Coeficientes de correlación, intersección y pendientes obtenidos para penicilina G en buffer fosfato pH 6, solución fisiológica y RPMI

PenG (0.0156 - 0.25) µg/mL	r	Intersección	Pendiente
Buffer fosfato pH 6	0.97299	-2.87	1.05
Sol. Fisiológica	0.98860	-2.82	1.01
RPMI	0.99449	-2.63	0.94

5.7.1.2. Cuantificación de danofloxacina

La cuantificación intra y extracelular de danofloxacina fue realizada por cromatografía líquida de alta presión con detección por fluorescencia tras su extracción en fase líquida, siguiendo una metodología analítica validada en el Laboratorio de Estudios

Farmacológicos y Toxicológicos (LEFYT) (Mestorino. *et al.*, 2009), según se detalló en el apartado 4.2.6.2.2. de materiales y métodos y cuyos resultados de validación se presentaron en 5.6.1.1.

Las rectas de calibración de los estándares de danofloxacina en ácido fosfórico, solución fisiológica y RPMI pueden observarse en las Figura 139 (A, B y C, respectivamente). Mientras que en la Tablas 81 se presentan los coeficientes de correlación, intersección y pendiente respectivamente.

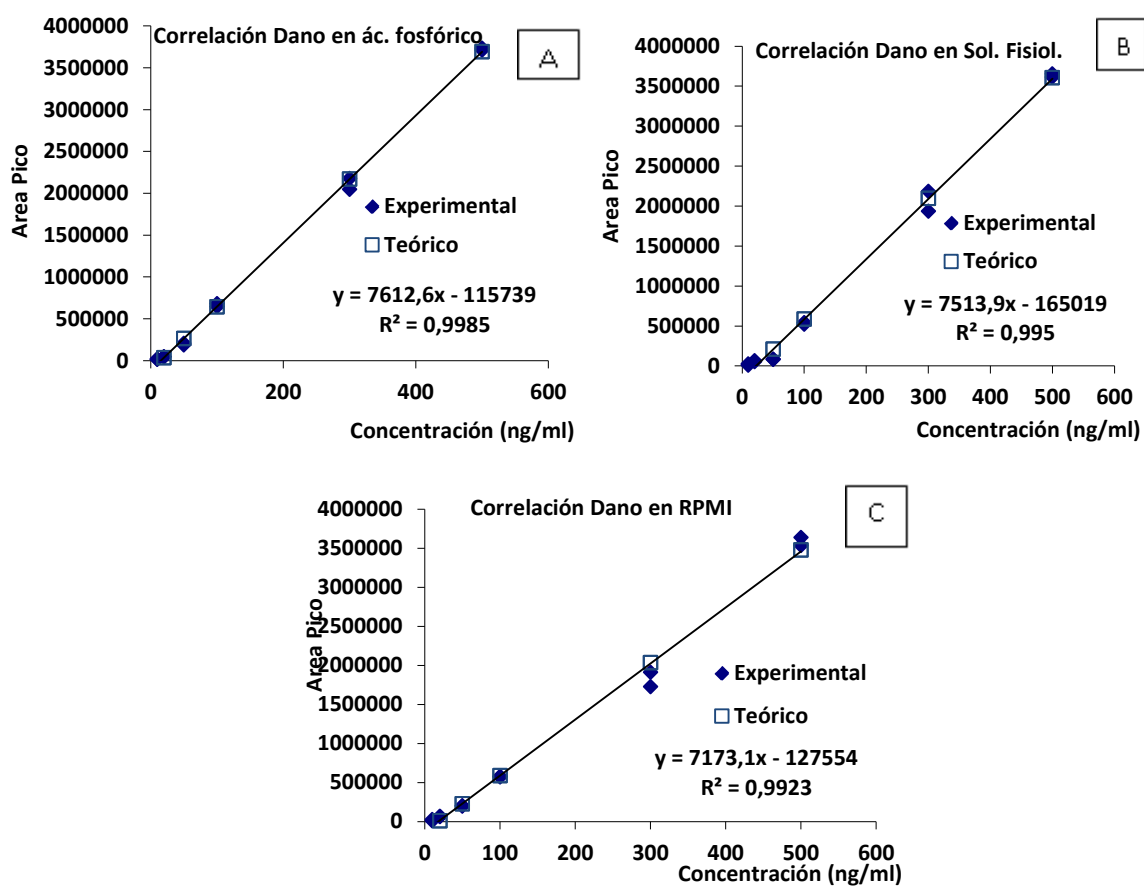


Figura 139. Rectas de calibración mediante ajuste lineal del diámetro del halo de inhibición de estándares de Danofloxacina en ácido fosfórico 0.05 M (A), en solución fisiológica (B) y en RPMI (C) en un rango de concentración 10 a 500 ng/mL.

Tabla 81. Coeficientes de correlación, intersección y pendientes obtenidos para danofloxacina en ácido fosfórico 0.05 M, solución fisiológica y RPMI

Dano (10 - 500 ng/mL)	r	Intersección	Pendiente
Ác. Fosfórico 0.05M	0.99923	15.43	0.0001
Sol. Fisiológica	0.99751	22.66	0.0001
RPMI	0.99612	18.91	0.0001

A partir de las curvas de calibración obtenidas para cada antimicrobiano ensayado se obtuvieron las concentraciones en los fluidos extracelulares y en el contenido de PMN (previa lisis celular), siempre corrigiendo por el volumen celular como se explicó en materiales y métodos.

En la siguiente Tabla 82 se presentan los resultados de la captación intracelular de cada uno de los antimicrobianos por parte de los PMNs (IC), su concentración equivalente a nivel del fluido extracelular (EC) y la relación entre ambos (R IC/EC). Para calcular las concentraciones intracelulares de cada antimicrobiano se consideró un volumen celular medio de 2.5 μL para 1×10^6 PMN.

Tabla 82. Concentración intracelular, extracelular y relación IC/EC para azitromicina, danofloxacina y penicilinaG

ANTIMICROBIANO	IC ($\mu\text{g/mL}$)	EC ($\mu\text{g/mL}$)	R IC/EC
Azitromicina	387.75	0.84	462/1
Danofloxacina	18.03	2.87	6.28/1
Penicilina G	1	2.26	0.44/1

5.7.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ANTIMICROBIANOS A NIVEL INTRACELULAR

Una vez comprobada la capacidad de penetración intracelular de los antimicrobianos objeto de este estudio, procedimos a analizar la actividad antibacteriana de cada uno de ellos frente a *Staphylococcus aureus* a nivel intracelular. Para lo cual, diseñamos un desafío en el cual PMNs suspendidos en medio RPMI 1640 con cantidades conocidas de UFC de *S. aureus* fagocitadas, se expusieron a concentraciones terapéuticas de cada uno de los antimicrobianos en estudio durante un periodo de 5 horas a 37°C en estufa de cultivo.

Luego, mediante siembra directa del contenido celular, evaluamos el efecto de cada antimicrobiano frente al *S. aureus* a nivel intracelular.

5.7.2.1. Acción de AZITROMICINA frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y de leche de vacas

Como vimos en los ensayos anteriores, azitromicina tiene una excelente capacidad de penetración a nivel celular, 462 veces con respecto al medio extracelular y a medida que el pH se torna más ácido aumenta notablemente su CIM₅₀ (de 1 µg/mL pH 7.4 –EC- aumenta a ≥ 64 µg/mL a pH 5.0 –IC-). Recordemos que azitromicina según pautas PK/PD, es un antimicrobiano acción tiempo dependiente con prolongada persistencia, aunque frente a *S. aureus* mostró un EPA moderado.

Tras 90 min de exposición, se produjo una adecuada internalización del *S. aureus*, ya que, 5.23 y 5.32 log₁₀ ufc/mL fueron fagocitados por los PMNs sanguíneos y obtenidos de leche bovina (Figura 140, A y B, respectivamente). Cuando los cultivos celulares (PMN + *S. aureus*) no fueron tratados con antimicrobiano, al cabo de 5 horas, no observamos incremento en el número de ufc/mL. Una explicación, es que los *S. aureus* no se reprodujeron en el interior celular, es decir disminuyeron su metabolismo, a lo que llamamos sueño bacteriano (Figura 140 A-B, Tabla 83).

Los *S. aureus* intracelulares tratados con una dosis terapéutica de azitromicina (5xCIM) por espacio de 5 horas, sufrieron una reducción de 1.77 Log₁₀ (Tabla 83) con relación al número inicial de bacterias fagocitadas en los PMNs sanguíneos, y un efecto menor en los PMNs de origen mamario (-1.66). Esto demuestra que azitromicina presentó un efecto bacteriostático solamente, un índice de actividad antibacteriana de -1.77 / -1.66 no alcanza para considerar efecto bactericida (Efecto bacteriostático: $E = 0$ y Efecto bactericida: $E = -3$; cuando la reducción es de ≥ 3 log₁₀ de $n_{t=0}$ por eliminación del 99.9% de las bacterias iniciales). Aquí obtuvimos una eliminación del 98.03 y 97.44% en ambos cultivos (Tabla 83).

Tabla 83. Efecto de la azitromicina sobre *S. aureus* localizados a nivel subcelular en PMN obtenidos de sangre y de leche de vacas Holando Argentino (n = 3 ensayos), % de eficacia e Índice antibacteriano (E)

PMNs sanguíneos	Log ufc/mL	DE	Prom ufc/mL	%	%Eficacia	E (Δ Log ufc _{5-0h})
UFC inicial (EC)	7.62	0.05	41950000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min-T _{1control})s/AZT	5.23	0.05	169000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2control}) s/AZT	5.22	0.04	165000	97.63		-0.01
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2ATB}) c/AZT	3.46	0.28	3333	1.97	98.03	-1.77
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0	---	---	---	---
PMNs de leche						
UFC inicial (EC)	7.7	0.08	49950000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min-T _{1control})s/AZT	5.32	0.04	208000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2control}) s/AZT	5.59	0.06	388000	186.54		0.27
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2ATB}) c/AZT	3.66	0.32	5333	2.56	97.44	-1.66
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0	---	---	---	---

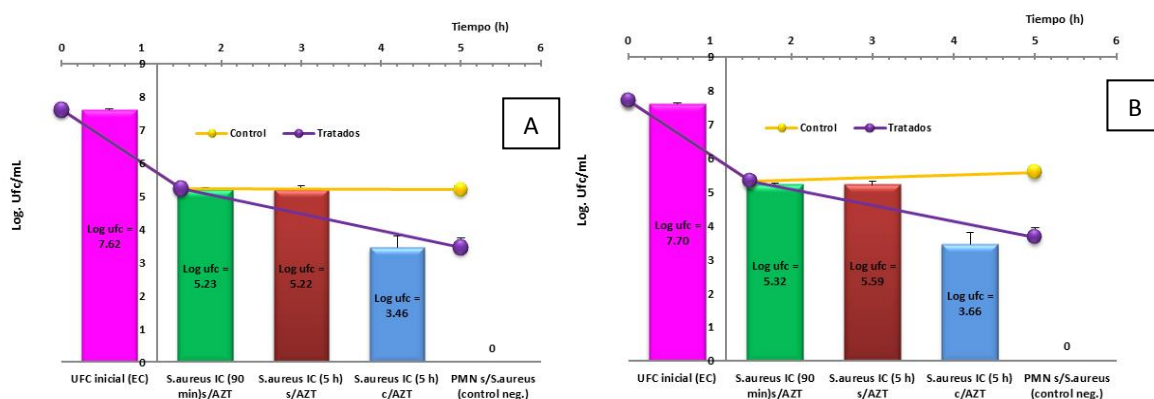


Figura 140. Representación gráfica promedio del efecto ejercido por azitromicina sobre *S. aureus* a nivel IC en PMNs obtenidos de sangre (A) y de leche (B) de vacas Holando Argentino.

5.7.2.2. Acción de DANOFLOXACINA frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y de leche de vacas

Danofloxacin también presentó penetración a nivel celular, pero solo 6 veces con respecto al medio extracelular y a medida que el pH se torna más ácido, su CIM₅₀ se modifica ligeramente (de 0.5 µg/mL pH 7.4 –EC- aumenta a 1-2 µg/mL a pH 5.0 –IC). Según pautas PK/PD, es un antimicrobiano bactericida acción dependiente de la concentración, que frente a *S. aureus* mostró un EPA moderado, de 2.26 ± 0.48 h.

Tras 90 min de exposición, se produjo una adecuada internalización del *S. aureus*, ya que, 5.26 y 5.46 log₁₀ ufc/mL fueron fagocitados por los PMNs sanguíneos y de leche (Figura 141, A y B, respectivamente). Cuando los cultivos celulares (PMN + *S. aureus*) no fueron tratados con antimicrobiano, al cabo de 5 horas, no observamos incremento en el número de ufc/mL, en ninguno de los cultivos celulares. Corroborando lo observado con el ensayo de azitromicina en cuanto a que *S. aureus* disminuye su metabolismo a nivel intracelular (Figura 141 A-B, Tabla 84).

Los *S. aureus* intracelulares tratados con danofloxacina a razón de 10 veces la CIM por espacio de 5 horas, sufrieron una reducción de 1.72 Log₁₀ (Tabla 84) con relación al número inicial de bacterias fagocitadas en los PMNs sanguíneos, y un efecto menor en los PMNs de origen mamario (-1.12). Es interesante el menor efecto observado en los PMNs extraídos de la leche. A pesar de ser un antimicrobiano de acción bactericida, en este ensayo solo logró un efecto bacteriostático, presentó un índice de actividad antibacteriana a nivel IC frente a *S. aureus* de -1.72 / -1.12 y un % de eficacia de 97.80 y 87.91 % en los PMNs extraídos de sangre y de leche, respectivamente (Tabla 84).

Tabla 84. Efecto de danofloxacina sobre *S. aureus* localizados a nivel subcelular en PMN obtenidos de sangre y de leche de vacas Holando Argentino (n = 3 ensayos), % de eficacia e Índice antibacteriano (E)

PMNs sanguíneos	Log.ufc/mL	DE	Prom ufc/mL	%	%Eficacia	Δ Log ufc 5-0h
UFC inicial (EC)	7.71	0.03	51400000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min-T _{1control})s/Dano	5.26	0.03	182000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2control}) s/DANO	5.5	0.1	320500	176.10		0.24
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2ATB}) c/DANO	3.54	0.34	4000	2.20	97.80	-1.72
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0	---	---	---	---
PMNs de leche						
UFC inicial (EC)	7.68	0.06	48550000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min-T _{1control})s/Dano	5.46	0.09	289000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2control}) s/DANO	5.2	0.07	161500	88.74		-0.26
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2ATB}) c/DANO	4.34	0.11	22000	12.09	87.91	-1.12
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0	---	---	---	---

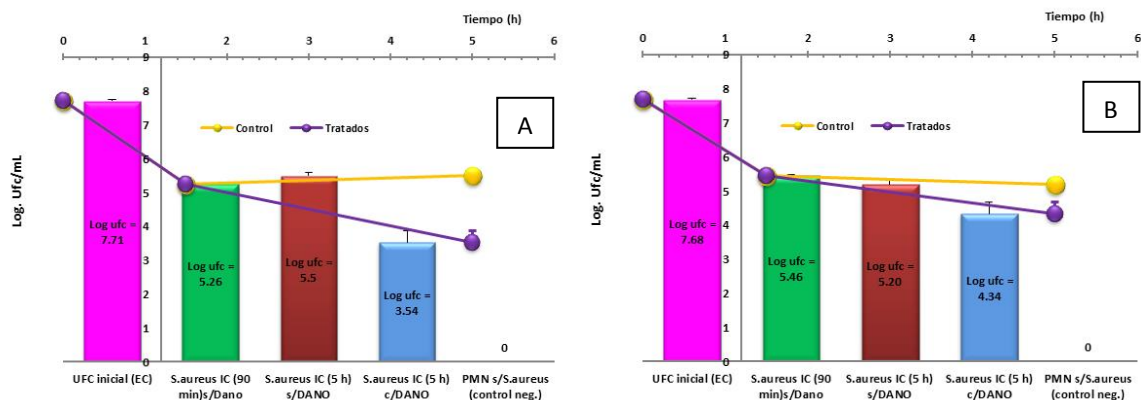


Figura 141. Representación gráfica promedio del efecto ejercido por danofloxacin sobre *S. aureus* a nivel IC en PMNs obtenidos de sangre (A) y de leche (B) de vacas Holando Argentino.

5.7.2.3. Acción de PENICILINA G frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y de leche de vacas

PenicilinaG, por sus características físico-químicas, lógicamente presentó una R IC/EC muy baja (0.44/1). A pH ácido, su CIM₅₀ disminuye notablemente (de 0.125 µg/mL pH 7.4 – EC- disminuye a 0.066 µg/mL a pH 5.0 –IC-). Según pautas PK/PD, es un antimicrobiano bactericida acción dependiente del tiempo de contacto con escaso EPA.

Tras 90 min de exposición, se produjo una adecuada internalización del *S. aureus*, ya que, 5.19 y 5.22 log₁₀ ufc/mL fueron fagocitados por los PMNs sanguíneos y de leche (Figura 142, A y B, respectivamente). Cuando los cultivos celulares (PMN + *S. aureus*) no fueron tratados con antimicrobiano, al cabo de 5 horas, no observamos modificación en la cinética de crecimiento del microorganismo, ya que la diferencia fue solo de 0.18 (diferencia de log₁₀ entre tiempo T_{2control}-T_{1control}). Corroborando lo observado anteriormente (Figura 142 A-B, Tabla 85).

Los *S aureus* intracelulares tratados con penicilina G a razón de 4 veces la CIM por espacio de 5 horas, sufrieron una reducción de 1.63 - / -1.62 Log₁₀ (Tabla 85) con relación al número inicial de bacterias fagocitadas en los PMNs sanguíneos y de leche, respectivamente. A pesar de ser un antimicrobiano de acción bactericida, en este ensayo solo logró un efecto bacteriostático a nivel IC, presentó un índice de actividad antibacteriana a nivel IC frente a *S.*

aureus de -1.63 / -1.62 y un % de eficacia de 97.44 y 97.12 % en los PMNs extraídos de sangre y de leche, respectivamente (Tabla 85).

Tabla 85. Efecto de penicilina G sobre *S. aureus* localizados a nivel subcelular en PMN obtenidos de sangre y de leche de vacas Holando Argentino (n = 3 ensayos), % de eficacia e Índice antibacteriano (E)

PMNs sanguíneos	Log ufc/mL	DE	Prom ufc/mL	%	%Eficacia	Δ Log ufc 5-0h
UFC inicial (EC)	7.76	0.06	58200000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min-T _{1control})s/PenG	5.19	0.02	156000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2control}) s/PenG	5.37	0.09	240000	153.85		0.18
<i>S.aureus</i> IC (5 h-T _{2ATB}) c/PenG	3.56	0.34	4000	2.56	97.44	-1.63
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0				
PMNs de leche						
UFC inicial (EC)	7.77	0.04	58850000			
<i>S.aureus</i> IC (90 min)s/PenG	5.22	0.02	167000	100		
<i>S.aureus</i> IC (5 h) s/PenG	5.39	0.06	249500	159.94		0.17
<i>S.aureus</i> IC (5 h) c/PenG	3.60	0.17	4500	2.88	97.12	-1.62
PMN s/ <i>S.aureus</i> (control neg.)	0	0				

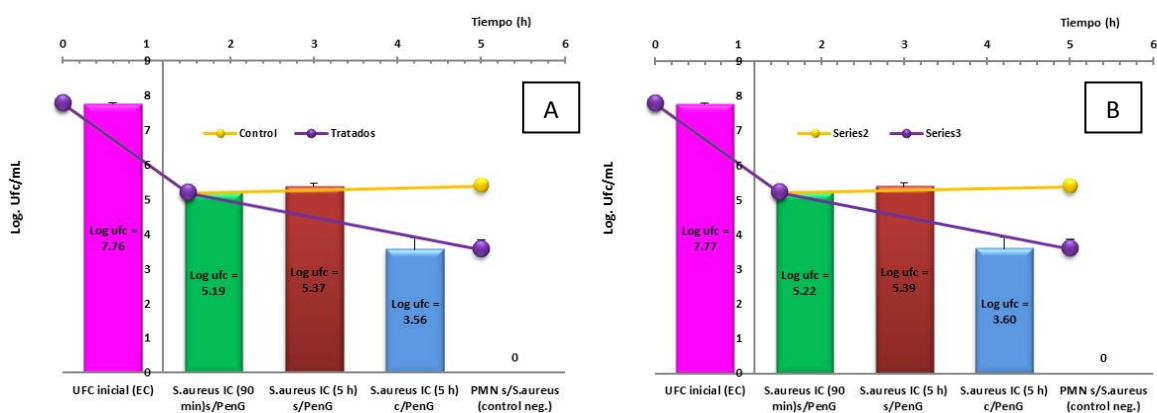


Figura 142. Representación gráfica promedio del efecto ejercido por penicilinaG sobre *S. aureus* a nivel IC en PMNs obtenidos de sangre (A) y de leche (B) de vacas Holando Argentino.

5.8. CINETICA INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

5.8.1. AZITROMICINA

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos orientados a determinar la cinética de penetración y eflujo de azitromicina al interior de leucocitos PMNs, extraídos de sangre bovina y la relación de este evento con la eficacia antibacteriana, frente a *S. aureus*, previamente fagocitados por dichas células.

Azitromicina fue ampliamente captada por los PMNs, sin sufrir saturación durante las primeras 6 h de incubación en donde la relación IC/EC tras los diferentes tiempos de incubación se fue incrementando. A partir de las 8 h, los niveles intracelulares del antimicrobiano comenzaron a descender, evidenciando un lento eflujo del antimicrobiano (Tabla 86).

Tabla 86. Concentraciones individuales y promedio \pm DE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a nivel intracelular y extracelular en función del tiempo de incubación, relación IC/EC.

Tpo (h)	Concentración equivalente AZT-IC				Concetración AZT-EC				RIC/EC
	IC-1	IC-2	Prom	DE	EC-1	EC-2	Prom	DE	
2	209.28	221.84	215.56	8.88	0.78	0.83	0.80	0.03	267.95
4	243.82	253.24	248.53	6.66	0.63	0.69	0.66	0.04	375.94
6	272.07	265.79	268.93	4.44	0.60	0.63	0.61	0.03	437.60
8	265.79	262.65	264.22	2.22	0.69	0.66	0.67	0.02	392.78
12	218.70	206.14	212.42	8.88	0.58	0.60	0.59	0.01	361.61
24	181.02	181.02	181.02	0.00	0.60	0.56	0.58	0.03	314.39

Simultáneamente evaluamos la actividad de la AZT IC frente a *S. aureus*, recordemos que la CIM de AZT a pH 5 (fagolisosoma) aumentaba considerablemente, $\geq 64\mu\text{g}/\text{mL}$. Se lograron concentraciones intracelulares por arriba de la CIM durante un periodo sostenido (Figura 143), pero no se observó un efecto bactericida a este nivel. A partir de las 6 h se evidenció un recrecimiento del inóculo bacteriano.

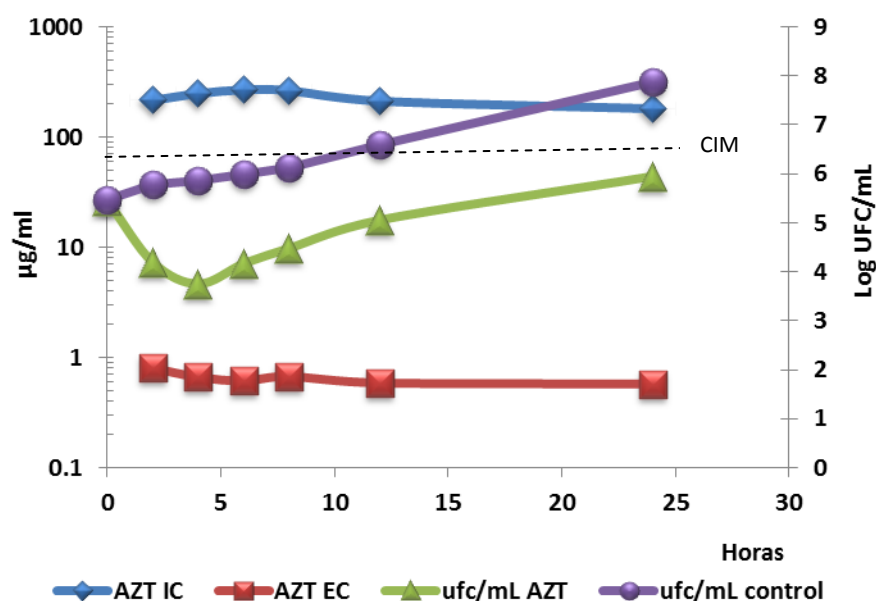


Figura 143. Representación gráfica de los niveles de AZT alcanzados IC en relación a los niveles EC y su acción sobre *S.aureus* (Log ufc/mL) en función del tiempo en comparación a la curva control (sin AZT).

La evolución del Log_{10} ufc/mL frente a azitromicina intracelular en función del tiempo se presenta en la Tabla 87, donde podemos observar que el índice de actividad antibacteriana (E) máximo alcanzado fue -1.70 , nunca se alcanzó una reducción de $\geq -3 \text{ Log}_{10}$ de las ufc/mL para considerar un efecto antibacteriano bactericida.

Tabla 87. Log ufc/mL en presencia de AZT -IC (N= 2) versus control sin AZT (n = 2) , relación IC/EC e índice de actividad antibacteriana para los distintos R IC/EC a los tiempos de incubación del ensayo.

Tpo (h)	Log. ufc/mL _{ATB}	Log. ufc/mL _{control}	R IC/EC	$\Delta \log_{Tn-T0}$	E -Tratado	Control
0	5.45	5.46				
2	4.19	5.78	267.95	$\Delta \log 2h-0h$	-1.26	0.31
4	3.75	5.87	375.94	$\Delta \log 4h-0h$	-1.70	0.41
6	4.17	5.99	437.60	$\Delta \log 6h-0h$	-1.29	0.53
8	4.48	6.13	392.78	$\Delta \log 8h-0h$	-0.97	0.67
12	5.06	6.58	361.61	$\Delta \log 12h-0h$	-0.40	1.12
24	5.95	7.87	314.39	$\Delta \log 24h-0h$	0.50	2.40

Realizamos un análisis no compartimental de los datos de concentración equivalente a nivel intracelular (Tabla 88). Calculamos el predictor de eficacia ABC_{0-24h}/CIM , el cual no fue suficiente para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular.

Tabla 88. Análisis no compartimental de las concentraciones IC de azitromicina en función del tiempo. Predictor de eficacia PK/PD

Parámetro	Unidad	Placa 1	Placa 2	Promedio	DE
λ	h^{-1}	0.0221	0.0204	0.0212	0.001
$T_{1/2\lambda}$	h	31.36	33.99	32.67	1.86
T_{max}	h	6.00	6.00	6.00	0.00
C_{max}	$\mu g/mL$	272.07	265.79	268.93	4.44
ABC_{0-24h}	$h*\mu g/mL$	5083.43	5004.93	5044.18	55.51
$ABC_{0-\infty}$	$h*\mu g/mL$	13273.38	13881.09	13577.24	429.72
MRT_{0-24h}	h	11.70	11.64	11.67	0.04
$MRT_{0-\infty}$	h	47.21	50.90	49.05	2.61
AUC_{0-24h}/CIM	h	79.43	78.20	78.82	0.87

5.8.2. DANOFLOXACINA

Danofloxacina, presentó una acumulación a nivel intracelular entre 6 y 8 veces con respecto al medio extracelular. Hacia las 6 h de incubación la relación IC/EC se incrementó ligeramente, pero a partir de ese momento comenzó a predominar el eflujo. Los niveles intracelulares estuvieron en el orden de más de 10 veces la CIM calculada para *S. aureus* a este nivel (1-2 $\mu g/mL$)(Tabla 89).

Tabla 89. Concentraciones individuales y promedio \pm DE ($\mu g/mL$) a nivel intracelular y extracelular en función del tiempo de incubación, relación IC/EC.

Tpo (h)	Concentración equivalente DAN-IC				Concetración DAN-EC				RIC/EC
	IC-1	IC-2	Prom	DE	EC-1	EC-2	Prom	DE	
2	19.04	19.08	19.06	0.03	2.88	2.86	2.87	0.01	6.64
4	19.99	20.04	20.02	0.04	2.54	2.61	2.58	0.05	7.77
6	19.44	19.20	19.32	0.17	2.41	2.37	2.39	0.03	8.08
8	16.01	15.96	15.99	0.04	2.28	2.20	2.24	0.06	7.14
12	13.82	13.43	13.63	0.28	2.36	2.20	2.28	0.11	5.98
24	11.14	10.84	10.99	0.21	2.28	2.36	2.32	0.06	4.74

Evaluamos la actividad de danofloxacina a nivel IC frente a *Staphylococcus aureus* (Figura 144). A pesar de ser un antimicrobiano acción bactericida concentración dependiente, no se logró este efecto en el ambiente intracelular, ya que el Log ufc/mL cayó 1.98, y se evidenció recrecimiento del inóculo bacteriano.

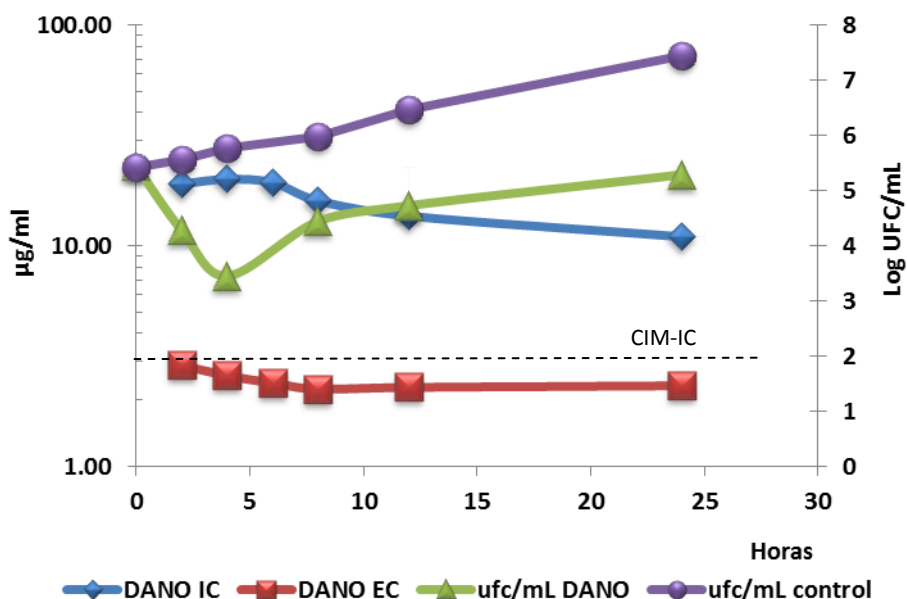


Figura 144. Representación gráfica de los niveles de DANO alcanzados IC en relación a los niveles EC y su acción sobre *S.aureus* (Log ufc/mL) en función del tiempo en comparación a la curva control (sin DANO).

La evolución del Log_{10} ufc/mL frente a danofloxacina a nivel intracelular en función del tiempo se presenta en la Tabla 90, donde podemos observar que el índice de actividad antibacteriana (E) máximo alcanzado fue -1.98, nunca se alcanzó una reducción de $\geq -3 \text{ Log}_{10}$ de las ufc/mL para considerar un efecto antibacteriano bactericida.

Realizamos un análisis no compartimental de los datos de concentración equivalente a nivel intracelular (Tabla 91). Calculamos los predictores de eficacia $C_{\text{max}}/\text{CIM}$ y $\text{ABC}_{0-24\text{h}}/\text{CIM}$, si bien los mismos fueron alcanzados ($C_{\text{max}}/\text{CIM} \geq 10$ y $\text{ABC}_{0-24\text{h}}/\text{CIM} \geq 125$) no fueron suficientes para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular. Este resultado nos deja claro que la acumulación a nivel intracelular no es predictivo de actividad a nivel intracelular.

Tabla 90. Log ufc/mL en presencia de DANO -IC (N= 2) versus control sin DANO (n = 2) , relación IC/EC e índice de actividad antibacteriana para los distintos R IC/EC a los tiempos de incubación del ensayo.

Tpo (h)	Log ufc/mL _{ATB}	Log ufc/mL _{Control}	R IC/EC	$\Delta \log T_n - T_0$	E-Tratado	Control
0	5.43	5.43				
2	4.27	5.57	6.64	$\Delta \log 2h-0h$	-1.16	0.14
4	3.45	5.77	7.77	$\Delta \log 4h-0h$	-1.98	0.35
8	4.44	5.99	7.14	$\Delta \log 8h-0h$	-0.99	0.56
12	4.73	6.46	5.98	$\Delta \log 12h-0h$	-0.71	1.03
24	5.29	7.44	4.74	$\Delta \log 24h-0h$	-0.14	2.01

Tabla 91. Análisis no compartimental de las concentraciones IC de danofloxacina en función del tiempo. Predictores de eficacia PK/PD

Parámetro	Unidad	Placa 1	Placa 2	Promedio	DE
λ	h^{-1}	0.0216	0.0227	0.0222	0.0008
$T_{1/2\lambda}$	h	32.12	30.51	31.31	1.14
T_{max}	h	4.00	4.00	4.00	0.00
C_{max}	$\mu g/mL$	19.99	20.04	20.015	0.04
ABC_{0-24h}	$h * \mu g/mL$	342.37	337.00	339.69	3.80
$ABC_{0-\infty}$	$h * \mu g/mL$	858.55	814.15	836.35	31.39
MRT_{0-24h}	h	11.05	10.98	11.02	0.05
$MRT_{0-\infty}$	h	46.70	44.41	45.55	1.62
AUC_{0-24h}/CIM	h	171.19	168.50	169.84	1.90
C_{max}/CIM		10.00	10.02	10.01	0.02

5.8.3. PENICILINA G

Nuestro tercer antibacteriano probado, fue penicilina G, la que presentó una escasa acumulación a nivel intracelular, menor a 1 con respecto al medio extracelular. Hacia las 4 h de incubación la relación IC/EC se incrementó ligeramente, pero a partir de ese momento comenzó a predominar el eflujo. Los niveles intracelulares sin embargo se mantuvieron varias veces por arriba de la CIM calculada para *S. aureus* a este nivel (0.066 $\mu g/mL$)(Tabla 92).

Tabla 92. Concentraciones individuales y promedio \pm DE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a nivel intracelular y extracelular en función del tiempo de incubación, relación IC/EC.

Tpo (h)	Concentración equivalente PenG-IC				Concentración AZT-EC				RIC/EC
	IC-1	IC-2	Prom	DE	EC-1	EC-2	Prom	DE	
2	0.390	0.450	0.420	0.042	1.070	0.996	1.033	0.052	0.41
4	0.420	0.600	0.510	0.127	1.090	0.920	1.005	0.120	0.51
6	0.420	0.480	0.450	0.042	1.120	1.080	1.100	0.028	0.41
8	0.300	0.320	0.310	0.014	1.050	1.020	1.035	0.021	0.30
12	0.250	0.240	0.245	0.007	0.850	0.730	0.790	0.085	0.31
24	0.150	0.150	0.150	0.000	0.670	0.750	0.710	0.057	0.21

Evaluamos la actividad de penicilina G a nivel IC frente a *Staphylococcus aureus* (Figura 145). A pesar de ser un antimicrobiano acción bactericida tiempo dependiente, no se logró este efecto en el ambiente intracelular, ya que el Log ufc/mL cayó solamente 0.87 veces, evidenciándose recrecimiento del inóculo bacteriano.

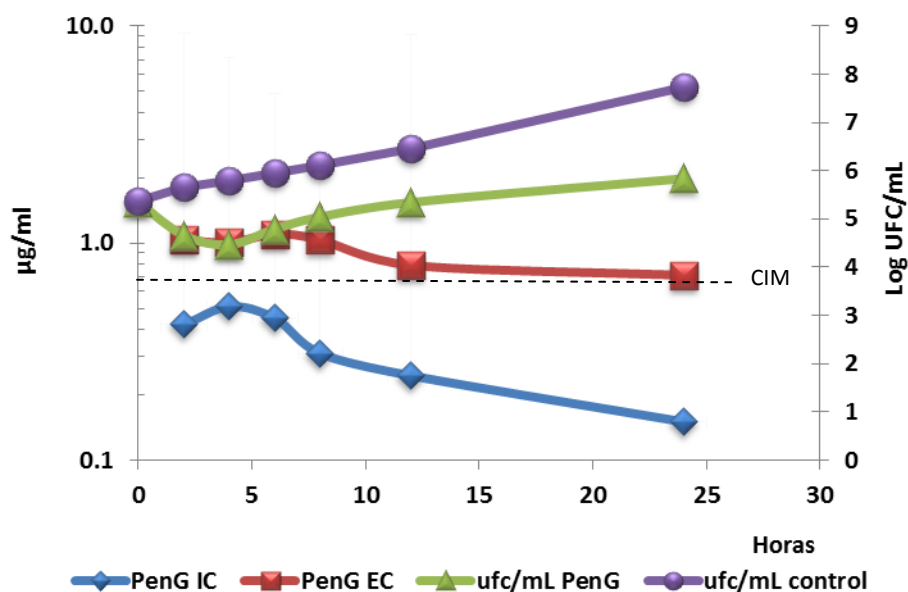


Figura 145. Representación gráfica de los niveles de PenG alcanzados IC en relación a los niveles EC y su acción sobre *S.aureus* (Log ufc/mL) en función del tiempo en comparación a la curva control (sin PenG).

La evolución del Log_{10} ufc/mL frente a penicilina G a nivel intracelular en función del tiempo se presenta en la Tabla 93, donde podemos observar que el índice de actividad

antibacteriana (*E*) máximo alcanzado fue -0.87, nunca se alcanzó una reducción de $\geq -3 \text{ Log}_{10}$ de las ufc/mL para considerar un efecto antibacteriano bactericida.

Realizamos un análisis no compartimental de los datos de concentración equivalente a nivel intracelular (Tabla 94). Calculamos el predictor de eficacia para beta lactámicos, $T \geq \text{CIM}$. En este ensayo in vitro durante las 24 h de incubación, las concentraciones intracelulares se mantuvieron por arriba de la CIM calculada para el pH 5 (fagolisosoma), pero evidentemente no es suficiente para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular. Este resultado nos deja claro que la acumulación a nivel intracelular no es predictivo de actividad a nivel intracelular.

Tabla 93. Log ufc/mL en presencia de Pen G -IC (N= 2) versus control sin Pen G (n = 2), relación IC/EC e índice de actividad antibacteriana para los distintos R IC/EC a los tiempos de incubación del ensayo.

Tpo (h)	Log. ufc/mL _{ATB}	Log. ufc/mL _{control}	R IC/EC	$\Delta \log_{Tn-T0}$ $\Delta \log_{Tn-T0}(\text{Ctr})$		
0	5.34	5.37				
2	4.66	5.67	0.41	$\Delta \log_{2h-0h}$	-0.68	0.30
4	4.47	5.80	0.51	$\Delta \log_{4h-0h}$	-0.87	0.44
6	4.79	5.95	0.41	$\Delta \log_{6h-0h}$	-0.55	0.58
8	5.04	6.10	0.30	$\Delta \log_{8h-0h}$	-0.30	0.73
12	5.34	6.45	0.31	$\Delta \log_{12h-0h}$	0.00	1.08
24	5.84	7.74	0.21	$\Delta \log_{24h-0h}$	0.50	2.37

Tabla 94. Análisis no compartimental de las concentraciones IC de penicilina G en función del tiempo. Predictor de eficacia PK/PD

Parámetro	Unidad	Placa 1	Placa 2	Promedio	DE
λ	h^{-1}	0.0431	0.0455	0.0443	0.0016
$T_{1/2\lambda}$	h	16.06	15.25	15.65	0.58
T_{\max}	h	4.00	4.00	4.00	0.00
C_{\max}	$\mu\text{g/mL}$	0.42	0.60	0.51	0.13
ABC_{0-24h}	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	6.26	6.84	6.55	0.41
$\text{ABC}_{0-\infty}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	9.74	10.14	9.94	0.28
MRT_{0-24h}	h	10.03	9.46	9.74	0.40
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	23.29	21.35	22.32	1.38
$T \geq \text{CIM}$	%	33.00	33.00	33.00	0.00

5.9. DISEÑO DE UN RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN RACIONAL

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos previos no es posible diseñar un régimen de dosificación para el tratamiento de la mastitis subclínica por *Staphylococcus aureus* empleando los antimicrobianos seleccionados por pruebas de susceptibilidad in vitro.

Esto significa que ninguno de los antimicrobianos ensayados es capaz de lograr a nivel celular la concentración y/o el tiempo de contacto adecuado para atacar al *Staphylococcus aureus* según pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas y en caso de alcanzar los predictores de eficacia necesarios, su actividad antibacteriana se ve seriamente afectada.

6. DISCUSION

6.1. ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD POR ANTIBIOGRAMA

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos *in vitro* se puede determinar por varios métodos. Nosotros realizamos la técnica estándar de difusión en agar para bacterias de crecimiento aeróbico, debido a que el objetivo era contar con un procedimiento adecuado para seleccionar cepas sensibles a tres antimicrobianos elegidos como modelo de estudio por sus perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos.

El antibiograma es una técnica *In vitro* relativamente sencilla, donde un microorganismo es expuesto a un antimicrobiano bajo determinadas condiciones estandarizadas. El objetivo de esta técnica es categorizar a los microorganismos en sensibles o resistentes a un determinado antimicrobiano.

Los resultados obtenidos pueden variar de manera considerable dependiendo de las condiciones experimentales, las que generalmente se encuentran muy alejadas de las existentes *in vivo*, en el propio foco infeccioso (Soriano, 2002; Mestorino y Errecalde, 2012). En una prueba de laboratorio, el microorganismo es colocado en condiciones de crecimiento óptimo, con el mejor pH, con la temperatura ideal, los nutrientes necesarios, en un medio apacible para él, como es la placa de Petri (esto a los efectos de obtener un rápido crecimiento, aunque lo aleje de las condiciones a las que se enfrentará en el organismo). Comparemos lo que ocurre, por ejemplo, a un estafilococo (motivo de este estudio) en condiciones de laboratorio, con lo que ocurre con el mismo microorganismo dentro de un fagolisosoma en un macrófago, donde, luego de ser fagocitado, se encuentra en condiciones de pH y ataque enzimático que no tienen nada que ver con las anteriores, al punto que su metabolismo como mecanismo de defensa, baja hasta alcanzar un estado de “sueño bacteriano” y su reproducción se encuentra inhibida.

Consideremos que una bacteria que está en pleno proceso reproductivo es muy susceptible a agentes bactericidas como los beta-lactámicos y que una bacteria “dormida”, definitivamente no lo es a las concentraciones y tiempos de contacto habituales logrados en

tratamientos convencionales. Esto pone a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en un lugar difícil.

Es evidente, entonces, que una prueba de susceptibilidad por sí misma no es suficiente, y que estas pruebas deben combinarse con parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos para, de acuerdo con el estado actual del conocimiento, obtener los mejores resultados posibles.

No obstante, el antibiograma ofrece, por lo general, una información útil, acumulable y fácilmente comparable con datos históricos o con los obtenidos en otros laboratorios (Soriano García, 2010).

La interpretación de los resultados del antibiograma es un poco más compleja que señalar solamente la sensibilidad de un microorganismo, en parte debido entre otros factores al incremento de la resistencia bacteriana (Coyle, 2005). De manera tal que se debe realizar una lectura interpretada de los resultados del antibiograma, la cual está fundamentada en el conocimiento molecular de los mecanismos de resistencia y en la interpretación terapéutica de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* (Coyle, 2005).

Los criterios de interpretación utilizados por mucho tiempo han sido establecidos en base a concentraciones de antimicrobianos determinadas en plasma de seres humanos, por lo que la veracidad de los resultados al aplicar dichos criterios para la terapia antimicrobiana de la mastitis bovina, resulta inescrutablemente cuestionable (MacGowan *et al.*, 2001; Constable y Morin, 2003; Lucas, 2009). En el interior de la glándula mamaria existen distintas variables que deberían tenerse en cuenta, tales como pH, composición electrolítica, concentración de grasas, de proteínas y de leucocitos que difieren entre la leche bovina y el plasma humano (Constable y Morin, 2003). Si bien contamos con documentos armonizados y validados por la CLSI que dirigen los estándares de los ejercicios de susceptibilidad para microorganismos aislados de animales, los mismos no contemplan los nichos específicos de los diferentes patógenos, por tanto los valores arrojados por dichas pruebas deben ser interpretados a la luz del caso clínico y el abordaje terapéutico, teniendo en cuenta las características físico químicas y los predictores PK/PD de eficacia establecidos para cada antibacteriano.

El avance de los criterios de interpretación de resultados derivados de pruebas de susceptibilidad con agentes antimicrobianos de uso en medicina veterinaria ha permitido un manejo más racional de los mismos (EMEA 2000, Constable y Morin, 2003; Lucas, 2009). El efecto directo de la información que brindan las pruebas de susceptibilidad correctamente interpretadas es el punto de partida para la selección criteriosa de un protocolo terapéutico antimastítico.

En infecciones producidas por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, y en el caso de mastitis recientes causadas por *S. aureus*, los antibiogramas han demostrado ser buenos pronosticadores de eficacia antimicrobiana, pero aún así, no podemos considerarlos garantía de eficacia cuando se trata de infecciones crónicas producidas por *S. aureus* (Owens, 1997; Constable y Morin, 2003; Lucas, 2009).

Actualmente existen métodos estandarizados para la realización de los antibiogramas disco-placa en medicina veterinaria (CLSI, 2008). Sin embargo, en diferentes ensayos las técnicas microbiológicas aplicadas no siempre son las mismas (Erskine *et al.*, 2002; Lucas, 2009). Por lo cual la comparación de los patrones de susceptibilidad debe realizarse con cautela, teniendo en cuenta que los métodos aplicados para la determinación podrían ser diferentes. Existen otros varios factores de variabilidad, como la metodología de selección de las vacas, las técnicas utilizadas para la recolección de las muestras, el procedimiento utilizado para el aislamiento e identificación de los microorganismos y las diferencias entre las poblaciones bacterianas de diferentes zonas geográficas y momentos históricos (Erskine *et al.*, 2002). Además, se debe tener en cuenta la importancia del tamaño de la muestra, es decir la cantidad de vacas y de establecimientos incluidos en la toma de muestras. Por consiguiente, es comprensible que la comparación de los perfiles de susceptibilidad de aislamientos realizados a partir de muestras de secreción láctea en nuestro país arroje resultados dispares (Calvinho *et al.*, 1990; 2002; Gentilini *et al.*, 2000; Lucas, 2009).

Cepas de *S. aureus*, aisladas de vacas con mastitis en varias regiones de Argentina, mostraron resistencia frente a eritromicina, estreptomina, gentamicina, ampicilina-sulbactam, rifampicina y oxacilina; destacándose casos de multirresistencia (Pellegrino *et al.*, 2011; Russi, 2008). En Chile se reportó resistencia a penicilina G y a ampicilina mediante la

producción de diferentes tipos de beta-lactamasas; sin embargo, hubo sensibilidad frente a cloxacilina, enrofloxacina y neomicina (Betancourt *et al.*, 2003). Otro estudio previo, también realizado en Chile, en las regiones Chilenas V y X, informó sobre la existencia de resistencia frente a amoxicilina, ampicilina, estreptomina y lincomicina en *S. aureus*, así como, a ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina, gentamicina, oxitetraciclina, sulfadiazina-trimetropina, en otras bacterias (San Martín *et al.*, 2002). Por su parte, en Paraguay los reportes indican que 77% de los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) son resistentes a la neomicina, 47% a la ampicilina, 41% a la nitrofurantoina y un menor porcentaje a sulfa-trimetropina, tetraciclina, kanamicina, estreptomina y gentamicina. En Brasil se halló una alta resistencia en SCN a penicilina (93.5 %) y a sulfonamidas (88.9 %) (Machado *et al.*, 2008). En los últimos años se ha incrementado el número de SCN productores de β -lactamasas y resistentes a meticilina, portadores del gen MecA resistente a todos los grupos de antibióticos β -lactámicos (Bochniarz *et al.*, 2013). Lo cual complica bastante la situación, ya que los SCN actúan como reservorios de genes de resistencia para *S. aureus* (Tulinski *et al.*, 2012).

De lo expresado de manera muy resumida, se pone en evidencia el claro avance de *Staphylococcus aureus* resistentes y multirresistentes, como consecuencia, entre otras causas, del uso indiscriminado de antimicrobianos en explotaciones lácteas en el intento de combatir a este microorganismo de tan difícil resolución. Por esta razón nos propusimos a través de una selección de cepas de *S. aureus* sensibles evaluar algunas de las razones del porqué de la falla terapéutica en el caso de utilizar el antimicrobiano elegido por pruebas de laboratorio. Y, fundamentalmente, a partir de la identificación de la problemática sentar las bases para futuros desarrollos terapéuticos más racionales para el control de la mastitis bovina subclínica por *Staphylococcus aureus*.

En nuestro estudio un 33.82% de los aislamientos evaluados presentaron resistencia a penicilina G, ergo, frente a las penicilinas β -lactamasas sensibles (ampicilina y amoxicilina). Este porcentaje fue algo menor, comparado con estudios previos realizados en otras zonas del país, donde los hallazgos de resistencia variaron entre 40% y 77.5% (Calvinho *et al.*, 1990, Gentillini. *et al.*, 2000, Calvinho *et al.*, 2002). En Uruguay se halló un 47.6% de *S. aureus* resistentes, aislados de muestras lácteas obtenidas a partir de casos clínicos y subclínicos de mastitis bovinas (Giannechini *et al.*, 2002). En un estudio más reciente, también realizado

por Giannechini *et al.* (2014), informaron que un 39.1% de aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos subclínicos y un 36% de casos clínicos fueron resistentes a la penicilina, y en *Staphylococcus coagulasa* negativos el 29.4% y 33.3%, respectivamente. Es decir, hubo un incremento notable en la resistencia a penicilina. Mientras que en Chile el nivel de resistencia de *S. aureus* aislados de mastitis clínicas fue algo menor, 32.43% (San Martín *et al.*, 1992), en Brasil se reportó 96.99% de *Staphylococcus spp* resistentes a penicilina, aunque los aislamientos evaluados no fueron exclusivamente *S. aureus*, el nivel de resistencia fue sumamente elevado (Costa *et al.*, 2001). Otros estudios realizados en ese mismo país arrojaron porcentajes dispares de *S. aureus* resistentes a penicilina, desde un 2.6% (Menezes Ferreira *et al.*, 2006) hasta un 76.29% (Andrade *et al.*, 2000).

Con la finalidad de evaluar la resistencia de los aislamientos de *S. aureus* frente a la asociación penicilina sensible a las β - lactamasas (amoxicilina) – inhibidor de enzimas β - lactamasas (ácido clavulánico), utilizamos discos de amoxicilina ácido clavulánico. Si bien las formulaciones utilizadas en medicina veterinaria suelen estar elaboradas en una proporción de amoxicilina-ácido clavulánico en relación 4:1, los discos de antibiograma que se comercializan contienen una combinación antimicrobiana en relación 2:1. Por lo tanto, para estudiar la susceptibilidad *in vitro* de amoxicilina-ácido clavulánico se utilizaron discos que contenían 20 μ g de amoxicilina y 10 μ g de ácido clavulánico.

El porcentaje de aislamientos sensibles fue de 91.16%, hallándose solo un 8.84% de cepas resistentes entre todos los aislamientos incluidos en el ensayo. Resultados similares o ligeramente inferiores a los encontrados por nosotros fueron reportados en estudios previos realizados en otros países, tales como 3% en Inglaterra (Teagle y David, 1999) y 5.7% en la República Eslovaca (Vasil *et al.*, 2005).

Como representante de la familia de las fluoroquinolonas, utilizamos discos de ciprofloxacina. El 2.4% de los aislamientos fueron resistentes, mientras que el 7.3% presentó susceptibilidad intermedia y el 90.3% fueron sensibles. Este antimicrobiano fue seleccionado como patrón de comparación con otras fluoroquinolonas tales como enrofloxacin, norfloxacin y danofloxacin, siguiendo la recomendación del CLSI 2010.

Nuestros resultados son coincidentes con los reportados por Giannechini *et al.* (2014) en Uruguay (Sensibles 98.4%, intermedios 1.6%, resistentes 0.0%). En Brasil los estudios de susceptibilidad de *S. aureus* aislados de muestras de leche bovina arrojaron valores similares frente a fluoroquinolonas con un 89.4% de aislamientos sensibles a enrofloxacin, un 3.4% con sensibilidad intermedia y un 7.2% resistentes (Andrade *et al.*, 2000). En los Estados Unidos, sin embargo obtuvieron un menor porcentaje de sensibilidad, 80%, (Owens *et al.*, 1997). Si bien, la susceptibilidad de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos a partir de muestras de leche de vacas mastíticas frente a fluoroquinolonas fue relativamente alta, es importante tener en cuenta el hallazgo de cepas resistentes. Ya que, el aumento de la resistencia de cepas aisladas a partir de muestras de origen animal y sus derivados destinados al consumo humano, es un factor controversial en lo que hace al uso de las fluoroquinolonas en medicina veterinaria (Sáraközy, 2001).

Agentes antimicrobianos tales como los macrólidos y lincosamidas son utilizados comúnmente como tratamiento para la infección por estafilococos, dentro de estos grupos eritromicina, tilmicosina, espiramicina, y clindamicina se utilizan con frecuencia para el tratamiento de la mastitis bovina (Dingwell *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Como representante de la familia de los macrólidos, utilizamos azitromicina y eritromicina. En el caso de azitromicina, se evidenció un alto nivel de susceptibilidad (91.16%) con un bajo nivel de resistencia (8.84%) entre los aislamientos evaluados. Para el caso de eritromicina, los resultados fueron muy disímiles a su homóloga, encontrando un menor porcentaje de susceptibilidad (73.96%), mientras que un 8.4% de las cepas mostraron susceptibilidad intermedia y un 17.64% fueron resistentes. Normalmente, en los estudios de susceptibilidad se utiliza como representante de los macrólidos a la eritromicina, sin embargo, cuando se desea evaluar la susceptibilidad frente a espiramicina, no se la recomienda dado que se ha comprobado que las proteínas que participan en la interacción macrólido-ribosoma son diferentes. El sitio de fijación de eritromicina es la proteína L22 y el de espiramicina es la L27 (Giner Almaraz *et al.*, 1995). Además, se debe tener en cuenta que la poca sensibilidad *in vitro* frente a espiramicina no tiene correlación con la eficacia *in vivo* pues es posible obtener buena respuesta terapéutica frente a cepas teóricamente resistentes. Esto es sumamente importante ya que el antibiograma no reflejaría la probabilidad exacta de su utilización con

éxito (Bergoglio, 1993). Mundialmente, se han reportado niveles variables de resistencia frente a eritromicina, en nuestro país, en un estudio realizado sobre un total de 206 aislamientos de *S. aureus* de muestras lácteas de vacas con mastitis clínica y subclínica, se halló un 11.6% de aislamientos resistentes a la eritromicina (utilizando discos de 15 µg) (Gentillini *et al.*, 2000). En otros países los niveles de resistencia frente a eritromicina van desde el 13% en Brasil (Menezes Ferreira *et al.*, 2006), 3% en Uruguay (Gianneechini *et al.*, 2000) y 1.9% en la República Eslovaca (Vasil' *et al.*, 2002). En Uruguay se mantienen los niveles los niveles de sensibilidad después de 14 años, ya que Gianneechini *et al.* (2014) volvieron a encontrar un alto porcentaje de aislamientos sensibles a eritromicina (89.5%) con un 7.9% de intermedios y un bajo nivel de resistencia (2.6%). En otros países, como por ej China, no ocurrió lo mismo, pues se reportaron altos niveles de resistencia a diferentes miembros de los macrólidos y lincosamidas, como eritromicina, azitromicina, lincomicina, espiramicina, tilosina, clindamicina y tilmicosina (93.1%; 93.1%; 45.8%; 41.7%; 40.3%; 36.1% y 27.8%, respectivamente) (Wang *et al.*, 2008).

Los resultados de la prueba de susceptibilidad a tetraciclina, presentaron niveles de resistencia bastante bajos, siendo de 3.4%, con un 96.6% de los aislamientos susceptibles. Existe una gran variedad de trabajos que incluyen el estudio de susceptibilidad de *S. aureus* frente a tetraciclina con resultados variables. En Estados Unidos se reportó un 100% de aislamientos sensibles, mientras que en la República Eslovaca se halló un 4.3% de aislamientos resistentes (Vasil' *et al.*, 2002), siendo similar al hallado en Inglaterra (5%). En Uruguay y en Polonia los porcentajes de *S. aureus* resistentes aislados de mastitis bovina fueron algo superiores, alcanzando el 13.4 % (Gianneechini *et al.*, 2002) y el 26% (Malinowski *et al.*, 2002) respectivamente. En Uruguay se vislumbra un mejor manejo de los antimicrobianos utilizados en bovinos de leche, pues los niveles de resistencia a tetraciclinas han bajado a 3.2% en los últimos años (Gianneechini *et al.*, 2014).

En el caso de la gentamicina, como representante de la familia de los aminoglucósidos, obtuvimos resultados de alta sensibilidad al antimicrobiano (99.32%).

En general, los antimicrobianos evaluados mostraron buena actividad *in vitro* frente a los *S. aureus* aislados de mastitis subclínica bovina. En este estudio se incluyeron aislamientos obtenidos de dos establecimientos ubicados en la Provincia de Buenos Aires.

Uno de la cuenca lechera Mar y Sierras (A) y el otro de la cuenca Abasto de la Provincia de Buenos Aires (B).

Los hallazgos reflejan una situación específica, limitada a un sitio geográfico particular y a un momento puntual. El establecimiento A trabajaba desde tiempo atrás con protocolos de terapia antibacteriana de mastitis clínica en lactancia y terapia de secado fijos. El antimicrobiano utilizado en todos los casos era cloxacilina, en una formulación de administración IMM en lactancia o en secado. No se realizaban cultivos bacteriológicos de rutina ni antibiogramas para evaluar la susceptibilidad de las cepas de campo.

El establecimiento B utilizaba al momento del muestreo una terapia antimicrobiana similar al establecimiento A, aunque realizaban cambios periódicos en los productos antimastíticos. Sin embargo, tampoco se realizaban cultivos bacteriológicos ni antibiogramas para la selección de los antibióticos a utilizar.

El estudio de susceptibilidad realizado en el marco de esta Tesis Doctoral no pretendió analizar epidemiológicamente la situación actual en Argentina, sólo fue un instrumento utilizado para seleccionar cepas sensibles a tres antimicrobianos elegidos como modelo de estudio por sus perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos.

De manera que a partir de este ensayo seleccionamos como referentes de cada uno de los tres grupos de antimicrobianos según sus perfiles PK/PD a azitromicina, danofloxacina y penicilinaG.

6.2. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

6.2.1 Azitromicina

Azitromicina es un antimicrobiano macrólido de 15 miembros perteneciente a una subfamilia de compuestos semisintéticos denominados azálidos. Los azálidos fueron obtenidos a partir de la eritromicina por adición de un átomo de nitrógeno endocíclico en posición 9 (Mulazimoglu *et al.*, 2005). In vitro es levemente menos activa que eritromicina contra microorganismos Grampositivos, aunque esto es de dudosa significancia clínica ya que azitromicina alcanza concentraciones tisulares e intracelulares mayores. Es activa contra aislamientos de *S. aureus*, incluso productores de β -lactamasas, aunque menos que claritromicina y roxitromicina, también es activa frente a *Staphylococcus epidermidis* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativos. Sin embargo contra especies de *Staphylococcus* resistentes a macrólidos, azitromicina también es inactiva (Wang *et al.*, 2008; Lucas, 2009; Turic, 2010). Los azálidos en general son más activos contra patógenos Gramnegativos y también son resistentes a la acción de sus enzimas β - lactamasas (Van Bambeke, 2014).

Los macrólidos son agentes bacteriostáticos, aunque en determinados casos pueden tener acción bactericida. Se unen en forma reversible al sitio P (peptídico), que se encuentra cerca del dominio V del componente 23S de la subunidad 50S (Lucas, 2009; Turic, 2010; Van Bambeke, 2014) y del centro que contiene a la enzima peptidil-transferasa en el ribosoma bacteriano. Actúan inhibiendo la translocación durante la síntesis proteica bacteriana (Lucas, 2009; Turic, 2010; Van Bambeke, 2014).

En cuanto a su comportamiento farmacocinético, se caracteriza por una rápida y extensiva captación desde la circulación hacia compartimientos intracelulares, seguida de una lenta fase de eliminación (Lucas, 2009; Turic, 2010), se distribuye ampliamente por todo el organismo, alcanzando altas concentraciones en pulmón, tonsilas, próstata, hígado, linfonódulos, fluidos tisulares y en diferentes tipos de células (Turic, 2010). Los reportes sobre su volumen de distribución arrojan valores del orden de los 23 a 30 L/kg, aunque las concentraciones en grasa y músculo son relativamente bajas (Lucas, 2009; Turic, 2010; Van

Bambeke, 2014). La fijación a proteínas plasmáticas es del 50% cuando la concentración plasmática es 0.002 – 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se reduce al 7 % cuando la concentración es 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los porcentajes de fijación a proteínas plasmáticas de otros macrólidos, como eritromicina o roxitromicina, son más altos, por lo que comparativamente hay mayor cantidad de azitromicina libre y disponible para su distribución hacia los sitios de infección (Lucas, 2009; Turic, 2010; Van Bambeke, 2014).

Desde el punto de vista farmacodinámico, los macrólidos se caracterizan por no pertenecer a una sola categoría (Andes y Craig, 1998). Se considera que su actividad bacteriológica es tiempo-dependiente y que el éxito terapéutico está estrechamente ligado al parámetro $T > \text{CIM}$ (Andes y Craig, 1998; Jacobs, 2004; Van Bambeke, 2014). Sin embargo, azitromicina tiene un perfil PK/PD particular y a diferencia de los macrólidos tradicionales, posee un marcado PAE in vivo (Andes y Craig, 1998). Estudios experimentales han demostrado que para alcanzar la eficacia clínica de azitromicina, se debe tener en cuenta tanto el $T > \text{CIM}$ como el $\text{ABC}_{0-24\text{h}}/\text{CIM}$ (Andes y Craig, 1998; Novelli *et al.*, 2002; Ambrose *et al.*, 2004; Van Bambeke, 2014). Incluso, algunos autores han postulado que, azitromicina, tiene una actividad bacteriológica concentración-dependiente y que el parámetro $C_{\text{máx}}/\text{CIM}$ es el que mejor predice su comportamiento (Mazzei y Novelli, 1999).

Las propiedades mencionadas permiten suponer que azitromicina puede ser una alternativa viable e interesante para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias Grampositivas aeróbicas con capacidad de sobrevivir en el interior de los fagolisosomas.

Cuando realizamos la determinación de la concentración inhibitoria mínima, azitromicina se comportó de manera diferente frente a *S. aureus* a medida que acidificamos el pH del medio de cultivo; se observó una sustancial pérdida de potencia, lo cual se hizo evidente por el aumento de hasta 8 veces su CIM a pH 6.5 y de más de 64 veces su CIM a pH 5.0 en comparación a cuando las mismas cepas fueron analizadas al pH fisiológico de 7.4; lo cual concuerda con lo reportado por (Fuchs *et al.*, 1997).

Modificamos el pH del medio de cultivo con el fin de emular las condiciones subcelulares a las cuales se encuentra asociado el *S. aureus* de vida intracelular, asumiendo que el cambio de pH, pudiera ser un factor limitante en la acción del antimicrobiano.

La comparación estadística aplicada a estos resultados determinó que existen diferencias significativas entre las CIMs obtenidas a pH 5 vs pH 7.4 y pH 5 vs pH 6.5, de la misma forma que las hubo entre el pH 6.5 y 7.4 con una ($P = < 0.001$), lo cual prueba que las variaciones en el efecto antibacteriano de azitromicina, reflejado en los cambios del valor de la CIM en efecto son producto del cambio de pH del medio y no producto del azar.

Prácticamente no existen estudios de susceptibilidad de *S. aureus* aislados de mastitis bovina a azitromicina, ya que no es un antimicrobiano aprobado para su indicación en bovinos de leche. Sin embargo Wang *et al.* (2008) reportaron altos niveles de resistencia a macrólidos, incluida la azitromicina en aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas portadoras de mastitis subclínica en China, con una CIM₅₀ y CIM₉₀ ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, Ferrara *et al.*, en 1996 en un estudio encaminado a comparar la actividad antibacteriana de azitromicina, claritromicina y roxitromicina frente a varios patógenos de las vías respiratorias, donde se incluía *S. aureus*, reportaron que azitromicina fue mucho menos activa frente a *S. aureus* que frente a patógenos como *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, presentándose una relación entre la CIM y la CMB mayor a 16. La CIM determinada de azitromicina fue 3.1 $\mu\text{g/mL}$, siendo de 4 a 8 veces mayor que la CIM de claritromicina determinada frente al mismo patógeno.

En 2003, Seral *et al.*, en un análisis de la actividad antibacteriana intracelular de 5 tipos de antibacterianos, incluida azitromicina, frente a *S. aureus*, encontraron valores de CIM de azitromicina en caldo a pH 7.3 de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y una CMB de 8 $\mu\text{g/mL}$, lo cual concuerda con lo reportado por Ferrata *et al.*, 1996 y por nosotros. De la misma forma la CIM de azitromicina reportada por Seral *et al.* (2003), a pH 6 fue de 32 $\mu\text{g/mL}$ y a pH 5 fue 512 $\mu\text{g/mL}$, coincidiendo con lo hallado en nuestro estudio. Claramente los macrólidos y en particular azitromicina, pierden potencia antibacteriana en medios ácidos.

En otras especies también encontramos reportes de la susceptibilidad de *S. aureus* a azitromicina, así, Poiata y Tuchilis en un estudio publicado en Italia en 2010, reportaron una

CIM₉₀ para azitromicina de 8 µg/mL frente a cepas de *S. aureus* aisladas del tracto respiratorio superior de pacientes humanos sanos. En otro estudio de similares características, publicado en 2009 por Dubois y Fernandez en Canadá, reportaron una CIM₉₀ ≥ a 32 para azitromicina frente también a cepas de *S. aureus* aisladas del tracto respiratorio superior en la misma especie.

En potros se ha determinado la CIM₉₀ de azitromicina, frente a *Rhodococcus equi*, patógeno intracelular facultativo Gram-positivo, con características similares a *S. aureus*, encontrando una CIM₉₀ < 1.5 µg/ml, hallazgo similar a lo reportado por nosotros en cepas de *S. aureus* (Ribeiro *et al.*, 2006).

A modo informativo es interesante conocer cuales son las CIMs de otros macrólidos utilizados habitualmente frente a *S. aureus* aislados de mastitis bovinas a pH 7.4.

En un trabajo realizado en 11 países (Alemania, Dinamarca, Estados Unidos, Finlandia, Inglaterra, Irlanda, Islandia, Noruega, Suecia, Suiza, y Zimbabwe) sobre susceptibilidad de *S. aureus* a eritromicina, se demostró que en la mayoría de ellos, la CIM₉₀ de eritromicina frente a *S. aureus* aislados de mastitis bovinas fue 0.5 µg/mL, excepto en Irlanda, Suiza y Estados Unidos, donde fue 1 µg/mL, al igual que en nuestro ensayo frente a azitromicina (De Oliveira *et al.*, 2000). Cabe destacar que en ese mismo estudio y en la mayoría de los países, la CIM₅₀ también fue 0.5 µg/mL, excepto en Dinamarca que fue 0.25 µg/mL.

En un estudio llevado a cabo en Argentina, la CIM₉₀ reportada para eritromicina alcanzó los 0.75 µg/mL (Gentillini *et al.*, 2000). De manera similar, en Japón se reportó que la CIM₅₀ determinada para eritromicina fue 0.39 µg/mL y la CIM₉₀ 0.78 µg/mL (Yoshimura *et al.*, 2002). Estos datos nos permiten apreciar el rango de concentraciones en el cual pueden hallarse las CIMs de otros macrólidos. Se observó que, en general, eritromicina y azitromicina tienen valores de CIM similares. Cabe resaltar que los resultados arrojados por nuestro trabajo, son coincidentes con los valores de referencia aportados por la CLSI (2010), los cuales fueron de 0.5 a 2µg/mL para azitromicina frente a *S. aureus*.

6.2.2. Danofloxacin

Danofloxacin es un antibacteriano perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, el cual posee una rápida actividad bactericida, contra una amplia gama de patógenos responsables de enfermedades de importancia económica en la cría comercial de ganado (Sarazola *et al.*, 2002; Mestorino *et al.*, 2009, Mestorino y Errecalde, 2012). Desde su introducción a finales de 1980, las fluoroquinolonas han demostrado presentar actividad antibacteriana dependiente de la concentración, por lo que el efecto óptimo se consigue mediante la administración de dosis altas durante un período corto (Sarazola *et al.*, 2002; Mestorino *et al.*, 2009, Mestorino y Errecalde, 2012).

El desarrollo que tuvieron las quinolonas en la década del ochenta con la introducción de un átomo de flúor en el núcleo básico de la molécula, en posición C6 y un sustituyente piperazínico o pirrolidínico en posición C7, dieron paso a las fluoroquinolonas, como la norfloxacin (la primera fluoroquinolona aprobada para uso clínico) y la danofloxacin, las cuales mostraron un aumento en su actividad antibacteriana contra bacterias Gramnegativas y Grampositivas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y Estafilococos (Martínez *et al.*, 2006), al igual que contra patógenos de vida intracelular (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998) y frente a algunos micoplasmas (Vancutsem *et al.*, 1990; Brown, 1996).

De la misma forma en que fue mejorada su acción antibacteriana, las características farmacocinéticas de las nuevas fluoroquinolonas también mejoraron, obteniéndose un aumento en la tasa de absorción oral y distribución tisular con estas nuevas moléculas (Ball, 2000). La primera fluoroquinolona que fue aprobada para uso en Medicina Veterinaria fue enrofloxacin, en la década de 1980 (Martínez *et al.*, 2006).

Las quinolonas actúan en el interior de la bacteria, penetrando a través del canal acuoso de las porinas. Son los únicos agentes antibacterianos que ejercen su actividad bactericida uniéndose a topoisomerasas bacterianas e inhibiéndolas; aunque éste no sería el único mecanismo de acción (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). Las topoisomerasas son enzimas que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN bacteriano. El

superenrollamiento permite a la larga molécula de ADN empaquetarse dentro de la célula bacteriana. Esta estructura debe ser desenrollada para permitir diferentes funciones como replicación, transcripción y reparación del ADN. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción. Una inhibición prolongada conduciría así a la muerte de la célula (Hooper, 1998; Otero et al., 2001 a y b).

Existen 4 tipos de topoisomerasas. Las quinolonas actuarían a nivel de ADN-girasa (también llamada topoisomerasa tipo II) y de la topoisomerasa tipo IV. No actúan a nivel de las topoisomerasas I y III, la compleja interacción con las topoisomerasas, es la base del diferente espectro antibacteriano de las quinolonas y también de la selección de cepas resistentes. La actividad de las quinolonas contra las bacterias Grampositivas se debe a su acción "blanco" en las topoisomerasas IV, en cambio la actividad contra las bacterias Gramnegativas es por su acción "blanco" en las topoisomerasa II o ADN-girasa (Otero et al., 2001 a y b; Guthrie y col, 2004).

En general, las fluoroquinolonas se caracterizan por presentar altos volúmenes de distribución y excelente biodisponibilidad (Kaartinen *et al.*, 1995, McKellar *et al.*, 1999; Otero et al., 2001 a y b; Mestorino *et al.*, 2009, Mestorino y Errecalde, 2012). En el ganado vacuno, danoflaxacina tiene un volumen relativamente grande de distribución en estado estacionario (2.5 litros / kg) y es 100 % biodisponible cuando se administra por vía intramuscular (Sarasola *et al.*, 2002).

En un estudio realizado sobre 21 vacas en producción lechera, publicado en 2009, Mestorino *et al.*, reportaron que tras la administración por la vía subcutánea de una sola dosis de mesilato de danofloxacina al 18% a razón de 6 mg/kg, la absorción de esta fue bastante rápida, encontrándose en plasma una concentración de $0.53 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ (C_{max}) a las 2.17 ± 0.98 (T_{max}) horas de su administración; de la misma forma se evidenció que este fármaco presenta un perfil lento de eliminación, con una semivida de eliminación promedio ($T_{1/2\beta}$) de 12.53 ± 1.47 horas.

Las concentraciones en leche, reportadas en el mismo estudio, sugieren una rápida penetración desde el plasma a la leche, alcanzando concentraciones superiores con respecto

a las medidas en plasma, con valores de C_{max} de $1.37 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ a las 8.67 ± 2.07 (T_{max}) horas tras la administración del fármaco (R C_{maxL}/C_{maxPI} de 2.68), y una semivida de penetración del plasma a la leche de 2.27 ± 0.48 horas.

Lo interesante, fue la elevada biodisponibilidad láctea alcanzada ($F_L = 1.62$), ya que el ABC en leche fue de $15.46 \pm 5.42 \mu\text{g.mL/h}$, mientras que en plasma fue de $9.69 \pm 1.41 \mu\text{g.mL/h}$. Si consideramos la CIM obtenida para danofloxacin en nuestro estudio ($0.5 - 1 \mu\text{g/mL}$), los resultados anteriores arrojarían una R C_{max}/CIM de 2.74-1.37 y una R ABC/CIM de $30.92 - 15.46$ h. Es decir, a la dosis recomendada (6 mg/kg), al menos en el compartimento blanco no se alcanzarían los valores de corte establecidos para los predictores de eficacia considerados para erradicar al *S. aureus* de la glándula mamaria. Sin embargo, dadas las características mencionadas para danofloxacin, decidimos continuar con el estudio a los fines de evaluar su comportamiento a nivel intracelular.

Sarasola *et al* en 2002, informó que tras la administración de un bolo intravenoso de danofloxacin en terneros, se alcanzó una alta relación C_{max}/CIM frente a *Pasteurella haemolytica* a los 15 minutos, siendo esta de 14.5 con una relativamente corta $T \geq CIM$ de 9.1 horas. En contraste, cuando danofloxacin, fue administrada en infusión continua, durante un periodo de 36 horas, solo se logró una relación C_{max}/CIM de 2.3, manteniéndose las concentraciones plasmáticas por encima de la CIM durante un período prolongado, lo que resultó en una $T > CIM$ de 33.3 h.

En el mismo estudio, los valores del predictor ABC/CIM tanto para la infusión constante, como para la administración de un único bolo, fueron uniformes y se mantuvieron en el rango de 43 y 49.1 h respectivamente.

La CIM determinada en nuestro estudio a pH 7.4 para danofloxacin frente a *S. aureus*, fue coincidente con la hallada anteriormente por Lucas en el año 2008 ($1 \mu\text{g/mL}$).

En un estudio realizado en Brasil por Cruz, *et al.*, (1998), donde evaluaron la actividad in vitro frente a cepas de *S. aureus* obtenidas de cuartos mamarios de vacas portadoras de mastitis encontraron una CIM_{90} para danofloxacin de $0.20 \mu\text{g/mL}$ y una CMB de $0.40 \mu\text{g/mL}$, donde se aprecia una relación CIM – CMB de 1:2, lo cual corrobora la acción bactericida de danofloxacin.

En otro estudio realizado en Colombia por Ruiz, *et al.* (2001) se evaluó la sensibilidad a un grupo de antibacterianos de 37 cepas de microorganismos aislados de glándulas mamarias bovinas durante el año 1999. Las bacterias correspondían en un 64.9% a *Streptococcus agalactiae*, un 18.9% a *S.aureus* y un 16.2% a *Staphylococcus coagulasa negativo*. Dentro de los antibacterianos ensayados, utilizaron ciprofloxacina, la cual presentó una CIM para *S. aureus* de 0.5 µg/mL por el método de microdilución.

Diversos autores han reportado CIM₉₀ de marbofloxacina frente a *S. aureus*, Shem-Tov *et al.* (1997) reportaron valores de 0.3 µg/mL, Schneider *et al.* (2004) de 0.22 µg/mL, Gánier *et al.* (2004) 0.25 – 0.5 µg/mL y Meunier *et al.* en un estudio publicado en 2004 sobre cepas colectadas en 8 países europeos, reportaron que entre 1994 y 2001, la CIM₉₀ de marbofloxacina frente a este patógeno osciló entre 0.12 y 1 µg/ml. De lo expuesto, se desprende que marbofloxacina es ligeramente más potente que danofloxacina frente a *S. aureus*.

Para la clínica veterinaria práctica, datos de susceptibilidad recientes para los patógenos comunes, reportados a nivel regional, son de gran valor en la selección de agentes antimicrobianos específicos (Pengov y Ceru, 2003), de manera que los datos aportados por el presente estudio pueden considerarse de relevancia.

Diversos autores han reportado muy buena actividad in vitro de distintas fluoroquinolonas frente a cepas de *S. aureus* aisladas de glándulas mamarias mastíticas en bovinos. Es así como Cruz *et al.*, en 1998 en Brasil, reportaron para danofloxacina valores de CIM₉₀ de 0.18 µg/mL, en otro estudio realizado también en Brasil, publicado en el año 2000 por De Oliveira *et al.*, reportaron para enrofloxacina niveles de CIM₉₀ de 0.06 a 0.31 µg/mL, y para ciprofloxacina se menciona un rango de CIM₉₀ de 0.12 a 0.5 µg/mL.

En nuestros resultados podemos observar que la CIM₉₀ de danofloxacina a pH 5.0 fue 2µg/mL, el doble de la CIM determinada para los pH 7.4 y 6.5, sin embargo considerando su buena penetrabilidad y capacidad de acumulación a nivel subcelular, decidimos continuar el estudio a los fines de evaluar su actividad a nivel subcelular.

La relación entre la farmacocinética y actividad antimicrobiana (farmacodinamia) debe ser considerada para determinar dosis e intervalo posológico, a los fines de maximizar

la eficacia antibacteriana. Desde esta perspectiva, las fluoroquinolonas han sido asociadas con una actividad bactericida concentración-dependiente (Zhanel, 2001).

Los parámetros predictores de eficacia relacionados con dicha actividad incluyen la relación del área bajo la curva concentración en función del tiempo (ABC) frente a la CIM calculada para el patógeno aislado, ABC/CIM, y la relación entre la concentración máxima (C_{max}) y la CIM, o C_{max}/CIM . Ambos parámetros están estrechamente relacionados, y son importantes para asegurar eficacia antimicrobiana (Martínez *et al.*, 2006).

Es sabido que para este tipo de antimicrobianos con actividad concentración-dependiente, es necesario alcanzar adecuados niveles en el sitio de infección, los cuales deben destruir la población bacteriana existente o, al menos, reducir significativamente el número de microorganismos, de tal manera que los mecanismos de defensa del hospedador puedan encargarse de controlar o eliminar los patógenos remanentes (Martínez *et al.*, 2006).

Debido a las propiedades PK/PD, así como a su mecanismo de acción, nos permite suponer que danofloxacin puede ser una alternativa viable e interesante para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias Grampositivas aeróbicas con capacidad de sobrevivir en el interior de los fagolisosomas tal como es el caso del *S. aureus*.

Al igual que en azitromicina, analizamos estadísticamente las CIMs obtenidas a diferentes pHs mediante el test de Bonferroni, el cual nos arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las CIMs obtenidas a pH 5 vs pH 7.4, pero no entre CIMs obtenidas a pH 5 vs pH 6.5 ni a pH 6.5 vs pH 7.4. Es decir, la pérdida de susceptibilidad del *S. aureus* a danofloxacin a pH 5.0 vs pH 7.4, obedece definitivamente a una consecuencia producida por el cambio de pH y no al azar. Lo hallado se opone a lo propuesto por Brown en 1996, quien manifestó, que el pH ácido del medio, no produce cambios en la actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas frente a patógenos Grampositivos, pero concuerda con la apreciación de Wetzstein y De Jong (1996), quienes demostraron que en pH ligeramente ácido (característico de tejidos inflamados, abscesos o fagocitos) se reduce la tasa de muerte de algunas bacterias en presencia de enrofloxacin (Otero *et al.*, 2001 a y b).

6.2.3. Penicilina G

Las penicilinas, son un grupo de antimicrobianos de origen natural, semisintético y sintético, que contienen un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, consistente en un anillo beta-lactámico unido a un anillo tiazolidínico. Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillium spp.* Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde pequeños cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas (Mandell y Petri, 2001).

De acuerdo a su origen y espectro de acción pueden clasificarse en: penicilinas naturales y semisintéticas (G y V, respectivamente), penicilinas resistentes a las penicilinasas estafilocócicas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilina). El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarca cocos Grampositivos, cocos Gramnegativos (*Neisseria meningitidis*) y bacilos Grampositivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos Gramnegativos anaerobios (Taponen *et al.*, 2003).

El efecto que ejercen las penicilinas es básicamente bactericida, sin embargo a bajas concentraciones pueden actuar como bacteriostáticas. Con respecto a su mecanismo de acción, en términos generales se puede afirmar que las penicilinas interfieren con etapas enzimáticas, especialmente reacciones de transpeptidación que alteran la síntesis de los compuestos necesarios para la formación de la pared microbiana. Debido a que el efecto bactericida de las penicilinas se ejerce sobre sustancias químicas propias de los microorganismos (ácido N acetilmurámico que no son constituyentes de las células de los mamíferos superiores), se le atribuye a estas moléculas un amplio margen de seguridad terapéutica. Las penicilinas al interferir con la 'construcción' de esta muralla facilitan la lisis del microorganismo, este hecho ha sido comprobado en numerosos géneros de gérmenes Grampositivos y en algunos Gramnegativos (Gomez, 2013).

Las penicilinas son ácidos orgánicos en general disponibles como sal sódica o potásica del ácido libre. Con la excepción de las isoxazolilpenicilinas (cloxacilina, oxacilina, dicloxacilina) y penicilina V, la hidrólisis ácida limita la disponibilidad sistémica de la mayoría de las penicilinas de las preparaciones orales. Las penicilinas (pKa 2.7) básicamente están ionizadas en plasma, tienen volúmenes de distribución aparentes relativamente pequeños (0.2 a 0.3 L / kg) y semividas de eliminación cortas (0.5 -1.2 horas) en todas las especies de animales domésticos (Bhavsar y Thaker, 2012).

Después de la absorción, tienen amplia distribución en los líquidos extracelulares, pero apenas atraviesan membranas biológicas por estar ionizadas y por su escasa liposolubilidad. La entrada a través de las barreras hematoencefálica, placentaria, mamaria o prostática, solo se ve favorecida en procesos inflamatorios, de modo que las concentraciones inhibitorias pueden ser alcanzadas en tales situaciones.

Las penicilinas son eliminadas casi por completo por los riñones (por filtración glomerular y secreción tubular activa), lo cual ocasiona niveles muy altos en orina; la nafcilina es una excepción, porque se excreta principalmente por bilis (Bhavsar y Thaker 2012).

La vía mamaria es también una ruta de eliminación de las penicilinas, encontrándose en pequeñas cantidades en la leche, las que pueden persistir durante 90 horas, dependiendo de la formulación administrada y del estado de la ubre. De la misma forma, se han detectado residuos de penicilina en leche después de la infusión intrauterina (Sarvaiya *et al.*, 2006).

En términos generales, todos los betalactámicos poseen características semejantes; luego de su administración parenteral, ya sea por vía intramuscular o subcutánea, se absorben en forma completa muy rápidamente; debido a su hidrosolubilidad, se distribuyen principalmente por el líquido extracelular, donde alcanzan concentraciones terapéuticas, si bien su ingreso al interior celular no es un proceso complejo, si lo es su acumulación, ya que es expulsado rápidamente del interior celular. Lo cual es lógico, dado que el interior celular es un pH más bajo que el del fluido extracelular, por lo cual no se establece secuestro de moléculas ácidas como lo es la penicilina.

La eficacia antibacteriana óptima de los β -láctamicos depende del tiempo por el cual las concentraciones se mantienen por encima de la CIM de los microorganismos patógenos y no de las concentraciones alcanzadas (Vogelman. 1988, Craig 1998, Carrillo *et al.*, 2013).

Desde principios de los años 70s, tenemos las primeras descripciones del efecto del pH, sobre el aumento de la sensibilidad de varios microorganismos a la penicilinaG (Sabath *et al.*, 1972). En el presente estudio, evaluamos ese efecto, por lo cual obtuvimos las CIMs de penicilina G frente a *S. aureus* a pH 7.4, 6.5 y 5.0; las fueron: 0.25, 0.125 y 0.066 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Observamos una marcada reducción de la concentración inhibitoria mínima de PenicilinaG a pH 5.0, que al analizar estadísticamente arrojó una diferencia altamente significativa ($P = < 0.001$). Estas diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las CIMs obtenidas a diferentes pHs, nos permiten suponer un restablecimiento de la susceptibilidad del *S. aureus* a penicilina G en medio ácido.

La restauración de la susceptibilidad a las penicilinas del *S. aureus* en medio ácido, ya se había descrito con anterioridad, pero en ese momento no se consideró de importancia clínica. De hecho, vieron este efecto de una manera reproducible sólo a valores de pH inferiores a 5.5 (mediante el uso de métodos de dilución en agar) y no fueron conscientes de que este grado de acidez, se presenta con frecuencia en focos infectados y más aún en estructuras intracelulares a las cuales se encuentran normalmente asociados los patógenos (Sandrine *et al.*, 2007).

En el presente estudio confirmamos esta observación original y entendemos que este hecho tiene en sí un significado terapéutico mucho más amplio, mostrando que, la restauración de la susceptibilidad de patógenos en principio resistentes se puede obtener de manera reproducible a un pH de 5.5 o inferior cuando los ensayos se realizan en caldos con pH ajustado y que las estructuras intracelulares en las que *S. aureus* sobrevive y prospera en los macrófagos, representan focos de infección con un grado de acidez suficiente para causar una restauración de la actividad.

Doce años después de su descubrimiento, la restauración de la susceptibilidad de MRSA en pH ácido frente a β -lactámicos fue atribuida a la ausencia de expresión de PBP 2^a (Hartman y Tomasz, 1984), esta presunción se basaba en su falta de detección con bencilpenicilina marcada con 3H, incluso a altas concentraciones (Hartman y Tomasz, 1984).

En un estudio publicado por Sandrine *et al.*, en 2007, demostraron que el crecimiento de bacterias a un pH de 5.5 en lugar de pH 7.4, no altera el nivel de expresión del gen que codifica a PBP 2a (*mecA*), o de sus genes reguladores cuando la expresión es examinada por RT-PCR (un resultado similar fue obtenido para la cepa de MRSA COL mediante el uso de análisis de microarrays) y no modifica el contenido bacteriano en PBP 2a inmunodetectable.

La observación de Hartman y Tomasz debe, por lo tanto ser reinterpretada, puesto que no se indica realmente la ausencia de PBP 2a, pero si, la incapacidad de PBP 2a de ligar la penicilina cuando se expresa en las bacterias que crecen en un pH ácido (Sandrine *et al.*, 2007).

Una interpretación tentativa de estos datos puede ser, que el pH ácido hace a la PBP 2a incapaz de unirse a β -lactámicos, pero mejora la unión de la penicilina a otros objetivos (que explica la disminución de la CIM para MSSA a pH ácido) y que también hace a la PBP 2a incapaz de compensar la inactivación de la otra PBP, resultando en las susceptibilidades similares de MRSA a β -lactámicos.

Por lo tanto, la PBP 2a expuesta a pH ácido puede ser en realidad una enzima inactiva; a pH 7.4, PBP 2a muestra ya muy débil unión y una baja tasa de acilación cuando se expone a la oxacilina pero mantiene eficiente actividad de síntesis de peptidoglicano. Algunos cambios conformacionales sustanciales en la PBP 2a se presentan, pero sin embargo, para que estas reacciones se produzcan, se requiere del pH ácido (Fuda *et al.*, 2004).

La expresión completa de resistencia a la meticilina requiere que la función de transglicosilasa de la PBP 2 se mantenga, junto con la función de transpeptidasa de la PBP 2a y la capacidad de la PBP 2a para localizar correctamente los otros componentes necesarios para la síntesis de la pared celular, incluyendo PBP 2, en el sitio de división de *S. aureus* (Pinho y Errington, 2005).

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el pH ácido impida que la PBP 2 funcione en conjunción con PBP 2a y/o perturbe su reclutamiento. Estas hipótesis no mutuamente excluyentes ahora pueden necesitar ser examinadas por el uso de métodos bioquímicos y morfológicos adecuados (Sandrine *et al.*, 2007).

Nuestras observaciones pueden inducir el diseño y ejecución de más estudios *in vitro* y *aún in vivo*, para promover el interés terapéutico de incluir β -lactámicos en el tratamiento de infecciones por SARM y/o en situaciones en las cuales la ubicación en organelas intracelulares desempeñe un papel importante en la persistencia intracelular de *S. aureus*, causando recaídas y recidivas. Aunque no es seguro que intracelularmente el *S. aureus* siempre esté ubicado dentro de fagolisosomas ácidos, la restauración de la susceptibilidad de MRSA a β -lactámicos también podrían tener lugar en otros entornos, tal como la superficie de la piel (Dikstein y Zlotogorski, 1994), la vagina, o las vías urinarias, que son los hábitats donde el pH puede llegar a un valor suficientemente bajo.

En general, podemos afirmar que el medio ácido tiene una incidencia directa sobre el comportamiento de los ATBs probados, en casos como azitromicina y danofloxacina, este efecto es negativo, incidiendo de manera directa en la acción antibacteriana, en contraste pudimos observar que penicilina G, tuvo un importante aumento en su capacidad antibacteriana a pH ácido.

6.3 CURVAS DE LETALIDAD BACTERIANA.

El desarrollo de los diversos modelos predictivos del comportamiento microbiano, empleados en microbiología, descansan sobre bases matemáticas preestablecidas con anterioridad, sin importar si se trata de modelos probabilísticos, cinéticos, mecanísticos etc.

En el año 1949, Jacques Monod, publicó en el Annual Review of Microbiology un estudio titulado: THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. En el cual, desarrolló un modelo matemático mediante el cual era posible estimar la población de una bacteria, metabolito o sustrato en función del tiempo. Este modelo fue inicialmente adoptado en la industria de la fermentación, posteriormente se fueron desarrollando técnicas para representar por medio de expresiones matemáticas la relación existente entre el número de bacterias finales en función del tiempo y como puede variar este número por acción de algún agente externo que influya sobre su crecimiento o supervivencia.

En nuestro caso particular, realizamos curvas de muerte bacteriana exponiendo nuestras cepas de campo y la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 29213 a concentraciones sub CIM, CIM y varias veces la CIM, de: azitromicina, danofloxacina y penicilinaG, a pH 7.4, 6.5 y 5.0 comúnmente asociados a estructuras subcelulares donde habitan y se desarrollan eventualmente los *S. aureus*, como así también evaluamos la incidencia de la leche y del suero. Con la finalidad de evaluar, por un lado el efecto limitante que tienen los antibacterianos sobre el crecimiento y desarrollo de los microorganismos y por otro lado el efecto que pudiera inducir el cambio de pH en dicho resultado.

6.3.1. Azitromicina

Tal como lo indican nuestros resultados, tanto los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de azitromicina en CMH pH 7.4, donde la CIM se situó en 1 µg/mL, la actividad antibacteriana, no se vió alterada al incrementar las concentraciones del antimicrobiano, es así que prácticamente a 1, 2, 4 y 8 veces la CIM presentó similar cinética de muerte. El análisis de las curvas, para estas concentraciones, se realizó aplicando un modelo sigmoideo menos base. Sin embargo al aumentar la concentración de azitromicina en el caldo (8xCIM) el T_{150} fue más breve.

Por otro lado, las curvas de crecimiento control para los aislamientos salvajes y de referencia, fueron analizadas por el modelo de Gompertz, de igual manera que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos a 0.125, 0.25 y 0.5 CIM de azitromicina, ya que, como se pudo observar en los resultados, a esas concentraciones no se inhibió el crecimiento bacteriano, aunque sí se vió afectada la magnitud del mismo. Estudios realizados por Seral *et al.* (2003) indican una baja actividad antibacteriana de azitromicina a diferentes concentraciones en caldo (0.5 a 10 µg/mL), las que no redujeron la concentración del inóculo bacteriano en comparación con otros antibióticos, es decir azitromicina en caldo se mostró esencialmente bacteriostática.

Con los parámetros derivados del modelo de Gompertz, obtuvimos la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b \cdot c / e$) (Log UFC/mL*h) ($e = 2.7182$), la duración de la fase de latencia ($LPD = m - 1/b$) (h) y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares ($MPD = a + c$) (Log UFC/mL).

A medida que se aumentó la concentración de azitromicina en el caldo (0.125, 0.25 y 0.5 CIM) disminuyó la MPD y la población bacteriana se mantuvo mayor tiempo en fase de latencia. Efecto, ocasionado por la presencia de concentraciones subinhibitorias de azitromicina.

A pH 6.5, donde la CIM para azitromicina fue 8 $\mu\text{g/mL}$, los aislamientos salvajes como la cepa de referencia tuvieron un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones de azitromicina, nuevamente su actividad frente a *S. aureus* no aumenta al incrementar las concentraciones, aunque sí a este pH disminuyó su potencia antibacteriana. Datos que concuerdan con los estudios del modelo de simulación de actividad extracelular a pH de 7.3 a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (Barcia-Macay *et al.*, 2006).

Es así que el *S. aureus*, presentó similar cinética de muerte a 1, 2, 4 y 8 veces la CIM, de manera similar a lo que ocurrió cuando se ensayó a pH 7.4. Aunque el aumento de la CIM demuestra la pérdida de potencia antimicrobiana a medida que el pH se va acidificando.

Al igual que lo ocurrido a pH 7.4, al enfrentar los inóculos a concentraciones subCIM, 0.25 y 0.5xCIM de azitromicina, continuó el crecimiento bacteriano, aunque de manera más lenta.

Cuando el CMH se llevó a pH 5, la CIM de azitromicina fue $\geq 64 \mu\text{g/mL}$. A este pH, se obtuvo acción antibacteriana de la azitromicina cuando se ensayó a concentraciones más altas (2 y 4 veces la CIM) frente al *S. aureus*. El aumento de la CIM demuestra bajo estas condiciones una pérdida de potencia antimicrobiana a medida que el pH se va acidificando, ya que para lograr efecto antibacteriano se requiere de grandes concentraciones de azitromicina.

La cinética de crecimiento para los cultivos control y las concentraciones subCIM, fue muy similar para los anteriores casos descritos, permaneciendo por un espacio de tiempo mayor en fase de latencia los cultivos expuestos a concentraciones subCIM.

En leche, cuyo pH se encuentra entre 6.5-6.8, azitromicina comenzó a ejercer cierta actividad frente al *S. aureus* a concentraciones muy bajas (0.25xCIM), a diferencia de lo que ocurrió en CMH a igual pH. Si bien se evidenció un aumento de la CIM a medida que el pH se vuelve más ácido, la inhibición bacteriana en leche a grandes concentraciones fue mejor que en caldo.

Este efecto lo hemos analizado en todas las pruebas de susceptibilidad realizadas en leche, donde en comparación a las realizadas en iguales condiciones en CMH, siempre encontramos mejor respuesta antibacteriana en la leche, probablemente debido a que los factores inmunitarios específicos e inespecíficos presentes en la misma coadyuvan con el antimicrobiano y a las inmejorables condiciones de crecimiento que ofrece el caldo de cultivo vs la leche.

En suero bovino, cuyo pH es 7.4, azitromicina comenzó a ejercer actividad frente al *S. aureus* a concentraciones del orden de 0.5xCIM. En nuestro caso, la CIM de azitromicina para *S. aureus* cuando el CMH fue suplementado con 40% de suero bovino fue de 2 µg/mL, pero a 1 µg/mL presentó inhibición sobre el crecimiento microbiano.

6.3.2. Danofloxacin

A pH 7.4, danofloxacin, presentó, tanto frente a los aislamientos salvajes como a la cepa de referencia, un comportamiento similar a las diferentes concentraciones ensayadas. A través del modelo sigmoide, observamos que a concentraciones mayores a 0.5 veces la CIM, el T_{150} fue descendiendo, conforme aumenta la concentración, lo cual es lógico, ya que al ser un ATB acción bactericida dependiente de la concentración, el tiempo en que tarda en exhibir un efecto bactericida, será menor a concentraciones mayores. A este pH, el T_{150} fue de 0.43 a 0.56 h a 16 veces la CIM, mientras que a 4xCIM fue de 1.12-1.11 h.

Cuando el CMH fue suplementado con suero, danofloxacin evidenció actividad frente al *S. aureus* a concentraciones a partir de 0.5xCIM. En todas las concentraciones

ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte que en CMH a pH 7.4.

En un estudio publicado por Baroni *et al* en 2014, encaminado a determinar la actividad antibacteriana in vitro de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*, realizaron curvas de muerte bacteriana en diferentes condiciones y encontraron al igual que nosotros que, en CMH solamente se obtuvo un efecto bactericida ($E = 3$) con concentraciones de (16 x CIM) y superiores, a las 2 y 3 horas de iniciado el ensayo, pero, en contraste con nuestros hallazgos, donde encontramos este mismo efecto hasta las 24 horas de iniciado el ensayo, ellos reportaron que ninguna concentración de ciprofloxacina logró un efecto bactericida, presentando valores de E entre -2,005 (99,01%) y -2,882 (99,87%) después de 5 horas.

En el mismo estudio, Baroni *et al.* (2014) encontraron que en las curvas realizadas en CMH, suplementado con suero bovino, el número de bacterias viables se redujo de manera proporcional al incremento de los niveles de ciprofloxacina y obtuvieron efecto bactericida a concentraciones de (4 x CIM) y (32 x CIM), lo cual concuerda con nuestros resultados, donde a pesar que la CIM para esta matrix es de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, empezamos a observar efecto inhibitorio a 0.5 veces la CIM y se presentó efecto bactericida a concentraciones de 2 y 4 veces la CIM y efecto de erradicación virtual a la concentración de 16 veces la CIM.

A pH 6.5, al igual que el caso anterior, danofloxacina nuevamente se comportó de manera similar a las diferentes concentraciones frente a los aislamientos salvajes y de referencia. Es decir, su actividad aumentó notablemente al aumentar las concentraciones; a través del modelo sigmoideal, observamos que el tiempo en que tarda en exhibir un efecto bactericida, fue menor a concentraciones mayores. A este pH, el T_{150} fue de 1.50 h a 16XCIM, mientras que a 4XCIM fue de 3.39h. Las curvas en ausencia de danofloxacina en conjunto con las curvas obtenidas a concentraciones de 0.25 y 0.5 CIM de las cepas salvajes, fueron analizadas por el modelo de Gompertz, debido a que, frente a esas concentraciones continuó el crecimiento bacteriano. Sin embargo no ocurrió lo mismo con el *S. aureus* ATCC de referencia, ya que se mostró más sensible y a 0.5CIM se evidenció inhibición bacteriana.

La CIM para danofloxacina a pH 5, como se comentó anteriormente aumentó ligeramente, situándose entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de igual forma se evidencia nuevamente su

acción dependiente de la concentración. Las curvas en ausencia de danofloxacin fueron analizadas por el modelo de Gompertz, al igual que las curvas obtenidas al enfrentar los inóculos salvajes a 0.25, 0.5 y 1xCIM, indicando pérdida de su actividad bactericida a pH más ácido, lo que se corrobora por el aumento de su CIM, comportamiento demostrado también con la cepa de referencia.

En un estudio diseñado para evaluar la farmacodinamia intracelular de algunos antibacterianos frente a *S. aureus* utilizando un modelo de macrofagos THP 1, Barcia-Macay *et al.* (2006), determinaron CIMs para levofloxacin, moxifloxacin, garenoxacin y moxifloxacin a pH 5.0 en 1, 1, 1.25 y 0.25 respectivamente, lo cual corresponde a valores de entre 6 a 8 veces mayores que las CIM reportadas para estos mismos ATBs a pH 7.3; lo cual se correlaciona con nuestros resultados, confirmando la pérdida de actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas a pH ácido.

En leche, danofloxacin presentó una CIM de 1 µg/mL, similar a la CIM obtenida en CMH pH 6.5; en esta matriz, 0.5xCIM, presentó cierta inhibición sobre el crecimiento microbiano, diferenciándose en este caso con lo ocurrido en el CMH a pH 6.5.

Teniendo en cuenta que la leche no es un medio tan enriquecido para el crecimiento bacteriano como el CMH, y que además hay factores inmunitarios específicos e inespecíficos que inhibirían el crecimiento bacteriano, esperaríamos una mayor actividad antibacteriana de danofloxacin en este medio, pero, la actividad de las quinolonas, en la leche, se ve disminuida debido a la presencia de sales de calcio. Marshall y Piddock (1994), reportaron que las CIM de 18 quinolonas para las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aumentaron en presencia de leche.

Con relación al efecto que ejerce la leche sobre la acción antibacteriana de las quinolonas, diversos autores han determinado que dicha actividad puede verse reducida en presencia de cationes bivalentes como calcio y magnesio, considerando que las concentraciones de estos iones son elevadas en leche (1.25 y 0.12 g/L, respectivamente). Gánier *et al.* (2004) estudiaron el efecto del medio de cultivo (caldo Mueller Hinton o leche semidescremada), sobre los valores de CIM y CMB de diversos antimicrobianos frente a patógenos mamarios aislados de bovinos. En el caso de marbofloxacin, hubo un incremento

de entre 2 a 4 veces en los valores de estas concentraciones cuando fueron medidos en leche.

En el caso concreto de *S. aureus*, la CIM determinada en AMH se incrementó al doble cuando fue medida en leche, resultados similares, fueron reportados por Fang y Pyorala (1996), quienes demostraron que la leche reduce aproximadamente a la mitad la actividad bactericida de enrofloxacin frente a *E. coli*.

6.3.3. Penicilina G

La actividad antibacteriana de penicilina G a pH 7.4, presentó un comportamiento similar frente a las diferentes concentraciones, revelando claramente que su actividad frente a *S. aureus* no se vió aumentada al aumentar las concentraciones de PenG, demostrando su dependencia del tiempo de contacto, tal como lo reporta la literatura (Craig 1998, Carrillo *et al.*, 2013.). En todos los casos, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

Un estudio llevado a cabo por Betriu *et al.* (1994), encaminado a determinar la tolerancia a penicilina G de cepas de β *Streptococcus* (GBS) mostró por medio de curvas de muerte bacteriana a una concentración de 10 veces la CIM, que penicilina provocó una rápida muerte de GBS sensibles, con una disminución – 3 Log ufc/mL durante las primeras 8 horas, siguiendo con la ausencia de recuentos viables a las 24 horas, en contraste con cepas tolerantes que solo disminuyeron entre 2 y 3 log en las primeras 8 horas y después de 24 h, no se presentó efecto bactericida. La utilización de una única concentración en este estudio, no permite vislumbrar cual es la real concentración que pudiera tener efecto bactericida o de erradicación virtual en la cepas sensibles. En contraste nuestro trabajo nos provee de gran información al tener la posibilidad de evaluar la actividad de penicilina a un rango amplio de concentraciones tanto subCIM como sobre CIM, nuestros resultados son compatibles con lo reportado por Knudsen *et al.* (1995). Quienes indicaron que el efecto de la penicilina In vitro es independiente de la concentración, tal como lo reporta la literatura y

lo confirman nuestros ensayos, con un efecto máximo a dos a cuatro veces la CIM para microorganismos penicilino-susceptibles.

La CIM de PenG, a pH 6.5, fue la misma que a pH 7.4, sin embargo a este pH pareciera que la Pen G presenta mayor acción bactericida, pues a 2, 4, 8 y 16 veces su CIM presenta una fuerte acción bactericida, aunque no muy diferente entre las mayores concentraciones, lo cual de nuevo corrobora, su acción dependiente del tiempo y no del aumento de la concentración.

La CIM para PenG a pH 5 fue 0.066 $\mu\text{g/mL}$, a este pH aumentó notablemente su actividad frente al *S. aureus*, ya que la CIM fue varias veces inferior a lo observado en los pH 7.4 y 6.5; observamos que a partir de 0.5xCIM este antimicrobiano presenta actividad frente al *S. aureus*, efecto que fue más evidente hasta 4 veces la CIM, de ahí en adelante, las concentraciones mayores no mostraron mayor eficacia.

En leche, Pen G, presentó un comportamiento similar al observado a pH 6.5 en CMH. El modelado de las curvas de letalidad bacteriana, en presencia de PenG en leche bovina, fue realizado aplicando un modelo sigmoideo menos base. En todas las concentraciones ensayadas, tanto las cepas salvajes como la de referencia presentaron similar cinética de muerte.

Como se mencionó con antelación, penicilina G, presenta un evidente aumento en la sensibilidad al disminuir el pH del medio frente a *S. aureus*, lo cual coincide con lo reportado por Sandrine *et al.* (2007), para otros β -lactámicos como meropenem y cloxacilina.

Sandrine *et al.* (2007) interpretan dicho evento como la incapacidad de la PBP 2^a para unirse a los β -lactámicos en condiciones de pH ácido, lo cual mejora la unión de la penicilina a otros objetivos, y también que el pH ácido, hace PBP 2a incapaz de compensar la inactivación de la otra PBPs, resultando en las susceptibilidades similares de *S. aureus* meticilino resistente y *S. aureus* meticilino sensible a β -lactámicos.

Estos datos, nos muestran quizás lo que pudiera ser una alternativa que nos permitiría recrear las condiciones intracelulares, donde el pH ácido favorecería la acción de los β -lactámicos y explicaría porque a pesar de no centrarse en cantidades suficientes a nivel intracelular, serían una buena opción en el tratamiento de infecciones intracelulares por *S.*

aureus, pero aún es muy complejo obtener una visión completa de su potencial terapéutico, ya que esta susceptibilidad no puede simplemente ser deducida de su eficacia, sino que se deben tener en cuenta factores como la acumulación y disposición de estas moléculas a nivel intracelular.

La CIM de Pen G frente a *S. aureus* cuando el CMH fue suplementado con 40% de suero bovino fue igual que la CIM obtenida en CMH a pH 7.4 (0.5 µg/mL), al igual que su cinética de muerte en esta matrix.

6.3.4. ÍNDICE DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Como se indicó en el apartado resultados, definimos el índice de actividad antibacteriana (E), como la diferencia entre los valores Log_{10} del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio (n_{t-0}) y al final del ensayo (n_{t-24}).

Con la finalidad de evaluar E , aplicamos tres puntos de corte teóricos: a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en valor de n_{t-0} ; b) Efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ de n_{t-0} por eliminación del 99.9% de las bacterias iniciales y c): Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \text{ Log}_{10}$ (eliminación del 99.99%) respecto del Log de n_{t-0} .

6.3.4.1. AZITROMICINA

Con base en esta premisa, encontramos que, para azitromicina en CMH-pH 7.4 solamente se obtuvo un efecto bacteriostático ($E=0$), tras 24 h de contacto con concentraciones entre la CIM (2 µg/mL) y 8 veces la CIM (16 µg/mL), corroborando lo observado al analizar las curvas de muerte bacteriana.

Luego en CMH-pH 6.5, ocurrió exactamente lo mismo que en el caso anterior, pero a una concentración 4 veces mayor, ya que la CIM de azitromicina a pH 6.5 fue 8 µg/mL. Aquí, queda de nuevo manifiesto que la azitromicina a medida que el pH se acidifica pierde

eficacia antibacteriana, necesitando concentraciones mayores para lograr el mismo efecto que a pH 7.4.

En CMH-pH 5, azitromicina logró efecto bactericida compatible con la cura clínica, a pesar de ser un antimicrobiano que por su mecanismo de acción (inhibición de la síntesis proteica a nivel bacteriano) se destaca por presentar efecto de tipo bacteriostático. Este efecto se logró solo a concentraciones en el orden de 4 veces la CIM, que a este pH fue 8 veces superior (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a la CIM presentada a pH 6.5. En las concentraciones equivalentes a la CIM y 2xCIM solamente se obtuvo efecto bacteriostático.

Empleando leche bovina como caldo de cultivo, para emular lo acontecido en la glándula mamaria, azitromicina se comportó de manera similar a lo observado en CMH-pH 6.5, es decir logró solo efecto bacteriostático.

En CMH suplementado con 40% de suero bovino (Tabla 56), azitromicina se comportó de manera similar a lo observado en CMH-pH 7.4, es decir logró solo efecto bacteriostático. Es decir no observamos potenciación alguna por la presencia del suero.

Analizando los resultados de este ensayo y teniendo en cuenta las características farmacodinámicas de este antibacteriano, podemos determinar que azitromicina, tiene la particularidad de no pertenecer a una sola categoría, es decir que aunque clásicamente se determina como un antibacteriano tiempo dependiente, algunos autores consideran que presenta acción dependiente de la concentración y que $C_{\text{max}}/\text{CIM}$ es el parámetro que mejor predice su comportamiento (Mazzei y Novelli, 1999).

Por otro lado, estudios experimentales han demostrado que la eficacia clínica de claritromicina y azitromicina, no solo depende de la relación $T > \text{CIM}$, sino que se debe considerar también la relación $\text{ABC}_{24\text{hs}}/\text{CIM}$ (Van Bambeke, 2001; Novelli, 2002), parámetro directamente gobernado por la dosis diaria total administrada (Novelli, 2002). De la misma forma, se sabe que los macrólidos actúan como bacteriostáticos, sin embargo, pueden actuar como bactericidas dependiendo de su concentración, de la densidad microbiana a la que se enfrentan, de la fase de proliferación y de la susceptibilidad de la cepa involucrada (Mulazimoglu et al., 2005). Lo anterior soporta, lo reportado en este estudio, donde hallamos efecto bactericida a pH 5.0 a concentraciones superiores a 4 veces la CIM.

En general, para los tratamientos con azitromicina al poseer un perfil farmacocinético particular y un prolongado efecto persistente, su actividad se correlaciona mejor con la relación ABC_{24hs}/CIM que con el $T > CIM$.

Los macrólidos tienen la capacidad de concentrarse a nivel intracelular, principalmente dentro de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Gómez-Lus *et al.*, 2005). En el interior de estas células se ubican en los lisosomas, dentro de los cuales se concentran por atrapamiento iónico y, si tenemos en cuenta que solo la forma no ionizada es la única que posee actividad antibacteriana (Shryock *et al.*, 1998), podemos inferir que la alta concentración de azitromicina a nivel intralisosomal no es garantía de actividad antibacteriana, aunque se cree que el acúmulo de macrólidos dentro de leucocitos puede incrementar el rendimiento de los mecanismos asociados a la inmunidad celular.

6.3.4.2. DANOFLOXACINA

Por su condición de antibacteriano acción dependiente de la concentración, danofloxacina en CMH-pH 7.4 presentó efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$) a partir de $2x CIM$. Y efecto de erradicación virtual de bacterias ($E \geq -4 \log_{10}$) con eliminación del 99.99% respecto del Log al tiempo de inicio a concentraciones superiores a 2 veces la CIM.

Este mismo comportamiento fue observado en CMH-pH 6.5, a este pH en concentraciones inferiores a $2x CIM$ muestra claramente un efecto bacteriostático, situación que puede ejercer presión de selección sobre las subpoblaciones son susceptibilidad a danofloxacina disminuída.

Danofloxacina, a pH ácido, pierde potencia, ya que su CIM en CMH-pH 5, se ubica en $2 \mu g/mL$ presentando efecto bacteriostático ($E = 0$), recién a partir de $4x CIM$ se da el efecto bactericida ($E \geq -3 \log_{10}$) y, a partir de concentraciones por encima de $8x CIM$ presenta efecto de erradicación virtual.

En los estudios realizados en leche, danofloxacina, presento efectó bacteriostático a concentraciones de $1x CIM$, pero, a partir de $2x CIM$ ($2 \mu g/mL$) se visualiza un cambio drástico, presentándose un efecto de erradicación virtual ($E \geq -4 \log_{10}$). El comportamiento de este

mismo antibacteriano en CMH suplementado con 40% de suero bovino, fue similar al observado en CMH pH 7.4, donde obtuvimos efecto bacteriostático a la concentración equivalente a 1xCIM, pero a concentraciones de 2 y 4 veces la CIM demostró efecto bactericida compatible con cura clínica ($E \geq -3 \log_{10}$).

La actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas, al igual que las quinolonas de primera generación, está determinada por su acción sobre la ADN girasa en organismos Gram negativos y sobre la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos tal como el *S. aureus*. (Hooper, 2001). Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN, de ahí que la inhibición de estas funciones conduzca a la muerte celular.

Nuestros resultados corroboran que el mecanismo de acción de danofloxacin induce muy buena actividad bactericida *In Vitro* frente a las cepas de campo de *S. aureus*, aisladas de cuartos mamarios de vacas portadoras de mastitis subclínica. Dicha observación nos permite inferir que *In Vivo*, contando con el efecto potenciador de la acción antibacteriana que nos brinda el sistema inmune, a través de los factores específicos e inespecíficos que facilitan y potencializan la acción de los antibacterianos (Meglia y Matta, 2001), podríamos sugerir que danofloxacin es una mejor alternativa que azitromicina para el tratamiento de mastitis subclínica producida por *S. aureus*.

6.3.4.3. PENICILINA G

Las características PK/PD de Penicilina G, determinan que su acción bactericida, sea en mayor parte dependiente del tiempo de contacto, en las pruebas realizadas en CMH-pH 7.4, a la concentración equivalente a 1xCIM presentó efecto bacteriostático ($E = 0$). El efecto bactericida se hizo evidente a 2xCIM y el efecto de erradicación virtual compatible con cura bacteriológica a 4xCIM. A la concentración de 8xCIM se presentó el efecto paradójico clásico de penicilina G previamente descrito, observándose un efecto bactericida, para luego a 16 veces la CIM recobrar el efecto de cura bacteriológica.

La CIM de penicilina a pH 6.5, continúa siendo 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ igual que a PH 7.4, pero se observa un aumento en su actividad antibacteriana, ya que a la concentración de 2xCIM, produce un drástico efecto de erradicación virtual ($E = \geq -4 \log_{10}$), observamos a este pH,

nuevamente el efecto paradójico a 4 veces la CIM ($E = \geq -3 \log_{10}$). Para finalmente a concentraciones equivalentes a 8 y 16xCIM recuperar el efecto de erradicación virtual, compatible con la cura bacteriológica.

A pH 5.0 penicilina G, aumenta su eficacia antibacteriana, lo cual se ve claramente evidenciado en la reducción en la CIM, la cual fue de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a este pH, se presenta el efecto bacteriostático a valores de 1xCIM, y efecto bactericida a concentraciones superiores a 2 veces la CIM. A este pH no observamos efecto paradójico como cuando se cultivó a pH 7.4 y 6.5.

En leche al igual que a pH 6.5, la CIM de penicilina G, fue 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en esta matriz, observamos a 1xCIM efecto bacteriostático y a concentraciones mayores a 2xCIM, encontramos efecto bactericida, pero en contraste con lo observado en CMH a pH 6.5 no se observó efecto de erradicación virtual ($E = \geq -4 \log_{10}$) en las cepas salvajes.

Penicilina en CMH suplementado con 40% de suero bovino, repitió el patrón de comportamiento evidenciado en las pruebas realizadas en CMH pH 7.4.

El mecanismo de acción de la penicilina G, produce un efecto bactericida en bacterias en fase de crecimiento, tal como se evidencia en nuestros resultados; esta característica, unida al hecho que las bacterias recobran sensibilidad a la penicilina a pH ácido, nos indican que este antimicrobiano podría ser una buena elección terapéutica, de hecho, tradicionalmente se ha considerado que el paso de un fármaco de la sangre a la leche refleja razonablemente bien la concentración del fármaco en el tejido mamario, pero no siempre es así; algunas veces una distribución no tan sorprendente del fármaco a la leche puede reflejar una mejor concentración en el tejido mamario. Características como acción bactericida, CIM bajas y baja toxicidad pueden ser considerados como factores ventajosos para un antibacteriano dado, este es el caso de las penicilinas, las cuales, siguen siendo de primera elección para el tratamiento de la mastitis por microorganismos Gram-positivos.

Dicho de otra forma, los β -lactámicos que generalmente no exceden la concentración en leche por arriba del 20% de la concentración plasmática correspondiente y debido a su rápida eliminación, su concentración residual es baja, son tradicionalmente considerados como muy efectivos en el tratamiento de la mastitis (Soback et al., 1995).

6.4. EFECTO POSTANTIBIOTICO (PAE)

El PAE hace referencia a la supresión del crecimiento de un microorganismo después de la exposición a un agente antimicrobiano (Mac Donald *et al.*, 1997), y es de interés clínico importante, ya que una vez hallado este tiempo para cada antimicrobiano frente a un determinado agente patógeno, podríamos indicar intervalos de dosificación más largos, lo cual contribuye a reducir la toxicidad y los costos del tratamiento sin pérdida de eficacia.

El PAE, ha sido un parámetro farmacodinámico que ha despertado gran interés especialmente en la última década tal como se comentó en su análisis bibliográfico. En el desarrollo de esta tesis doctoral, realizamos una relación de modelos experimentales tanto “in vitro” como “in vivo”, para la determinación del PAE de nuestros antibacterianos frente a las cepas problema y ATCC 29213 de *S. aureus*.

Dado que la comparación de datos depende en gran medida del modelo utilizado, la discusión sobre el PAE se centrará en primer lugar en la evaluación de los modelos experimentales utilizados para su determinación, ya que este fenómeno requiere una metodología más complicada que el estudio de los demás parámetros.

6.4.1. EVALUACION DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

6.4.1.1. Modelo “In Vitro”

El método de dilución utilizado para eliminar el antimicrobiano es uno de los más utilizados en la determinación del PAE “in vitro” (Craigy Gudmundsson, 1999). Su uso es amplio debido a su facilidad, rapidez y mejor comparación con los datos obtenidos con otros autores. El único problema reside en la posible pérdida de UFC cuando el antimicrobiano es muy bactericida.

En nuestros experimentos, el PAE fue determinado mediante el seguimiento del número de UFC/mL utilizando el recuento de las UFC viables en placa. Este método ha sido y es ampliamente utilizado por su relativa facilidad y rapidez (Isaksson *et al.*, 1993). Sin embargo, es posible que en este método de evaluación, se presenten posibles

subestimaciones en el PAE al asumir que hay una correspondencia entre una bacteria y una UFC. Algunos antimicrobianos (sobre todo los β -lactámicos) producen filamentación, con lo cual es probable, tomar un filamento (de 2 a 20 células) como una UFC; al dividirse el filamento rápidamente en células independientes crearía un virtual rápido crecimiento que aparentemente reduciría el PAE (Mc. Donald *et al.*, 1981).

En el caso de los antimicrobianos probados en este estudio, esto sólo podría ocurrir con penicilina G. Otros métodos para la determinación del PAE, como el de espectrofotometría o el de medida de impedancia son incapaces de medir concentraciones por debajo de 10UFC/mL.

El método de bioluminiscencia del ATP intracelular está solo basado en que el contenido de ATP es siempre igual en la célula. Este último y el método de cambios en la morfología han dado PAEs más prolongados que el de recuento en placa (Mc. Donald *et al.*, 1981).

4.4.1.2. Modelo “In Vivo”

Para estudiar este fenómeno in vivo, se han utilizado varios modelos en animales (Hesen *et al.*, 1988; Odenholt, Holm y Cars, 1990; Odenholt-Tornqvist *et al.*, 1995).

El modelo de infección en el muslo de ratón neutropénico (Gudmundsson *et al.*, 1986) es uno de los modelos más empleados porque es más rápido y menos laborioso que otros. En la literatura se reportan PAEs largos hallados para quinolonas y aminoglucósidos mediante el uso de este modelo (Minguez *et al.*, 1992), aunque para meropenem no se encontraron valores significativos (Fuentes *et al.*, 1995). Otros autores también han informado un significativo PAE in vivo con macrólidos y aminoglucósidos mediante el uso de este modelo (Minguez *et al.*, 1992; Hesen *et al.*, 1988).

El modelo de infección en muslo de ratón neutropénico utilizado en este trabajo es tal vez el más usado en la determinación del PAE “in vivo” (Vogelman *et al.*, 1998). Sus ventajas más importantes son:

- fácil manejo de los animales.

- facilidad en la extracción del muslo para la obtención del número de UFC.
- La inmunodepresión permite ver aisladamente la relación bacteria-antimicrobiano.
- las curvas de control de las concentraciones subinhibitorias comprueban que el PAE no se debe a la acción del antimicrobiano residual.

Se ha demostrado que en modelos animales con una relación $AS/V=60$, donde AS = (área de superficie de contacto entre los capilares y el compartimento que se estudia) y V = (volumen de líquido que contiene), los niveles de antimicrobiano en suero son muy parecidos a los encontrados en tejidos (Ryanet *al.*, 1986). El modelo de infección en muslo, al igual que los que utilizan compartimentos naturales, tienen una relación AS/V alta; por tanto, los niveles de antimicrobiano (y sus metabolitos activos) en suero estimarían relativamente bien las concentraciones en el fluido intersticial del músculo del muslo (Renneberg y Walder, 1988).

Buscando cuantificar la virulencia relativa in vivo de diferentes cepas de *Staphylococcus spp.*, Acred (1986) diseñó un modelo que consistía en la inoculación intramuscular profunda de 200 μ L de un cultivo bacteriano líquido en el muslo izquierdo de un ratón inmunocompetente, dejando el muslo derecho del animal como control. Por medio de un calibrador se medía el edema originado en el miembro infectado y se comparaba con el sano. Luego, demostró la utilidad de su modelo en ratón para evaluar la efectividad de la penicilina sódica y penicilina procaínica en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* (Selbie, 1954). El tratamiento lo inició 2 a 3 horas pos infección, porque el iniciar más rápidamente la administración del fármaco impedía que se expresara completamente la lesión (edema) en los ratones. Aunque la eficacia (disminución del edema) de las preparaciones de penicilina evaluadas no fue estadísticamente diferente, fue posible observar que la duración del efecto curativo del antibiótico dependía del tiempo total que el medicamento permanecía en la sangre a concentraciones efectivas y de la respuesta inmune del hospedero a la infección.

En la década de los 70s, Hunter *et al.*, (1978), Superaron la subjetividad de la medición del diámetro del muslo mediante el recuento de bacterias viables en el mismo después del tratamiento. De esta manera fue posible demostrar diferencias significativas en

la actividad bactericida entre la amoxicilina y la ampicilina contra *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, a pesar de la similitud de ambos medicamentos en sus concentraciones séricas y en su CIM.

Estos hallazgos demostraron que los datos in vitro no reflejaban el comportamiento in vivo, e impulsaron el modelo animal como una herramienta indispensable dentro del estudio de compuestos farmacológicos nuevos (Kunin, 1981).

6.4.2. EVALUACION DE RESULTADOS DE PAE “IN VITRO”

6.4.2.1. AZITROMICINA

Este antimicrobiano mostró valores de PAE de 1.87 y 2.30 horas para la cepa ATCC 29213 y cepas problema respectivamente, en CMH, lo cual concuerda plenamente, con lo reportado por Ferrara *et al.* (1996), quienes en su estudio comparativo de las expresiones de PAE de diferentes macrólidos y azálidos, reportaron un PAE de azitromicina frente a *S. aureus*, de 2.3 horas.

Otros trabajos como el presentado por Fursted *et al.*, en 1997, donde se realizó un estudio comparativo entre 6 diferentes macrólidos frente a *Streptococcus pneumoniae* reporta un PAE para azitromicina de 2.83 horas, siendo el más bajo de todos los macrólidos probados entre los cuales se contaba: roxitromicina, claritromicina, espiramicina, eritromicina y diritromicina.

En nuestro estudio comparativo entre azitromicina, danofloxacina y penicilina G, azitromicina, fue el antibacteriano que expresó el más largo PAE frente a *S. aureus*.

En leche, el PAE determinado para azitromicina, fue de 1.94 y 1.80 horas para la cepa ATCC 29213 y las cepas problema respectivamente; al igual que en los estudios de susceptibilidad por curva de muerte bacteriana, y en ausencia de estudios comparativos en esta matriz, observamos que no hay cambios significativos entre el PAE de azitromicina en CMH y el PAE en leche.

6.4.2.2. DANOFLOXACINA

Estudios acerca del PAE inducido por fluoroquinolonas, se han publicado varios, entre ellos destacamos los resultados reportados por Carbone *et al.*, (2001), Pastor *et al.*, (1993), Gottfredsson *et al.* (1991), McGrath *et al.* (1995). Los valores más representativos obtenidos por estos autores, están en el rango de los presentados por nosotros en este trabajo. Ya que reportaron para *S. aureus*, un PAE de entre 1.2 a 2.1 horas dependiendo de la concentración, lo que es similar a las 0.97 horas de nuestros resultados de las cepas problema en CMH y 2.11 horas para la cepa ATCC 25923 en la misma matriz.

El PAE de danofloxacin frente a *S. aureus* en leche fue de 0.97 y 1.14 horas para las cepas problema y ATCC 25923 respectivamente, al igual que para azitromicina, no hay estudios previos en leche, pero tal como lo muestran los resultados, no hay diferencias marcadas entre los valores obtenidos en esta matriz y los obtenidos en CMH; y en general concuerdan con lo reportado en la literatura (Carbone *et al.*, (2001), Pastor *et al.*, (1993), Gottfredsson *et al.* (1991), McGrath *et al.* (1995).

6.4.2.3. PENICILINA G

Los β -lactámicos son generalmente inductores de PAE en Gram-positivos. En este caso penicilina G, presentó un PAE *in vitro* de 1.27 y 0.42 horas para las cepas problema y ATCC 25923 respectivamente. Estos datos contrastan con lo reportado por Furst *et al.* (1997), en un estudio comparativo del efecto bactericida y PAE de penicilina G versus 6 macrólidos frente a *Streptococcus pneumoniae*. Ellos hallaron un PAE para penicilina de 2.33 horas, utilizando el método de dilución de la suspensión bacteriana 1/1000 para la retirada del antibacteriano, el cual también fue utilizado en nuestro estudio. Esta diferencia está determinada básicamente porque a pesar de haber sido utilizados por más de 60 años para el control de procesos infecciosos bacterianos, las penicilinas siguen siendo muy efectivas para el tratamiento de *Streptococcus* spp.

La literatura reporta que penicilina V o amoxicilina, siguen siendo el tratamiento de elección para erradicar el *Streptococo*, los macrólidos solo se recomiendan en caso de alergia a los antibióticos beta- lactámicos (Altamimi 2009).

No contamos en la actualidad con estudios que determinen el PAE de penicilina G frente a *S. aureus*, que nos permitan establecer comparaciones discutibles con nuestros resultados, pero en un estudio publicado en 2015 por Ahmad Ijaz *et al.*, en el que determinaron el PAE de cefquinoma frente a cepas de *S. aureus* causantes de septicemia en bovinos, encontraron un PAE de 0.6 horas luego de una exposición al antibacteriano por espacio de 2 horas a una concentración de 4 veces la CIM. Este estudio es el que más coincide con el nuestro en cuanto a concentración, tiempo de exposición y resultado obtenido.

6.4.3. EVALUACION DE RESULTADOS DE PAE “In Vivo”

6.4.3.1 DANOFLOXACINA

Este ensayo solo lo realizamos con danofloxacin, considerando que pertenece al grupo de antimicrobianos concentración dependientes con prolongada persistencia, a los efectos de corroborar lo hallado *in vitro*.

La determinación del PAE *In vivo* de danofloxacin frente a *S. aureus*, utilizando la metodología descrita por Craig en 1996, mostró una duración de 2.26 ± 0.48 horas, es decir presentó un efecto post antibiótico ligeramente más prolongado que el obtenido en los ensayos *In vitro*, tanto en CMH como en leche.

El tiempo en el cual las ufc/mL en los cultivos tratados aumentaron 1 log, a partir de la hora 4, hora en la cual las concentraciones séricas de danofloxacin descendieron por debajo de la CIM (T^1), correspondió a 9.16 ± 0.48 h, lo cual fue denominado T^{1b} , por lo tanto definimos T^2 como $T^{1b} - T^1$, a su vez, el cultivo control tardó 2.90 horas en incrementar 1 \log_{10} su número de ufc/mL a partir del tiempo 0 = C.

Algunos autores han reportado diferentes valores para PAE *in vivo* de fluoroquinolonas frente *S. aureus*, es así como Spreng *et al.* (1995), reportaron un PAE de 0.7 y 1.1 horas de marbofloxacin a 2xCIM y 4xCIM respectivamente frente a *S. aureus* aislados de felinos, lo cual difiere con nuestros resultados, debido básicamente a que en nuestro ensayo la concentración del antimicrobiano fue 10 veces la CIM y se ha reportado

que altas concentraciones del antimicrobiano con respecto a la CIM, contribuyen a aumentar el PAE (Deziel *et al.*, 2001).

Por otra parte, Fuentes (1994), reportó un PAE *In vivo* de ciprofloxacina frente a *S. aureus* en 3.5 horas en un modelo de muslo de ratón neutropénico tal como en nuestro caso y además obtuvieron un PAE *in vitro* de 2.88 horas, lo que igualmente confirma que en general los resultados *In vivo* son más prolongados que los encontrados *In vitro*.

La determinación del PAE *In vivo*, difiere de los resultados hallados *In vitro*, de hecho, el encontrar un prolongado PAE *In vitro* no asegura que este mismo efecto se vaya a presentar *In vivo* (Craig y Gudmundsson 1996). Por otro lado, generalmente el PAE *In vivo* es mucho más prolongado que el mismo efecto obtenido *in Vitro*. Se han reportado PAEs prolongados *In vitro*, pero no *In vivo* para penicilinas y cefalosporinas, frente a *Streptococcus* (Craig y Gudmundsson, 1996; Craig, 1993; Craig, 1998).

La importancia clínica del PAE, no se ha establecido claramente, pero en general, el tratamiento con un antibiótico puede beneficiarse de un largo PAE. De hecho, este último puede permitir que la concentración del antimicrobiano, pueda descender a valores por debajo de la CIM, por largos periodos de tiempo sin presentarse recrecimiento del microorganismo.

Es bien sabido que las quinolonas impiden la síntesis de ADN bacteriano mediante la inhibición de la ADN girasa, de ahí que el PAE inducido por estos antimicrobianos puede representar el tiempo requerido para que las fluoroquinolonas se puedan disociar de los sitios de unión del receptor y puedan difundirse fuera de la bacteria (Prescott y Walker, 2000).

La duración del PAE *In vivo* tiende a ser modificada por varios factores, como por ejemplo la concentración de antimicrobiano alcanzada en el sitio de infección, el tiempo de exposición al antimicrobiano, pH, tamaño del inóculo, y el medio en el cual se encuentra el antimicrobiano.

Las fluoroquinolonas presentan un gran efecto inhibidor postantibiotico tanto *In vitro* como *In vivo*, este prolongado efecto postantibiótico, lo ejercen tanto frente a bacterias Gram negativas como frente a algunas Gram positivas, lo cual permite la instauración de intervalos posológicos prolongados (Ingerman *et al.*, 1986; Vogelmann y Craig, 1986). En un

estudio publicado en 2012 por Díaz, quién evaluó el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos de diferentes edades y su relación PK-PD frente a mastitis estafilocócicas, comparó el efecto postantibiótico de fluoroquinolonas y aminoglucósidos, encontrando que las fluoroquinolonas expresan mayores valores de tiempo sobre la CIM y mayores reducciones en el crecimiento, que los aminoglucósidos, pero sin embargo los PAE presentados por fluoroquinolonas son sensiblemente menores.

Una explicación para este menor PAE y mayor efecto inhibitorio puede ser el probable cambio en la morfología de los microorganismos en su exposición a la fluoroquinolona. Lorian *et al.* (1985), demostró que bacterias expuestas a betalactámicos o quinolonas cambian su peso y morfología, los bacilos se convierten en filamentos y los cocos aumentan de tamaño, así mismo se ha comprobado que estas bacterias alteradas en su morfología son más susceptibles a los mecanismos bactericidas de los PMNs (Lorian *et al.*, 1985).

Por otra parte, durante la fase de PAE, se presenta una disminución de la actividad bactericida tras una nueva dosis de antimicrobiano (efecto refractario), esto debido a que durante la fase de PAE, los microorganismos son menos susceptibles a la actividad bactericida de ciertos antimicrobianos (Vogelman *et al.*, 1983). Con base en estos reportes, el grado de inhibición parece ser dependiente del microorganismo (más en bacilos Gram-negativos que en *S. aureus*) y del antimicrobiano (betalactámicos y trimetoprim más que aminoglucósidos). Aunque se necesitan más datos tanto de experimentos "*In vitro*" como "*In vivo*" que demuestren más eficazmente este efecto en los antimicrobianos estudiados, estas observaciones podrían tener su importancia en la dosificación de la terapia combinada.

Los resultados reportados en el presente estudio muestran un PAE significativo de danofloxacin contra *S. aureus*. Este efecto reviste gran importancia clínica para el uso de esta fluoroquinolona, puesto que podría ser administrada a intervalos ligeramente más largos sin perder eficacia en infecciones por *S. aureus*.

6.5 CAPTACION Y ACTIVIDAD DEL ANTIBACTERIANO A NIVEL INTRACELULAR

En general, el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* puede presentar complicaciones debido a las características físicas propias del patógeno, así como por las características del lugar de la infección y la ubicación del patógeno en el tejido, es decir si se encuentra a nivel intra o extra celular. Varios factores pueden ayudar a explicar la capacidad del *S. aureus* para evitar las acciones de los antibióticos. La formación de biopelículas podría ser la razón principal para el fracaso terapéutico, al igual que la presencia del patógeno a nivel intracelular, lo cual es una situación muy frecuente y teniendo en cuenta la imposibilidad y/o dificultad de algunas moléculas antimicrobianas para penetrar al interior celular, esta situación podría explicar fácilmente el fracaso terapéutico observado a lo largo de los tratamientos.

La capacidad de respuesta de los antimicrobianos también puede cambiar a nivel intracelular; en un estudio publicado en 2006, por Bambeke *et al.*, mencionan que la actividad antimicrobiana de algunas moléculas es a menudo mucho menor en comparación con la actividad a nivel extracelular.

Los primeros estudios usaron técnicas indirectas para valorar la penetración a nivel subcelular, si la reducción del número de microorganismos viables en el interior de las células era mayor en presencia de antibiótico que en su ausencia, deducían la penetración del antimicrobiano (Klempner, 1982; Peterson *et al.*, 1984). Este método es poco sensible, ya que la supervivencia de las bacterias no se correlaciona necesariamente con que el antibiótico no haya penetrado. Puede ocurrir que el antimicrobiano sea inactivado por el entorno intracelular, puede ser bacteriostático o bien puede que esté localizado en un orgánulo diferente a donde se alojan las bacterias. También la interpretación se complica por las posibles interacciones del antibiótico y el sistema bactericida celular, o puede que la muerte bacteriana sea independiente de la actividad antibiótica (Van der Auwera *et al.*, 1988; Barcia-Macay *et al.*, 2006).

Basados en esta evidencia y en la necesidad de plantear nuevos protocolos terapéuticos que tengan mayor eficacia en el control del *S. aureus* a nivel intracelular,

evaluamos la penetración, acumulación y actividad intracelular de azitromicina, danofloxacin y penicilina G en polimorfonucleares bovinos extraídos de sangre y leche.

6.5.1. Técnicas para determinar la penetración de los antibióticos en el interior celular

En los estudios de penetración intracelular se han utilizado diferentes métodos experimentales, es así como se han ido introduciendo técnicas capaces de cuantificar la cantidad de antibiótico que pasa al interior de las células mediante métodos microbiológicos, marcado radiactivo del antimicrobiano, fluorimetría o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cuantificación del antimicrobiano intracelular presenta los mismos inconvenientes con todos los métodos utilizados, ya que miden la cantidad total de antimicrobiano asociado a la célula, tanto a la fracción lipídica como a la proteica, sin diferenciar el antibiótico intracelular del unido a la superficie externa de la célula (Leca´Roz *et al.*, 2006). La duración de los procesos de lavado y centrifugado de las células, realizados para eliminar el antimicrobiano extracelular, tiene importancia para aquellas moléculas que penetran mediante un proceso de difusión, ya que parte del antibiótico intracelular puede salir al exterior (Brown y Percival 1978; Klempner, 1984).

El ensayo microbiológico, utilizado en nuestro caso para la cuantificación de azitromicina y penicilina G, mide el halo de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la suspensión de PMNs. Una vez que los PMNs han sido incubados con el antibiótico durante un cierto tiempo, son separados del líquido extracelular por centrifugación y lavado, y finalmente son lisados para liberar el antibiótico de su interior (Pemán *et al.*, 1991).

La técnica cromatográfica (HPLC), al principio requería de grandes volúmenes de células y altas concentraciones de antibiótico, por lo que pocas veces simulaba las concentraciones fisiológicas alcanzadas en el plasma (Koga., 1987). Sin embargo hoy en día con la sofisticación de los equipos analíticos y con la ayuda de metodologías de extracción líquido/líquido, o en fase sólida (Solid Phase Extraction –SPE-) acopladas a métodos de

concentración de las muestras, se ha transformado en la técnica de elección por su alta especificidad y sensibilidad (Yazar *et al.*, 2006).

6.5.1.1 AZITROMICINA

En el estudio encaminado a determinar las concentraciones intracelulares de azitromicina realizado por método microbiológico, técnica cilindro placa validada en nuestro laboratorio, obtuvimos para azitromicina, una concentración IC equivalente de 378.75µg/mL, luego de 5 horas de exposición de los PMNs al antimicrobiano. Esta concentración, corresponde a 461 veces la concentración EC, lo cual es compatible con lo reportado por Mandell y Coleman en 2001, quienes realizaron un estudio en similares condiciones a las nuestras y encontraron una acumulación IC de 517 veces con respecto a la concentración EC.

En otro estudio, Bosnar *et al.* (2005), evaluaron cinco diferentes antibióticos macrólidos (azitromicina, eritromicina, claritromicina, telitromicina y cefotrimicina) y compararon entre ellos la cinética de absorción y liberación en PMNs en tres líneas celulares diferentes. Llegaron a la conclusión, que azitromicina se concentró dentro de todas las células de la prueba, sin saturación durante un periodo de incubación de 3 h, con una mayor acumulación en líneas de células fagocíticas que en líneas celulares no fagocíticas.

Esta observación también se relaciona muy bien con los hallazgos publicados por Pascual *et al.* (1997), quienes compararon la absorción de azitromicina en PMNs humanos, macrófagos peritoneales, y dos líneas celulares no fagocíticas; hallando que los fagocitos maduros PMNs y las células RAW264.7 acumularon más azitromicina que las células no diferenciadas.

Hallazgos similares fueron reportados por Munic *et al.* (2002), con azitromicina en PMNs, sus precursores no diferenciados (HL-60 línea celular), y células HL-60 diferenciados hacia granulocitos.

El interés por el conocimiento de la localización subcelular del antibiótico está basado en la razón fundamental que los microorganismos intracelulares se localizan en diferentes

organelas (lisosoma, fagosoma, fagolisosoma o citosol). Si el antibacteriano no alcanza la misma estructura celular que la bacteria, nunca entrará en contacto con ella, y por lo tanto no la podrá atacar.

Azitromicina, como la mayoría de los macrólidos, tiene la capacidad de penetrar en los polimorfonucleares (PMN), monocitos, linfocitos y macrófagos alveolares, sitios en donde alcanza altas concentraciones (Lucas *et al.*, 2007).

De la misma forma, conocer la localización intracelular del antibiótico ayuda a explicar fenómenos como la acumulación (se sabe que la azitromicina se concentra en el interior de los lisosomas por atrapamiento iónico), de ahí que aunque su CIM a pH ácido aumente varias veces, ésta seguirá siendo teóricamente activa por las altas concentraciones que alcanza a nivel lisosomal (Orero *et al.*, 1998).

6.5.1.2. DANOFLOXACINA

Del arsenal terapéutico antibacteriano actual, las fluoroquinolonas son una importante herramienta, debido a su amplio espectro, la actividad altamente bactericida, y las propiedades farmacocinéticas favorables. Su buena distribución tisular les permite en general, alcanzar concentraciones terapéuticas en zonas de difícil acceso para otros antibacterianos.

Las fluoroquinolonas, como familia antibacteriana poseen en general, una gran capacidad de penetrar, acumularse y ser activas en el interior de los PMNs (Canton., *et al.* 1992). Siendo ésta una de las razones por las que son consideradas tratamiento de elección en infecciones que involucren patógenos de vida intracelular. El grado de penetración de las fluoroquinolonas depende de factores fisicoquímicos como la lipofilia, el pH o la energía de activación de la molécula, como así también de la presencia, en el medio, de sustancias que pudieran competir por los transportadores de membrana.

En el presente estudio evaluamos la penetración de danofloxacin en PMNs extraídos de sangre bovina. La cuantificación, fue realizada por cromatografía líquida de alta presión con detección por fluorescencia tras su extracción en fase líquida, siguiendo una

metodología analítica validada en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT) (Mestorino *et al.*, 2009). La penetración del antimicrobiano, alcanzó una relación IC/EC de 6.26 tras las primeras 5 horas de incubación, lo cual concuerda con lo reportado por Coralie *et al.*, (2011) para ciprofloxacina en PMNs humanos. No existen trabajos en donde se evalúe la capacidad de penetración intracelular de danofloxacina.

Valores similares de captación intracelular, también se han descrito para otras quinolonas, como el ofloxacino que presentó un cociente IC/EC máximo de 7.69 ± 0.88 , mientras que el de grepafloxacino alcanza un valor de 61.27 ± 3.04 . Así pues, estas quinolonas, presentan la misma cinética de penetración, pero las concentraciones intracelulares de grepafloxacino son diez veces superiores a las de ofloxacino (Orero *et al.*, 2002).

Esta diferencia en la magnitud de penetración entre las dos quinolonas puede deberse, en parte, a una serie de parámetros fisicoquímicos, ya que por ejemplo, la lipofilia de grepafloxacino es mayor que la de ofloxacino, lo cual le permite difundir más fácilmente a través de la membrana plasmática. Así mismo, también hay diferencias en las constantes de disociación, ya que las de grepafloxacino tienen un valor muy cercano, mientras que las de ofloxacino están más distanciadas. A pH 7.4 ambas quinolonas se encuentran mayoritariamente en forma de iones híbridos (zwitterion), que es como en mayor proporción atraviesan la membrana plasmática, ya que su carga neta es nula (Furet *et al.*, 1992).

En macrófagos alveolares humanos, se han determinado concentraciones de ciprofloxacino, moxifloxacino, y gemifloxacina, las cuales presentan cocientes IC/EC de 5.2, 20, y 90 Respectivamente (Al Nawas y Shah, 1998).

6.5.1.3. PENICILINA G

Cuando evaluamos la penetración IC de penicilina G al interior de los PMNs extraídos de sangre bovina, pudimos determinar una concentración equivalente de $1\mu\text{g/mL}$ a nivel IC versus $2.26\mu\text{g/mL}$ que fueron determinados a nivel EC, lo cual nos da una relación de 0.42/1, indicando una pobre penetración a nivel intracelular, comparado con los otros

antibacterianos objeto de este experimento, ya que azitromicina presentó una relación de 461/1 y danofloxacin 6.26/1.

Como documentamos en nuestra revisión bibliográfica, la literatura reporta que los β -lactámicos, tanto penicilinas como cefalosporinas, se acumulan de manera escasa en el interior de los fagocitos, esto básicamente porque aunque son plenamente capaces de atravesar la membrana plasmática, son incapaces de quedar retenidos en el interior celular (Jonson *et al.*, 1980; Turnidge, 1998).

Estructuralmente los betalactámicos poseen un grupo carboxílico libre, y por lo tanto se pueden considerar ácidos orgánicos. El pKa de este grupo se encuentra entre 3 y 5, de ahí que estas moléculas, si bien tienen la capacidad de penetrar al interior citoplasmático, son excluidas rápidamente del mismo, al ser éste más ácido que el medio extracelular (Delcour, 2009).

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Mandell y Coleman, quienes en 2001 desarrollaron un experimento con varios antibacterianos, incluyendo penicilina G, para evaluar la captación de los mismos en PMNs humanos. Ellos encontraron, al igual que nosotros y acorde al antecedente bibliográfico, una pobre acumulación de penicilina G en el interior celular, con una relación IC/EC de 0.16 versus una elevada concentración IC de azitromicina en la cual reportaron una relación IC/EC de 517.

6.6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ANTIMICROBIANOS A NIVEL INTRACELULAR

6.6.1. Acción de AZITROMICINA frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y leche bovina

Como bien pudimos apreciar, azitromicina presenta una muy buena capacidad de penetración a nivel intracelular, que para nuestro caso reportó valores de 462 veces más con respecto al medio extracelular, también, durante el desarrollo del proyecto pudimos observar que a medida que el pH se torna más ácido disminuye notablemente su eficacia, siendo 64 veces mayor su CIM a pH 5.0 que a al pH fisiológico 7.4.

Cuando expusimos los *S. aureus* fagocitados por PMNs con una dosis terapéutica de azitromicina, la cual por sus características PK/PD, se determinó en 5xCIM por espacio de 5 horas, los mismos sufrieron una reducción de 1.77 Log₁₀. Reducción que representa un efecto bacteriostático solamente, debido a que como vimos con anterioridad, un índice de actividad antibacteriana de -1.77 / -1.66 no logra el efecto bactericida deseado.

Estudios realizados por Seral *et al.*, 2003, encaminados a la cuantificación y evaluación de la actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* ATCC 25923, a nivel intracelular de 6 antibacterianos, incluido azitromicina, mostraron que azitromicina tuvo esencialmente un efecto bacteriostático a nivel intracelular, con una máxima disminución en el recuento de bacterias de aproximadamente 0.6 log a concentraciones de 10 veces su CIM o superiores.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Seral *et al.*, 2003 y corroboran la información que indica la acción bacteriostática de los macrólidos, ya que a la concentración terapéutica y aún teniendo en cuenta su alta concentración a nivel intracelular, no obtuvimos efecto bactericida tras 5 horas de exposición. En este caso deberían repetirse ensayos contemplando aumentar el tiempo de exposición y comparar diferentes concentraciones del agente antibacteriano. La evidencia de los estudios realizados en las curvas de letalidad a concentraciones varias veces por encima de la CIM, nos indican que azitromicina puede actuar como un agente bactericida dependiendo de su concentración, pero como ya se ha documentado, azitromicina a nivel intracelular, se ubica principalmente en los lisosomas, dentro de los cuales se concentran por atrapamiento iónico y teniendo en cuenta que solo la forma no ionizada es la única que posee actividad antibacteriana (Shryock *et al.*, 1998). Podemos inferir que las altas concentraciones de azitromicina a nivel intralisosomal no son garantía de actividad antibacteriana.

6.6.2. Acción de DANOFLOXACINA frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y de leche de vacas

La concentración de danofloxacina a nivel intracelular fue de 6 a 8 veces superior con respecto al medio extracelular; y a medida que el pH se torna más ácido, pierde eficacia antibacteriana, modificando su CIM₅₀ de 0.5 µg/mL a pH 7.4 a 1-2 µg/mL a pH 5.0. Según pautas PK/PD, es un antimicrobiano bactericida acción dependiente de la concentración, que frente a *S. aureus* mostró un PAE moderado, de 2.26 ± 0.48 h.

A pesar de ser un agente acción bactericida, tras una exposición de 5 horas a concentraciones de 10xCIM, los *S. aureus* intracelulares tratados con danofloxacina solo sufrieron una reducción de 1.72 Log₁₀ con relación al número inicial de bacterias fagocitadas, lo cual solo representa un efecto bacteriostático, presentando un índice de actividad antibacteriana a nivel IC frente a *S. aureus* de -1.72 / -1.12 log₁₀ y un % de eficacia de 97.80 y 87.91 % en los PMNs extraídos de sangre y de leche, respectivamente.

Durante décadas se alimentó la teoría que sugería que la acumulación intracelular de los antibacterianos, era un indicativo directamente proporcional a la actividad antibacteriana intracelular (Broek, 1991). Sin embargo, varios autores han ofrecido evidencia experimental comprobando que no existe una simple correlación directa entre la acumulación y la actividad de los antimicrobianos, tal como ocurre con las fluoroquinolonas (Paillard *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 1997). Esta falta o disminución de la expresión en la actividad antibacteriana en el medio intracelular es probablemente multifactorial, derivada de la concentración alcanzada a nivel intracelular, la tasa de absorción y localización subcelular, el pH del medio intracelular. Si bien la actividad de las fluoroquinolonas es menos afectada por el pH ácido, sí observamos una clara disminución en su eficacia antibacteriana cuando esta fue evaluada en condiciones de pH 5.0.

Los parámetros relacionados con los microorganismos también pueden ser críticos, de hecho pueden ser directamente responsables de la disminución en la acción intracelular de los antibacterianos, ya que la modulación del metabolismo bacteriano, que deriva en una tasa de multiplicación más lenta de bacterias intracelulares desempeña un papel importante

en la disminución de la actividad antibacteriana de los agentes bactericidas como las fluoroquinolonas (Eng *et al.*, 1991).

En nuestro caso particular pudimos observar una gran disminución de la actividad antibacteriana de danofloxacin frente a las mismas cepas de *S. aureus* cuando éstas se encontraban a nivel intracelular, en las cuales a pesar de haberse concentrado el antibacteriano 6 veces más que el medio extracelular solo se consiguió un efecto bacteriostático. Mientras que en las pruebas de sensibilidad realizadas en bacterias libres, encontramos efecto bactericida a concentraciones por encima de 2 veces la CIM, confirmando el efecto bactericida de las fluoroquinolonas, su actividad dependiente de la concentración y también las limitantes de este antibacteriano en tratamientos de patógenos de vida intracelular.

6.6.3. Acción de PENICILINA G frente a *Staphylococcus aureus* internalizados en PMNs extraídos de sangre y de leche de vacas

Las características físico-químicas de la penicilina G conllevan a una muy baja tasa de absorción celular, que para nuestro caso presentó una relación IC/EC escasa (0.44/1). Si bien a pH ácido, aumenta su eficacia, lo cual se ve reflejado en una sustancial reducción de su CIM₅₀, pasando de 0.125 µg/mL a pH 7.4, que sería el medio EC, a 0.066 µg/mL a pH 5.0 lo que coincidiría con el pH del medio IC de los fagolisosomas, donde habitualmente están alojados los *S. aureus*. Teniendo en cuenta las pautas PK/PD, penicilina G es un antimicrobiano bactericida acción dependiente del tiempo de contacto con escaso PAE.

Penicilina G a la dosis terapéutica, definida como 4 veces la CIM frente a los *S. aureus* intracelulares, solo produjo una reducción de 1.63 Log₁₀ con relación al número inicial de bacterias fagocitadas en los PMNs sanguíneos, y un efecto menor en los PMNs de origen mamario (-1.12 log₁₀). A pesar de ser un antimicrobiano de acción bactericida, en este ensayo solo logró un efecto bacteriostático, presentando un índice de actividad antibacteriana de -1.63 / -1.12 en los PMNs extraídos de sangre y leche respectivamente; lo

que concuerda con el efecto logrado a nivel extracelular, donde a pH 5.0 presentó efecto bacteriostático a concentraciones 1 x CIM y efecto bactericida solo a concentraciones superiores a 2 veces la CIM.

Los estudios hasta ahora publicados, han reportado una aparente concentración intracelular más baja que en el medio extracelular en equilibrio para todos los β -lactámicos, ya sea en células fagocíticas o células no fagocíticas (Carryn *et al.*, 2002). En general, se sabe que este tipo de moléculas difunden razonablemente bien a través membranas biológicas, pero los estudios de distribución de transmembrana de ácidos débiles muestran que la concentración total de tales sustancias es siempre más bajo en medio ácido que en compartimentos con características básicas o neutras (Wilkinson, 2001).

Teniendo en cuenta que las estructuras subcelulares son más ácidas que el medio extracelular, los β -lactámicos no se pueden acumular en el interior celular, aún cuando pueden pasar a través de membranas.

En concordancia con nuestros resultados, donde se muestra una pobre acumulación de penicilina G a nivel subcelular y una baja actividad antibacteriana, Chanteux *et al.*, (2003) obtuvieron una pobre actividad antibacteriana, con una reducción de solamente 0.5 log₁₀ de UFC frente a cepas de *L. monocytogenes* internalizadas en macrogafos J774, utilizando ampicilina y pivampicilina a dosis de 1.25 μ g/mL de ampicilina y 1.83 μ g/mL para pivampicilina, correspondiente en ambos casos a 10 veces la CIM determinada en el mismo estudio por un espacio de 5 horas. Sin embargo, resultados publicados por Carryn *et al.*, en 2003, muestran un resultado paradójico, puesto que a pesar que los β -lactámicos (ampicilina y meropenem) penetran en las células, pero no acumulan, es decir, su concentración celular es más baja que la extracelular son esencialmente bacteriostáticos contra *L. monocytogenes* en caldo, pero se convierten en bactericidas a nivel intracelular después de 24 horas de exposición.

En general, los β -lactámicos, tienen un mecanismo de acción predominantemente tiempo-dependiente, tal como quedo de manifiesto en los resultados de nuestros ensayos, lo cual significa que su actividad bactericida es máxima a concentraciones 4 veces sobre la CIM, no aumentando su eficacia a concentraciones mayores. Con lo cual la máxima eficacia de estas moléculas está asociada a la obtención de tiempos prolongados de contacto.

Dicho de otra forma, el objetivo farmacodinámico al utilizar estas familias de antimicrobianos es por lo tanto lograr tiempos sobre la CIM ($T > CIM$) prolongados, lo que también se asocia a mayores AUC/CIM (Onyeji et al., 1994). En general, con este tipo de moléculas, se recomienda y está justificado el uso de dosis fraccionadas ajustadas a la vida media de cada antibacteriano, con el fin de mantener en el tiempo, las concentraciones terapéuticas.

6.7. CINÉTICA INTRACELULAR DE LOS ANTIBACTERIANOS Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

6.7.1. AZITROMICINA

Azitromicina al igual que la mayoría de los macrólidos, posee debido a sus características físico químicas la capacidad de penetrar y acumularse en el interior de diferentes tipos celulares, especialmente en células del sistema fagocítico, donde alcanzan concentraciones varias veces superiores a las concentraciones extracelulares (Gómez-Lus. et al., 2005). En nuestro caso, fue ampliamente captada por los PMNs, sin sufrir saturación durante las primeras 5 horas de incubación en donde la relación IC/EC fue de 467. La mayor parte del antibacteriano se acumula en los fagolisosomas probablemente porque en medio ácido, la azitromicina y en general los macrólidos por su carácter básico sufren una protonación, debido a lo cual, la azitromicina, no posee buena difusión a través de la membrana lipídica y queda atrapada en el fagolisosoma.

Si bien azitromicina posee una muy buena capacidad de penetración y acumulación intracelular, cabe resaltar que la actividad intracelular de la mayoría de los macrólidos es escasa (Carryn et al., 2003; Van Bambeke, 2014). Esta condición parece estar asociada a varios factores entre los que se encuentran, la inactivación debida al pH ácido del fagolisosoma donde se concentran en mayor medida los macrólidos (Pemán et al., 1991), esta condición ha sido evidente en nuestro trabajo al reportar aumento en 64 veces o más el valor de la CIM de azitromicina a pH 5.0 con relación al pH 7.4.

Por otro lado, Mtairag *et al.*, (1995), reportaron para roxitromicina, la posible capacidad de inhibir la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno en los PMNs, lo cual altera considerablemente la actividad antibacteriana. Sin embargo, estudios más recientes (Carryn *et al.*, 2003; Van Bambeke, 2014), aseguran que los nuevos macrólidos como la azitromicina sí presentan actividad intracelular *in vivo* frente a *S. aureus*. Lo cual contrasta con nuestros resultados al observar la pobre actividad intracelular de azitromicina, donde el índice de actividad antibacteriana (*E*) máximo alcanzado fue -1.70, a las 4 horas de contacto, no lográndose en ningún caso, una reducción de $\geq -3 \text{ Log}_{10}$ de las ufc/mL lo cual consideraríamos como efecto antibacteriano bactericida.

En las CLB, realizadas en CMH-pH 5, azitromicina logró efecto bactericida solo a concentraciones que se sitúan en el orden de 4 veces la CIM, lo cual no ocurrió a nivel intracelular aún cuando las concentraciones fueron mucho más elevadas con respecto al medio EC, lo que nos indica que factores intracelulares anteriormente descritos como la concentración y grado de ionización, la densidad microbiana, la fase de proliferación y la susceptibilidad de la cepa involucrada, influyen claramente en la actividad intracelular de azitromicina (Mulazimoglu. *et al* 2005).

Si bien la familia de los macrólidos se caracteriza por ser antimicrobianos tiempo dependientes, la azitromicina posee un perfil farmacocinético particular y un prolongado efecto de segunda exposición (Biskri y Mazel, 2003). Su actividad se correlaciona mejor con la relación ABC_{24hs}/CIM que con el $T > CIM$, ya que a diferencia de los otros macrólidos presenta un marcado PAE *in vivo* (Van Bambeke y Tulkens, 2001).

Por ello, realizamos un análisis no compartimental de los datos de concentración equivalente a nivel intracelular en el cual calculamos el predictor de eficacia ABC_{0-24h}/CIM , encontrando que los valores de este parámetro no fueron lo suficientemente altos para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular, llegando solo a 78.82 con un DE de 0.87, cuando la relación adecuada compatible con una respuesta clínica y microbiológica adecuada debería ser mayor a 125.

6.7.2. DANOFLOXACINA

De las fluoroquinolonas se sabe que tienen buena capacidad de penetración celular y se acumulan en las células eucariotas a concentraciones en promedio 10 veces más con respecto al medio extracelular (García *et al.*, 2000). Acerca del mecanismo de acumulación de este tipo de moléculas aún no hay una explicación clara, se ha identificado una vía de transporte específica en PMNs para ciprofloxacina, junto con un transportador de aminoácidos activado por el acetato de forbol miristato, ésta demanda también podría ser regulada por la activación de la proteína quinasa C (Carryn *et al.*, 2003).

Las fluoroquinolonas a nivel intracelular se localizan generalmente en el citosol, pero probablemente sean capaces de difundir en menor medida a los diferentes compartimentos subcelulares como lo hacen a través de los diversos órganos del cuerpo (Carryn *et al.*, 2003).

En nuestros estudios a nivel intracelular encontramos que danofloxacina se acumuló entre 6 y 8 veces con respecto al medio extracelular, lo cual concuerda con la observación de García *et al.* (2000). Hacia las 6 h de incubación la relación IC/EC presentó su mayor nivel, llegando a valores de 8.08, pero a partir de ese momento, predomina el eflujo de la molécula.

Si bien los niveles IC de danofloxacina se ubicaron en valores de más de 10 veces la CIM calculada en esta tesis para *S. aureus*, no se logró efecto bactericida en el ambiente intracelular, alcanzando solo una disminución de 1.98 log₁₀ de las UFC/mL, observándose recrecimiento bacteriano a partir de las 6 horas de incubación.

La evidente disminución de la expresión en la actividad antibacteriana en el medio intracelular encontrada en este estudio, vs las pruebas de sensibilidad realizadas en bacterias libres, donde hubo un evidente efecto bactericida a concentraciones por encima de 2 veces la CIM, es probablemente como se comentó con antelación de carácter multifactorial; derivada en especial por la tasa de absorción, la localización subcelular (generalmente a nivel citosólico), el pH del medio intracelular, por lo cual observamos una clara disminución en su eficacia antibacteriana.

Igualmente las condiciones que se relacionan directamente con el microorganismo, son también limitantes en la actividad antibacteriana a nivel intracelular y, pueden estar directamente relacionadas con la disminución de la actividad intracelular de los antibacterianos y el posible fracaso terapéutico, entre ellos, podemos destacar, la modulación del metabolismo bacteriano, que deriva en una tasa de multiplicación menor y por tanto en una disminución de la actividad antibacterina de los agentes bactericidas como las fluoroquinolonas (Eng., *et al* 1991).

Habiendo confirmado el efecto bactericida de las fluoroquinolonas a nivel extracelular, su actividad dependiente de la concentración, así como también las limitantes de este antibacteriano en tratamientos de patógenos de vida intracelular, realizamos un análisis no compartimental de los datos de concentración equivalente a nivel intracelular donde calculamos los predictores de eficacia C_{max}/CIM y ABC_{0-24h}/CIM .

El predictor de eficacia C_{max}/CIM , es el indicado para valorar la eficacia de antibacterianos acción dependiente de la concentración, como es el caso de las fluoroquinolonas (Craig 1998). Con base en este parámetro, tasas superiores o iguales a 10 se han correlacionado con eficacia en el tratamiento de bacteriemia por *P. aeruginosa* tratada con tobramicina (Zelenitsky et al., 2003); de la misma forma, se ha obtenido buena correlación en el tratamiento de bacteriemia por *P. aeruginosa* tratada con ciprofloxacino cuando la tasa C_{max}/CIM alcanzada era superior o igual a 8 (Soriano y Ponte 2009).

Un modelo *In vivo* en ratones infectados experimentalmente con *Streptococo pneumoniae* y tratados con ciprofloxacina, reportado por Sullivan et al. (1993), indicó que la relación de la concentración C_{max}/CIM tenía que alcanzar un valor de 10,6 para alcanzar una optima actividad bactericida.

El Cociente del ABC/CIM también se correlaciona con la actividad bactericida de antibacterianos concentración dependiente (Craig 1998). Existen datos clínicos que sugieren la necesidad de obtener cocientes del ABC/CIM superiores o iguales a 125.

Estudios *in vitro* en animales de experimentación, sugieren que las tasas ABC/CIM de 100–120 parecen asociarse a una disminución en el riesgo de selección de mutantes resistentes a las fluoroquinolonas (Ambrose y Grasela, 2000). La obtención de cocientes

óptimos no sólo se correlaciona con eficacia terapéutica, sino con un menor riesgo de selección de mutantes resistentes y disminución de la toxicidad (Drusano et al 2007).

Si bien en nuestro experimento los predictores de eficacia, fueron alcanzados, ($C_{max}/CIM \geq 10$ y $ABC_{0-24h}/CIM \geq 125$), estos valores no fueron suficientes para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular, con lo cual nos queda claro que la acumulación a nivel intracelular de los antibacterianos no es predictivo de actividad a nivel intracelular.

6.7.3. PENICILINA G

La evaluación de la acumulación de penicilina G, demostró que ésta molécula presentó una escasa acumulación a nivel intracelular (0.51) con respecto al medio extracelular. Se ha documentado que tanto las penicilinas como las cefalosporinas, se acumulan de manera escasa en el interior de los fagocitos, aunque ello no significa que sean incapaces de atravesar la membrana plasmática (muchos compuestos tienen lipofilia suficiente para difundir a través de la bicapa lipídica) sino que son incapaces de quedar retenidos en el interior celular debido a su PKa (Jonson *et al.*, 1980; Turnidge, 1998).

A las 4 horas de incubación la relación IC/EC fue la mayor, siendo ésta de 0.51, pero a partir de ese momento comenzó a predominar el eflujo, no obstante, los niveles intracelulares de penicilina G se mantuvieron varias veces por arriba de la CIM calculada en esta tesis para *S. aureus* a este nivel (0.066 µg/mL).

Mandell y Coleman, en 2001, encontraron al igual que nosotros y acorde al antecedente bibliográfico, una pobre acumulación de penicilina G en el interior celular con una relación IC/EC de 0.16, en un estudio realizado en PMNs humanos. Del mismo modo, Hugues et al., en 2003 en un estudio encaminado a evaluar la acumulación y actividad intracelular de ampicilina y pivampicilina frente a *L. monocytogenes* en macrófagos J774, encontraron una pobre acumulación de ampicilina libre obteniéndose una relación IC/EC menor a 1.

Al evaluar la actividad de penicilina G a nivel IC frente a *S. aureus*, encontramos que a pesar de ser un antimicrobiano acción bactericida, no se logró este efecto en el ambiente intracelular, ya que el Log ufc/mL cayó solamente 0.87 veces, evidenciándose recrecimiento del inóculo bacteriano.

Del mismo modo Barcia *et al.*, (2006) reportaron una pobre actividad intracelular de penicilina V frente a *S. aureus* en un modelo de macrófagos J774, encontrando una disminución de menos 1 log₁₀ en el conteo de UFC/mL, vs el medio extracelular donde se evidenció efecto bactericida, tal como ocurrió en nuestros estudios de CLB, donde hallamos efecto bactericida a pH 5.0 en las concentraciones por arriba de 2 veces la CIM.

Paradójicamente Carryn *et al.*, en 2003, reportaron que a pesar que los β- lactámicos (ampicilina y meropenem) penetran en las células, pero no acumulan, se convierten en bactericidas a nivel intracelular después de 24 horas de exposición contra *L. monocytogenes*, de igual forma Van den Broek *et al.*, (1986) reportaron que en monocitos humanos penicilina G fue de dos a siete veces más potente sobre *S. aureus* intracelulares, que el efecto sobre los microorganismos no fagocitados.

Los antimicrobianos que actúan sobre la pared celular como β-lactámicos, poseen un mecanismo de acción predominantemente tiempo-dependiente, es decir la actividad bactericida se presenta con una Cmax 4 veces sobre la CIM y no aumenta con concentraciones mayores, lo cual pudimos hacer evidente en nuestras CLB, de ahí que la máxima eficacia se asocia a la obtención de tiempos prolongados de concentración del antibacteriano 4 veces sobre la CIM. El objetivo farmacodinámico al utilizar estas familias de antimicrobianos es por lo tanto lograr tiempos sobre la CIM (T > CIM) prolongados.

Tras el análisis no compartimental de los perfiles intracelulares, encontramos que durante las 24 h de incubación, las concentraciones intracelulares se mantuvieron por arriba de la CIM calculada en esta tesis para el pH 5, pero evidentemente no fue suficiente para lograr la erradicación del *S. aureus* a nivel intracelular.

Probablemente el fracaso en la actividad antibacteriana a nivel IC de penicilina G, se deba a que el principio general (4 veces sobre la CIM) para antibacterianos activos sobre la pared celular aplica cuando se trata de bacterias muy sensibles y/o de inóculos bacterianos

bajos; sin embargo, frente a inóculos altos, la C_{max} adquiere importancia y la actividad bactericida máxima puede no alcanzarse aún con $C_{m\acute{a}x}/CIM$ de 128 veces (Onyeji *et al.*, 1994).

Lo anterior pone nuevamente de manifiesto, que penicilina G al igual que para los antibacterianos anteriormente evaluados, la acumulación a nivel intracelular y cumplir con las condiciones estimadas en su predictor de eficacia, no es garantía de actividad a nivel intracelular, debido básicamente a que la actividad antibacteriana no está sujeta a una sola condición, sino que es el resultado de una serie de características que incluyen: las características PK/PD de la molécula, las características propias del microorganismo y el medio en el cual se reúnen estos elementos.

7. CONCLUSIONES

El uso irracional de los antimicrobianos se puede combatir mediante la implementación de esquemas terapéuticos racionales basado en los siguientes aspectos:

1. *Perfil microbiológico de la mastitis.* El diagnóstico clínico y de laboratorio (aislamiento, tipificación y antibiograma) es uno de los pilares fundamentales del uso racional de los agentes antimicrobianos, pero no el único como hemos demostrado en esta tesis.

2. *Farmacocinética/Farmacodinamia de antibióticos en animales productores de leche portadores de mastitis.* La comprensión de la relación de los parámetros farmacocinéticos con los parámetros farmacodinámicos, PK/PD, en estos animales redundará en un aumento de la eficacia antimicrobiana y en una disminución de la selección de cepas resistentes, aspectos fundamentales que hacen al éxito de la terapia. Y fundamentalmente nos permitirá seleccionar aquellos agentes antimicrobianos capaces de alcanzar al agente causal en un sistema biológico tan complejo como la glándula mamaria en general y el sistema subcelular en particular.

3. *Diseño de formulaciones y de regímenes terapéuticos más eficaces y seguros.* El desarrollo de nuevos medicamentos debe involucrar más que el descubrimiento de una nueva sustancia, el aprovechamiento integral de sus efectos sobre el organismo, se debe considerar como se transporta la molécula al sitio apropiado, y una vez allí lograr que esté disponible para su uso y sea eficaz.

El *S. aureus* es un patógeno extremadamente complejo que posee variados factores de virulencia, los cuales dificultan enormemente la acción de los antimicrobianos, por tanto y teniendo en cuenta la importancia epidemiológica y económica a nivel mundial de las infecciones intramamarias causadas por este patógeno, pensamos que será más eficaz el control sanitario, derivado del adecuado manejo consuetudinario en los tambos lecheros, buenas prácticas de ordeño, alocación y alimentación más que tratamientos antibacterianos realizados sin fundamento microbiológico.

La terapia de la mastitis bovina, debe plantearse y realizarse, teniendo en cuenta, la interacción PK/PD de los antimicrobianos de acuerdo a las características de la glándula mamaria (pH, composición electrolítica, concentración de grasas, de proteínas y de leucocitos) entre otros y no solamente teniendo en cuenta los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad, que por demás, generalmente han sido establecidos con base en las concentraciones de antimicrobianos determinadas en plasma.

El *S. aureus* en el interior de la glándula mamaria y más aún en el interior de los PMNs, sufre grandes cambios anatomofisiológicos, que a su vez modifican su relación con los antimicrobianos, por tanto no podemos tomar los resultados de los antibiogramas, como garantía de eficacia para los tratamientos de mastitis.

El efecto que surte el pH ácido del medio intracelular, en el caso de azitromicina, es netamente deletéreo de la actividad antibacteriana, por otro lado, esta molécula posee la capacidad de penetrar en los polimorfonucleares (PMN), monocitos, linfocitos y macrófagos alveolares, concentrándose varios cientos de veces dentro de los mismos, lo cual nos llevaría a pensar que podría perfilarse como una buena alternativa terapéutica en casos de mastitis bovina causada por patógenos de vida intracelular, pero debido a que solo la fracción de la droga libre es activa y la acumulación de azitromicina se produce por atrapamiento iónico, las grandes cantidades del ATB retenido, no necesariamente tienen actividad.

La restauración de la susceptibilidad del *S. aureus* a la penicilina en medio ácido, nos pone de manifiesto nuevamente a esta molécula, como una alternativa interesante en el tratamiento en infecciones bacterianas de localización intracelular, siempre que podamos desarrollar la tecnología necesaria para retener inalterado el ATB en el interior celular.

Aunque las pruebas de susceptibilidad realizadas en bacterias libres, muestran que danofloxacin posee efecto bactericida a concentraciones por encima de 2 veces la CIM, a nivel intracelular no pudimos corroborar este efecto, debido en parte al efecto negativo que tiene el pH ácido en la actividad de las fluoroquinolonas.

Ninguno de los antimicrobianos ensayados fue capaz de lograr a nivel intracelular la concentración y/o el tiempo de contacto adecuado para atacar con la suficiente eficacia al *S. aureus* según pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas establecidas para ellos, lo cual

significaría que si se continúan utilizando estos antimicrobianos para el tratamiento de las mastitis subclínicas por *S. aureus* sin considerar los aspectos enunciados en este trabajo, solamente estaremos favoreciendo la cronicidad de la enfermedad, la selección de cepas resistentes y su eventual diseminación al medio ambiente, al hombre y a otras especies animales; y fundamentalmente malgastando valiosas herramientas terapéuticas.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Abdelghaffar, H., Vazifeh, D., Labro, M.T. Cellular uptake of two fluoroketolides, HMR 3562 and HMR 3787, by human polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2798-2806.
2. Acred P., The Selbie or thigh lesion test. En: Zak O, Sande MA, editors. *Experimental models in antimicrobial chemotherapy*, 1sted. London: Academic Press; 1986. p. 109-20.
3. Aeschlimann JR, Hershberg E, Rybak MJ. Análisis of vancomycin population susceptibility profiles, killing activity, and postantibiotic effect against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1914-1918.
4. Ahmad I, Hao H, Huang L, Sanders P, Wang X, Chen D, Tao Y, Xie S, Xiuhua K, Li J, Dan W and Yuan Z. Integration of PK/PD for dose optimization of Cefquinome against *Staphylococcus aureus* causing septicemia in cattle. *Front. Microbiol.* 2015. 6:588. doi: 10.3389/fmicb.2015.00588
5. Akaike, h. An Information Criterion (AIC). *Mathematical Science.* (1976). 14, 5-9.
6. Altamimi, S., A. Khalil, et al. (2009). «Short versus standard duration antibiotic therapy for acute streptococcal pharyngitis in children». *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD004872.
7. Ambrose PG, Grasela DM. The use of Monte Carlo simulation to examine pharmacodynamic variance of drugs: Fluoroquinolone pharmacodynamics against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 38:151-7.
8. Ambrose, P., Bhavnani, S., Rubino, C., Lovie, A., Gumbo, T., Forrest, A. and Drusano, G. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic of antimicrobial therapy: Its not just for mice anymore. *Clin Infect Dis* 2004; 44:79-86
9. Anderson, R., Joone, G., Van Rensburg, C.E.J. An in-vitro investigation of the intracellular bioactivity of amoxicillin, clindamycin and erythromycin for *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1986; 153: 593-600.
10. Andes D, Craig W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect Dis Clin N Am* 1998; 112:849-860.
11. Anon, G. (1980) Progress in mastitis control (1977) in 23 countries. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Document 121.
12. Andrade. M.A, Dias. F, F.C.; Mesquista. A.J, Rocha. P.T. 2000. Sensibilidade "in vitro" de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.53-57.
13. Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *J. Dairy Sci.* 2012. 85:1370-1375.
14. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.
15. Azul tripán (C.I. 23850) para microscopia. Hoja informativa sobre el producto comercial. Merck.
16. Baggot, JD. *Principios de Farmacología Clínica Veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 1977.

17. Barcia Macay, Maritza; Seral, Cristina; Mingeot-Leclercq, Marie-Paule; Tulkens, Paul M.; Van Bambeke, Françoise. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 50, no. 3, p. 841-851 (2006).
18. Bauer AA, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45:493-496.
19. Barragry, T.B. Veterinary Drug Therapy. Philadelphia (PA): Lea & Febiger, 1994.
20. Bean, R.C., Shepherd, W.C., Chan, H. *Permeability of lipid bilayer membranes to organic solutes*. J Gen Physiol 1968; 52: 495-508.
21. Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution and elimination. En: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PF, Ruddon RW, editores. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. USA: McGraw-Hill; 1996. p. 3-28.
22. Betancourt, O, Scarpa, C. y Villagran, K. 2003. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. Revista Científica FCV-LUZ 13 (5): 413-417.
23. Betriu. Carmen, Gomez Maria, Sanchez Ana, Cruceyra Antonio, Romero Jose and Picazo Juan. 1994. Resistance and Penicillin Tolerance in Clinical Isolates of Group B Streptococci. Antimicrob Agents and Chemother p. 2183-2186 Vol. 38, No. 9 0066-4804/94/\$04.00+0 Copyright X 1994, American Society for Microbiology Antibiotic
24. Bergey, David H.; John G. Holt; Noel R. Krieg; Peter H.A. Sneath. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1994. (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.
25. Bhavsar, S. K. and A. M. Thaker (2012). Pharmacokinetics of Antimicrobials in Food Producing Animals, Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications, Dr. Ayman Noreddin (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/33787. Available from: <http://www.intechopen.com/books/readings-in-advanced-pharmacokinetics-theory-methods-and-applications/pharmacokinetics-of-antimicrobials-in-food-producing-animals>
26. Blackwell Prokesch, R.C., Hand, W.L. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. Antimicrob Agents Chemother 1982; 21: 373-380.
27. Biesenkamp-Uhe, C. Li., Hehnen, H. R., Sachse, K. y Kaltenboeck, B., Therapeutic *Chlamydia abortus* and *C. pecorum*. Vaccination Transiently Reduces Bovine Mastitis Associated with *Chlamydia* Infection. Infection and Immunity: 2007. 75 (2), 870-877.
28. Bigger, J.W. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. Ir J Med Sci 1944; 227: 533-568.
29. Bochniarz M, Wawron W, Szczubial M. Resistance to methicillin of coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from bovine mastitis. Pol J Vet Sci. 2013;16 (4):687-92.
30. Bonventre, P.F., Imhoff, J.G. *Uptake of ³H-dihydrostreptomycin by macrophages in culture*. Infect Immun 1970; 2: 86-93.
31. Boothe D.M. The analgesic-antiinflammatory drugs. In: Adams H.R. editor. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 7th ed. Ames (IO): Iowa State University Press, 1995: 432-449.

32. Boswell FJ, Andrews JM, Wise R, Dalhoff A. Bactericidal properties of moxifloxacin and post-antibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:43-49.
33. Baroni, E. Russi, N. Rubio, M; Picco, E. Formentini, E. 2014. Actividad antibacteriana in vitro de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*. *InVet*, 16 (1): 7-14. ISSN 1514-6634 (impreso) ISSN 1668-3498 (en línea).
34. Bramley. A.J. and Dodd, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control - progress and prospects. *J. Dairy Res.* 1984; 51:481-512.
35. Brown, K.N., Percival, A. *Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes.* *Scand J Infect Dis* 1978; 14 (Suppl.): S251-S260.
36. Brown SA. Fluorquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 1996; 19: 1-14.
37. Bundtzen, R.W., Gerber, A.U., Cohn, D.L., Craig, W.A. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981; 3 (1): 28-37.
38. Calvinho, L. F. y L. Tirante. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE Sección Cs. Vet.* 2005; 4:29-40.
39. Calvinho, L. F. 2004 Jornada Internacional de Calidad de Leche y Mastitis. Organizada por APROCAL. Facultad de Ciencias Veterinarias, "Mastitis en Argentina: evolución en los últimos diez años y perspectivas futuras".
40. Calvinho, L. F. "Mastitis bovina". En: Curso de postgrado de Especialistas en Producción Lechera. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Litoral. 2012 Pp. 25.
41. Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿necesidad clínica o ejercicio intelectual? *Enf Infec Microbiol Clin*, 20 (2002), pp. 176-86.
42. Cao, C.X., Silverstein, S.C., Neu, H.C., Steinberg, T.H. *J774 macrophages secrete antibiotics via organic anion transporters.* *J Infect Dis* 1992; 165: 322-328.
43. Carlier, M.B., Scorneaux, B., Tulkens, P.M. *Uptake and subcellular localization of sparfloxacin (AT-4140, RP-64206;S) in phagocytic cells.* 30th Interscience Conference of Antimicrob Agents and Chemother, Atlanta 1990; Abstr. 1243.
44. Carlier, M.B., Scorneaux, B., Zenebergh, A., Desnottes, J.F., Tulkens, P.M. *Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages.* *J Antimicrob Chemother* 1990; 26 (Suppl. B): S27-S39.
45. Carlier, M.B., Zenebergh, A., Tulkens, P.M. *Cellular uptake and subcellular distribution of roxithromycin and erythromycin in phagocytic cells.* *J Antimicrob Chemother* 1987; 20 (Suppl. B): S47-S56.
46. Carrillo Raúl Esper, Miriam Zavaleta Bustos, Haidee Álvarez Alcántara, Dulce María Carrillo Córdova, Carlos Alberto Carrillo Córdova. 2013. The importance of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters in antibiotic prescription. *Rev. Fac. Med. (Méx.)* vol.56 no.3 México may./jun.
47. Carryn S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2095–103.

48. Chavez, C. Javier. *Curso: Sistemas de Produccion Lechera de ARGENTINA Y CUBA. Calidad de leche y mastitis bovina 2009*. Facultad de ciencias Veterinarias UBA.
49. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, Jabbouri S. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296: 381-388.
50. Clarke SR; Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* 2006; 51: 187-225.
51. Coetzer, J.A.W.; Thomson, G.R.; Tustin, R.C. *Infectious diseases of livestock*. 1994; vol 2:1564-1595.
52. Corbellini, C.N. Actualización de la patogenia y diagnóstico de mastitis. *Memorias del Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. Río Cuarto.* 1996; p. 37-48.
53. Cordero, L. Mastitis bovina como factor negativo de la productividad [en línea]. Universidad Nacional de Costa Rica (1999).
54. Corvaisier, S., Mairie, P.H., Bouvier d'Yvoire, M.Y., Barbaut, X., Bleyzac, N. and Jelliffe, R.W. Comparisons Between Antimicrobial Pharmacodynamic Indices and Bacterial Killing as Described by Using the Zhi Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. July, 1998; 1731-1737.
55. Costa, E.O. *et al.* Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. *Rev Napgama*. v.2, p.16-20, 1999.
56. Cowan, S.T. & Steel, K.J. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge, University Press. 1965.
57. Craig WA. Does the dose matter? *Clin Infect Dis* 2001; 33:S233-S237.
58. Craig WA, Gudmundsson S. Postantibiotic effect. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, infected with *H. influenzae* was only 15%–20% [41]. *These* 1996:296–329.
59. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1-12.
60. Craig, N. L. 2002. "Tn7," in *Mobile DNA II*, eds. N. Craig, R. Craigie, M. Gellet, and A. M. Lambowitz (Washington: ASM Press), 432–456
61. Craven, N. Efficacy and financial value of antibiotic treatment of bovine clinical mastitis during lactation. A review. *Br. Vet. J.*, 1997; 143:410-422.
62. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 2888-2896.
63. Cucarella CM, Tormo A, Ubeda C, Trotonda MP, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2004; 72: 2177-2185.
64. D'Argenio & Schumitzky (2003) ADAPT II, Software, Biomedical Simulations Resource (BMSR).
65. David, N.A. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1972; 12:353-374.
66. De Boer, A.J. Socio-economic aspects of dairying in developing countries. *Journal of Dairy Science*. 1981; 64:2453-2463.

67. Delcour AH. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. May; 1794(5):808-16.
68. Díaz D. Diego Carlos. 2012. Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacina en bovinos de diferentes edades y relación PK-PD frente a mastitis estafilocócicas. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de toxicología y farmacología.
69. Dingwell, R.T., Leslie, K.E., Duffield, T.F., Schukken, Y.H., Des-Coteaux, L., Keefe, G.P., Kelton, D.F., Lissemore, K.D., Shewfelt, W., Dick, P., Bagg, R., 2003. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. *J. Dairy Sci.* 86, 159–168.
70. Djabri, B., Barielle, N., Beaudeau, F., Seegers, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 2002; 33:335-357.
71. Dobbins, C.N. Mastitis losses. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1977; 170:1129-1132.
72. Dodd, F.H.; Griffin, T.K. & Kingwill, R.G. Proceeding of the IDF Seminar on Mastitis Control 1975. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 1975; Document 85.
73. Dodd, F.H. Mastitis Therapy. The role of therapy in mastitis control. In: *International Mastitis Symposium*, MacDonald College, Ste Anne de Bellevue Quebec, Canada, 1987 pp 161-175.
74. Drugeon, H. B., Le Gallou, F. & Caillon, J. 1990. Methodes d'etude de l'activite bactericide. In *Bactiricidie, Aspects Theoriques et Therapeutiques* pp. 113-26. Maloine, Paris.
75. Drusano GL, Ambrose PG, Bhavnani SM, Bertino JS, Nafziger AN, Louie A. Back to the future: Using aminoglycosides again and how to dose them optimally. *Clin Infect Dis.* 2007;45:753–60.
76. Du Preez, J.H. Antibioteresiduo en melk. *Veterinary Clinical.* August 1980; 9-10.
77. Dubois. J, Fernandes. P. In Vitro Activity of CEM-101 Against Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. Cempra Pharmaceuticals Inc., Chapel Hill, NC Revised Abstract Objective Discussion ICAAC 2009.
78. EMEA Committee for Veterinary Medicinal Products: Note for guidance for the determination of withdrawal periods for milk. 1998; EMEA/CVMP/473/98.
79. Eng, R. H., F. T. Padberg, S. M. Smith, E. N. Tan, and C. E. Cherubin. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991. 35:1824–1828.
80. Errecalde J. El uso racional de los antimicrobianos en explotaciones lecheras. *Jornadas de Actualización en Lechería.* Lincoln, Buenos Aires, Argentina. (1994b).
81. Errecalde J. El control de puntos críticos en el tambo: Una alternativa viable en nuestro medio? Segundo Curso de Actualización Profesional Fisiopatología de la Lactancia y Calidad de Leche. Universidad Nacional de La Plata, INTA y CREA. (2000a). Pp 99-105.
82. Errecalde J. La elección del medicamento de calidad. Libro de resúmenes de las XIV Jornadas Ganaderas de Pergamino, Buenos Aires. Argentina. (2003). Pp. 72-76.
83. Errecalde, J.O. Antimicrobianos en leche. Su importancia en salud pública. Boletín Técnico presentado por Boehringer Ingelheim S.A. (1996).
84. Erskine, R.J. Empleo de Fármacos antimicrobianos en la mastitis bovina. *Terapéutica.* (2002).

85. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens during a Seven-Year Period. *J Dairy Sci* 2002; 85:1111-1118.
86. Fang, W. and Vikerpur, M. 1995. Potency of antibacterial drug in milk as analyze by BGloconidase- Based Fluorometry, *J. Vet. Pharmacol. Ter.*, Vol 18 (6) 422- 428.
87. Ferraro, L.; Scaramelli, A.M. y Troya, H.R. Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de California para mastitis. *Memorias del Congreso Panamericano de Control de la Mastitis y Calidad de la Leche*. Mérida, Yucatán, México. 1998. p. 46.
88. Foulds, G., R. M. Shepard, and R. B. Johnson. 1990. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *J. Antimicrob. Chemother.* 25 (Suppl. A):73-82. [PubMed].
89. Fuentes, F., M. M. Martin, J. Izquierdo, M. L. Gomez-Lus, and J. Prieto. In vivo and in vitro pharmacodynamic effects of meropenem. *Scand. J. Infect. Dis.* 1995; 27:469–474.
90. Fuentes Martínez Fernando. Estudio “in vitro” e “in vivo” de diversos parámetros farmacodinámicos de meropenem y ciprofloxacino con *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* 1994. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología III BIBLIOTECA UCM
91. Furet, Y.X. Deshusses, J., Pechère, J.C. *Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone-susceptible Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2506-2511.
92. Fustes, E.; Avila, C. y Ortega, L. Mastitis Bovina: Efecto sobre la producción lechera y la economía agropecuaria en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 1985; 7:91-100.
93. García Rodríguez, J.A., Cantón, R., García Sánchez, J.E., Gómez-Lus, M.L., Martínez Martínez, L., Rodríguez-Avial, C. y Vila, J. Métodos Especiales para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. En Juan J. Picazo Editor. 2001.
94. García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánches JE, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. (2000) Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.
95. Gasque, R. y Blanco, M.A. Mastitis bovina [cd-room]. En su: *Zootecnia en bovinos productores de leche* [Ciudad México]: UNAM. 2001. p. 155-171.
96. Giannechini, R, Concha C, Delucci I , Gil J , Salvarrey L, Rivero R. (2014). Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay. *Revista de la Sociedad de medicina Veterinaria de Uruguay*, vol 50 (196): 4-32
97. Gieseck H.W. The definition of bovine mastitis and the diagnosis of its subclinical types during normal lactation. *Proceedings of the IDF seminar of mastitis control*. Reading University collage of state management Reading England 1975.
98. Giesecke, W.D. Bovine mastitis. Dept. Agric. Tech. Serv. Rep. S. Africa, Technical Comunic. 1979; 51:1-37.
99. Giesecke, W.H. Bovine mastitis. Science Bulletin, N°401. Pretoria: Department of Agriculture. 1983.
100. Giesecke, W.H. The diagnosis and control of bovine mastitis as a means of improving the quality of milk. *South African Journal of Dairy Technology*, 1985; 17:3-21.

101. Gilson, W. Interpreting and using mastitis screening test [en línea]. University of Georgia College of Agricultural & Environmental Sciences. Bulletin 913 (1995).
102. Gómez-Lus ML, Calvo A, Bouza E, Prieto J. (2005) Quimioterapia antiinfecciosa y antitumoral: Antibióticos y quimioterápicos. Generalidades. En: Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA (eds): Velásquez Farmacología básica y clínica (20ª Ed) Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 825-839.
103. Gómez J, Bonillo C, Ruiz J. 2013. Bases para optimizar el uso de antibióticos en la Clínica Práctica. En (Gómez J, Gobernado M. Eds) Enfoque Clínico de los Grandes Síndromes Infecciosos. Madrid. Ergón Ed. 5ª edición 2013: 689-702.
104. Gottfredsson, M., Erlendsdottir, H., Gudmundsson, S. Quantitation of postantibiotic effect by measuring CO₂ generation of bacteria with the BACTEC blood culture-system. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35 (12): 2658-2661.
105. Gudmundsson, S., B. Vogelman, and W. A. Craig. The in vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986; 18(Suppl. E):67-73.
106. Gottfredsson, M., Erlendsdottir, H., Gudmundsson, A., Gudmundsson, S. Ultrastructural alterations of *P. aeruginosa* and *S. aureus* during the postantibiotic effect (PAE) phase. *ICAAC* 1991; Abstr. 934.
107. Gould, I.M., Jason, A.C., Milne, K. Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to study the postantibiotic effect of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 523-531.
108. Gutman, G., E. Guiguet y J. Rebolini. Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. 2003. www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Estudio_lacteo.pdf Pp. 267.
109. Gregoriadis, G. Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems, *Trends in Biotechnology*, 1995, 13: 527-537.
110. Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot, and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50:245-259.
111. Halasa, T., K. Huijps and H. Hogeveen. *Bovine mastitis, a review. Vet Q.* 2007. 29: 18-31.
112. Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. y Hogeveen, H. Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quaterly.* 2007; 29 (1): 18-31.
113. Hanberger, H., Nilsson, L.E., Kihlstrom, E., Maller, R. Postantibiotic effect of b-lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 33 (1): 102-106.
114. Hand, W.L. Antibiotics and phagocytic cells. *Antimicrob Newsletter* 1988; 5: 53-60.
115. Hand, W.L., Boozer, R.M., King-Thompson, N.L. Antibiotic uptake by alveolar macrophages of smokers. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 42-45.
116. Hand, W.L., King-Thompson, N.L. Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 135-140.
117. Hans Andresen S. Mastitis: prevención y control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2001.

118. Hartman. B. J. and Tomasz J. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol. May*; 158(2): 513–516. PMID: PMC215458
119. Hebert, A.; Sayasith, K.; Senechal, S.; Dubreuil, P. and Lagace, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 193(1):57-62.
120. Heesch, W.; Suhren, G. & Hahn, G. Mastitis: Significance for processing of milk and public health aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1985; 37:233-243.
121. Hooper. D.C. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32, S9-S15
122. Heslen, M. T., P. G. Pitsakis, and M. E. Levison. Absence of postantibiotic effect in experimental *Pseudomonas* endocarditis treated with imipenem, with or without gentamicin. *J. Infect. Dis.* 1988; 158:542–548.
123. Hunter PA, Rolinson GN, Witting DA. Comparative activity of amoxicillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; 4:285-93.
124. Hugues Chanteux¹, Marie-Paule, Mingeot-Leclercq, Etienne Sonveaux, Françoise Van Bambeke and Paul M. Tulkens. Intracellular accumulation and activity of ampicillin used as free drug and as its phthalimidomethyl or pivaloyloxymethyl ester (pivampicillin) against *Listeria monocytogenes* in J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 52, 610–615.
125. Hyatt, J.M., McKinnon, P.S., Zimmer, G.S. and Schentag, J.J. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. *Clinical Pharmacokinetic Concepts*, 1995; 28, 143-160.
126. Illini DairyNet. University of Illinois (2000). Urbana-Champaign.
127. Isaksson B., Nilsson L., Maller R., Sorén L. Postantibiotic effect of aminoglycoside on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1988; 22: 23-33.
128. Iskandar I, Walters JD. 2011. Clarithromycin accumulation by phagocytes and its effect on killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*; 82:497–504.
129. Izak, E., and S. Ackermann. Prevalence and incidence of clinical mastitis at early lactation in dairy farms with low bulk tank somatic cell count in Argentina. *Proc. 49th Annual Meeting of the National Mastitis Council*, 2010; pp 266-267.
130. Jacobs MR. Building in efficacy: developing solutions to combat drug-resistant *S. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:18-27.
131. Johnson, J D., Hand, W. L., Francis, J.B., King-Thompson, N., Corwin, R.W. Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J Lab Clin Med* 1980; 35: 429-439.
132. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers, HF. 1996 Fármacos antimicrobianos: Tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y diversos antibacterianos. En: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds): *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Vol II (9ª Ed) México, Ed. McGraw-Hill Interamericana, p. 1205-1211.
133. Khan, IU, Hassan, A A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science.* 2003; 4(3): 213-24.

- 134.** Keith D. DeDonder, Ronette Gehring, Ronald E. Baynes, Lisa A. Tell, Thomas W. Vickroy, Michael D. Apley, and Jim E. Riviere. 2013. Effects of new sampling protocols on procaine penicillin G withdrawal intervals for cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, November 15, 2013, Vol. 243, No. 10, Pages 1408-1412. (doi: 10.2460/javma.243.10.1408).
- 135.** Kerr, D. E., Plaut, K., Bramley, A. J., Williamson, C. M., Lax, A. J., Moore, K. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against *staphylococcal* infection in transgenic mice. *Nature Biotechnology*. 2001; 19:66-70.
- 136.** Klempner, M.S. Antibiotic penetration into phagocytes. A determinant of therapeutic efficacy? *Drug Ther* 1982; 12: 44-53.
- 137.** Klempner, M.S. *White cells*. En: Ristuccia, A.M., Cunha, B.A. (Eds.). *Antimicrobial therapy*. Raven Press, New York 1984; 513-517.
- 138.** Klostermann, K, Crispie, F. Flynn, J., Meaney, W., Ross, R. Paul and Hill, C. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*, 2010; 77, pp 231-238.
- 139.** Knudsen JD, Frimodt-Møller N, Espersen F. 1995. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of in vitro and in vivo activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1253–1258.
- 140.** Koga, H. High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1904-1908.
- 141.** Kunin CM. Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. *Rev Infect Dis* 1981; 3:4-11.
- 142.** Kurt Fursted, Jenny Dahlknudsen, Mette Barendorff Petersen, Rikke Lykke Poulsen, and Dorte Rehm. Comparative Study of Bactericidal Activities, Postantibiotic Effects, and Effects on Bacterial Virulence of Penicillin G and Six Macrolides against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, Apr. 1997, p. 781–784.
- 143.** Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Hakim, J. Influence of subinhibitory concentrations of ceftriaxone on opsonization and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by human neutrophils. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 341-352.
- 144.** Larriestra. Alejandro. Claudina Vissio. 2012. *Producir XXI*, Bs. As., 20(249):28-32. Proyecto PICTO 30368/05. Grupo Responsable: Liliana Odierno, Cristina Bogni, Jose Giraudo, Alejandro Larriestra. FCEQyN y FAV, UNRC. 0358-4676508.
- 145.** Laufen, H., Wildfeuer, A. Kinetics of the uptake of antimicrobials agents by human polymorphonuclear leucocytes. *Arzneim Forsch* 1989; 39: 233-235.
- 146.** Larrea, D. Caracterización y eficiencia de la producción lechera en el noreste de la pampa Argentina. (2011) Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba (España).
- 147.** Lebreton, J.D. & Miller, C. *Modèles Dynamiques Déterministes en Biologie*. Masson, Paris, 1982; 54-56.

148. Lees P. and May S.A. Inflammation and antiinflammatory drugs. In: Andrews A.H. Blowey, R.W. and Boyd H. Bovine Medicine. Diseases and Husbandry of Cattle. Oxford (UK) Blackwell Scientific Pub. 1992: 843-863.
149. Lizarraga M.I. y Sumano L.H. Farmacología clínica de los antihistamínicos en medicina veterinaria. *Veterinaria México* 29 (4) 369- 383 (1998).
150. Loo, K.C., Cario, A.C., Zhang, F., Walters, J.D. Regulation of ciprofloxacin uptake in human promyelocytic leukemia cells and polymorphonuclear leukocytes. *J Leukocyte Biol* 1997; 61: 619-623.
151. Loor, J.J.; Jones, G.M. y Bailey, T.L. Aspectos básicos sobre el desarrollo de mastitis (1999). [en línea]. Instituto y Universidad Politécnica de Virginia. Blacksburg.
152. Lopez-Benavides, MG., Williamson, JH., Pullinger, GD., Lacy-Hulbert, SJ., Cursons, RT., Leigh, JA. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *Journal of Dairy Science* 2007; 90(12): 5558-66.
153. Lorian 14 1985. Low concentration of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 15 (Supp. A): 15-26.
154. Lorian E, Tosch IV, Joyce D. 1985. Weight and morphology of bacteria exposed to antibiotics. pp: 65-72. Pie influence of antibiotics on the host-parasite 11, ed. Adam D., Hahn H., Opferkuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
155. Lucas, M. 2009. Alternativas terapéuticas para el manejo racional de la mastitis subclínica por *Staphylococcus aureus*. Tesis doctoral. Catedra de farmacología farmacotecnia y terapéutica. UNLP.
156. Lucas. M. F, Errecalde. J. O. and Mestorino. N. 2010. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33: 132–140. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01128.x
157. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother*, 48 (2001), pp. 17-28
158. Magoffin, R.L., Spink, W.W. 1951. The protection of intracellular *Brucella* against streptomycin alone and in combination with other antibiotics. *J Lab Clin Med*; 37: 924-929.
159. Mandell, G.L. Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics. *J Clin Invest* 1973; 52: 1673-1679.
160. Mandell, G.L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J Clin Invest* 1975; 55: 561-566.
161. Mandell, G.L., Coleman, E. Uptake, transport and delivery of antimicrobial agents by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1794-1798.
162. Mandell, G.L, Petri, W.A. Antimicrobial agents. in: J.G Hardman, L.E Limbird, P.B Molinoff (Eds.) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. McMillan Co, New York; 2001:1073–1098.
163. Martínez, Elsa. Utilización de métodos de diagnóstico simplificados para estimar la situación de mastitis bovina en los rebaños. La Habana. 115 h. Tesis (en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias)-- CENSA. 1984.

164. Marshall AJ, Piddock LJ. 1994. Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *J Antimicrob Chemother.* Oct; 34(4):465-83.
165. Mastitis Council Homepage (1997b).
166. Mattie H. (1981) Kinetics of Antimicrobial Action. *Rev. Infect. Dis.* 3, 19-27.
167. Mattie, T., Dokkum, A.M., van Brus-Weijer, L., Krul, A.M. and Strijen, E. Antibacterial Activity of Four Cephalosporins in an Experimental Infection in Relation to *in vitro* Effect and Pharmacokinetics. *J. Infect. Dis.* 1990 ; 162, 717-722.
168. Mattie, H., L.-C. Zhang, E. van Strigen, B. R. Sekin, and A. E. A. Douwes-Idema. 1997. Pharmacokinetic and pharmacodynamic models of the anti staphylococcal effects of meropenem and cloxacillin in vitro and in experimental infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2083-2088.
169. Mazzei T, Novelli A. How macrolide pharmacodynamics affect bacterial killing. *Infect Med.* 1999. 16:22-28.
170. Mc Dowell, R.E. Limitations for dairy production in developing countries. *Journal of Dairy Science*, 1981; 64:2463-2474.
171. McDonald, P. J., W. A. Craig, and C. M. Kunin. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 1977; 135:217–223.
172. McKinnon P, Davis S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *Eur J Clin Infect Dis* 2004; 23: 271-88.
173. Mediavilla A, J Florez y J García-Lobo. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En: Florez J, Armijo J y Mediavilla A (eds.). *Farmacología humana*. Tercera edición. Editorial Masson. Barcelona, España. 1997. Pp 1062-1066.
174. Meglia, G.E.; Mata, H.T. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con relación a la glandula mamaria de los bovinos productores de leche. *Producción Bovinos para Leche*. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., Gral. Pico, La Pampa., gmeiglia@ciudad.com.ar.
175. Menezes Ferreira. L. *et al.* Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* aisladas em casos de mastite subclínica bovina. *Ciência Rural*. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), v. 36, n. 4, p. 1228-1234, 2006. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/11449/29344>>.
176. Mestorino N. Control de residuos químicos en animales productores de leche. *Primeras Jornadas Técnicas de Ciencia y tecnología de Carnes y Alimentos*. Montevideo, Uruguay. 2001.
177. Mestorino, N. Estudio Farmacocinético del Tianfenicol en vacas lecheras Holando Argentino. Tesis Doctoral, FCV - UNLP. 1993.
178. Mestorino, N and Errecalde Jorge O. (2012). Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Considerations for Bovine Mastitis Treatment, *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*, Dr. Carlos C. Perez-Marin (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/31721. Available from: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/pharmacokinetic-pharmacodynamic-considerations-for-bovine-mastitis-treatment>

- 179.** Minguez, F., J. Izquierdo, M. M. Martin, F. Fuentes, and J. Prieto. In vivo postantibiotic effect of isepamicin and other aminoglycosides in a thigh infection model in neutropenic mice. *Chemotherapy* 1992; 38:179–184.
- 180.** Moise P, Forrest A, Bhavnani S, Birmingham M, Schentag J. Area under the inhibitory curve and a pneumonia scoring system for predicting outcomes of vancomycin therapy for respiratory infections by *Staphylococcus aureus*. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57 (Suppl 2): 4-9.
- 181.** Molski, T.F.P., Naccache, P.H., Volpi, M., Wolpert, L.M., Sha'afi, R.I. *Specific modulation of the intracellular pH of rabbit neutrophils by chemotactic factors*. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 94: 508-514.
- 182.** Moore, G.A., and Heider, L.E. 1984. Treatment of mastitis. *Vet. Clin. of North America. Large An. Prac.*, 6:323-333.
- 183.** Morin, D.E. and Hurley, W.L. Mastitis. Lesson B. [en línea]. *Lactation Biology. ANSCI 308. University of Illinois (1994). Urbana-Champaign.*
- 184.** Moulder, J.W. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 1985; 49: 298-337.
- 185.** Mouton. Johan. W, Michael N. Dudley, Otto Cars, Hartmut Derendorf, and George L. Drusano. 2005. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.* (May 2005) 55 (5): 601-607.
- 186.** Mozeris. Bases para el plan estratégico de la cadena láctea Argentina 2008-2020. Informe de Avance. Disponible en: [http://www.lacteos2020.org.ar /docs/Documento %20PEL%20 Final.pdf](http://www.lacteos2020.org.ar/docs/Documento%20PEL%20Final.pdf).
- 187.** Mtairag, E.M., Abdelghaffar, H., Douhet, C., Labro, M.T. Role of extracellular calcium in vitro uptake and intraphagocytic location of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1676-1682.
- 188.** Mulazimoglu L, Tulkens PM, Van Bambeke F. Macrolides. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C and Morse GD (eds), *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volume II: Antimicrobial Agents (2nd Ed)* Pittsburg, ESun Technologies, p. 2005. 243-280.
- 189.** Muñoz R, De La Campa AG. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Oct;40(10):2252-7.
- 190.** National Mastitis Council. 1995. Mastitis Control in Dairy Herds. *Cap.* 9:229-277.
- 191.** National Mastitis Council. 1997 A practical look at environmental mastitis National.
- 192.** Nash, D. L, Rogers, G. W., Cooper, J. B, Hargrove, G. L, Keown, J. F. Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score, Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. *J Dairy Sci.* 2003; 86:2684-2695.
- 193.** National Committee for clinical laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; *Approved Standard NCCLS Document M31-A The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, P.A. USA. (1999a)*

194. National Committee for clinical laboratory Standards Development of *in vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; *Approved Standard NCCLS Document M37-A The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, P.A. USA. (1999b).*
195. National Committee for clinical laboratory Standards. Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. USA: NCCLS, Wayne P.A.; 2000.
196. National Committee for clinical laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests - Approved standard - document M2-A7. USA: NCCLS, Wayne P.A.; 2000.
197. National Committee for clinical laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Approved standard - document M31-A2 2 ed. USA: NCCLS. 2002.
198. Nazar, JC. Biofilms bacterianos REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Rev. Otorrinolaringol. Cir Cabeza Cuello 2007; 67: 61-72.
199. Nguyen, H. A., J. Grellet, D. Paillard, V. Dubois, C. Quentin, and M. C. Saux. 2006. Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: a study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:883-890
200. Nielsen, S. L., N. Obel, M. Storgaard, and P. L. Andersen. The effect of quinolones on the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* in neutrophil granulocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997. 39:617–622.
201. Nickerson, S.C. (1998). Estrategias para controlar la mastitis. Memorias del congreso panamericano de control de mastitis y calidad de la leche. Mérida Yucatán, México.
202. Neerman, R., Keller, N., Barziali, A., Korenman, Z., Sela, S. *Prevalence of internalisation-associated gene, prtF1, among persisting group-A Streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers.* *Lancet* 1998; 352: 1974-1977.
203. Nikaido, H., Thanassi, D.G. 1993. *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples.* *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 1393-1399.
204. Noguera, E. La mejor manera de controlar la mastitis bovina [en línea]. FONAIAP-CIAE. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Venezuela (1999).
205. Novelli A, Fallan S, Cassette MI, Arriguicci S, Mazzei T. In vivo pharmacodynamic evaluation of clarithromycin in comparison to erythromycin. *J Chemother* 2002; 14:584-590.
206. Odenholt, I., Holm, S. E., Cars, O. Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 147-156.
207. Odenholt, I., S. E. Holm, and O. Cars. Effects of supra and sub-MIC benzylpenicillin concentrations on group A b-haemolytic streptococci during the postantibiotic phase in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990; 26:193–201.
208. Odenholt-Tornqvist, I., E. Löfdin, and O. Cars. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39:221–226.
209. O'Gara, JP, Humphreys H, *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50: 582-587.

- 210.** Okada, N., Tatsuno, I., Hanski, E., Caparon, M., Sasakawa, C. *Streptococcus pyogenes* protein F promotes invasion of HeLa cells. *Microbiology* 1998; 144: 3079-3086.
- 211.** Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 2006; 118: 133-140.
- 212.** Onyeji C, Nicolau D, Nightingale C, Quintiliani R. Optimal times above MICs of ceftibuten and cefaclor in experimental intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1112-17.
- 213.** Otero, J.L.; Mestorino, O.N.; Errecalde, J.O. (2001). Enrofloxacin: Una Fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, Mecanismo de acción, Actividad Antimicrobiana y Resistencia Bacteriana. *Analecta Veterinaria* 21 (1): 31-41.
- 214.** Otero, J.L.; Mestorino, O.N.; Errecalde, J.O. (2001). Enrofloxacin: Una Fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: Farmacocinética y Toxicidad. *Analecta Veterinaria* 21 (1): 42-49.
- 215.** Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322: 207- 228.
- 216.** Owens WE. Mastitis therapy: rationale for new routes and regimens of treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. *Dairy, Food and Environmental Sanitation.* 1991, 11: 11, 654-655.
- 217.** Owens. W.E, C.H. Ray, J.L. Watts, R.J. Yancey. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis *J. Dairy Sci,* 80 (1997), pp. 313–317
- 218.** Paillard, D., J. Grellet, V. Dubois, M. C. Saux, and C. Quentin. Discrepancy between uptake and intracellular activity of moxifloxacin in a *Staphylococcus aureus*-human THP-1 monocytic cell model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. 46:288–293.
- 219.** Pascual, A., García, I., Conejo, M.C., Perea, E.J. *Fluorometric and High-Performance Liquid Chromatographic measurement of quinolone uptake by human neutrophils.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 969-971.
- 220.** Pascual, A., García, I., Perea, E.J. *Fluorometric measurement of ofloxacin uptake by human polymorphonuclear leukocytes.* *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 653-656.
- 221.** Pascual, A., García, I., Perea, E.J. *Uptake and intracellular activity of an optically active ofloxacin isomer in human neutrophils and tissue culture cells.* *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 277-280.
- 222.** Pastor, A., Cantón, E., Gobernado, M. Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5 (3): 201-210.
- 223.** Pellegrino, M.S, frola, I.D., Odierno, L.M. y Bognia, C.I. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus Martínez et al. 72 aureus* aisladas de leche. *REDVET Rev. Electrón. Vet.* (2011). 12 (7). Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711/071110.pdf>.
- 224.** Pemán, J., Cantón, E., Ramón, M.S., Jiménez, T., Gobernado, M. *Penetración y actividad de los antimicrobianos en el interior de los fagocitos.* *Rev Esp Quimioterap* 1991; 4: 27-36.

225. Pedersen, M., T. L. Benfield, P. Skinhoj, and A. G. Jensen. Haematogenous *Staphylococcus aureus* meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases. BMC Infect. Dis. 2006; 6:49.
226. Peterson, L.R., Vanetta, L.L., Fasching, C.E., Gerding, D.N. *Effect of protein binding on stimulated intravascular and extravascular kinetics of cefotaxime in an in vitro model.* Antimicrob Agents Chemother 1984; 25: 58-61.
227. Philpot, W.N. and Nickerson, S.C. Mastitis: El contraataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Publicado por Babson Bros. Co. 1993.
228. Ping Li, Juan Li, ChangzhuWu, QingshengWu, and Jian Li. 2005. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. Nanotechnology, 16:1912–1917.
229. Poutrel, B. and Rainard, P. Predicting the Probability of quarter Infection (by major pathogens) from Somatic Cell Concentrations. Am. J. Vet. Res. 1982; 43:1296.
230. Poiata, A, Tuchilus. C. Comparative In vitro activity of azithromycin and other antimicrobial agents against Staphylococci isolates. Analele tiinifice ale Universitii „Alexandru Ioan Cuza”, Seciunea Genetic i Biologie Molecular, TOM XII, 2011
231. Preston S L, Drusano G L, Berman A L et al. Pharmacodinamics of levofloxacin: A new paradigm for all clinical trials. JAMA 1998; 279: 125-9.
232. Prescott, J.F. and J.D. Baggot (1988). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.
233. Prescott J.F., J.D. Baggott and R.D., Walker. *Terapeutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria.* Editorial Intermédica. 2002. Pg. 613-642.
234. Pyörälä Satu, Suvi Taponen, 2009 Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens.
235. Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. Irish Veterinary Journal, 62(Suppl 4), S40–S44. <http://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S40>
236. Ramadan, M.A., Tawfik, A.F., Shibl, A.M. Impact of post-antibiotic effect (PAE) of new macrolides on adherence, PMP functions and production of haemolysin by streptococcal species. 33th Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy 1993; Abstr. 656.
237. Rato, MG., Bexiga, R., Nunes, SF., Cavaco, LM., Vilela, CL., Santos-Sanches, I. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science* 2008; 91(12): 4542-51.
238. Rebuck J, Fish D, Abraham E. Pharmacokinetics of intravenous and oral levofloxacin in critically ill adults in a medical intensive care unit. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 1216-25.
239. Reinoso, R.F., Lanao, J.M., Lorente, F., López, F.G., Domínguez-Gil, A. *Uptake of antibiotics by phagocytic cells: Study methods and therapeutic implications.* Rev Esp Quimioterap 1995; 8: 100-108.
240. Renard, C., Vanderhaeghe, H.J., Claes, P.J., Zenebergh, A., Tulkens, P.M. *Influence of conversion of penicillin G into a basic derivative on its accumulation and subcellular localization in cultured macrophages.* Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 410-416.
241. Renard, L. Modélisation de la Relation Pharmacocinetique-Pharmacodynamique en Antibiotherapie Vétérinaire. *Thèse de l'Université de Limoges. Faculté de Pharmacie.* 1994.

242. Renard, L., Sanders, P., Laurentie, M. And Delmas, J.M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for spiramycin in staphylococcal mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1996; 19, 95-103.
243. Reymond, F., Carrupt, P.A., Testa, B., Girault, H.H. *Charge and delocalisation effects on the lipophilicity of protonable drugs*. *Chem Eur J* 1999; 5: 39-47.
244. Riviere J.E. *Comparative Pharmacokinetics. Principles, techniques and applications*. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 1999.
245. Ribeiro M.G., A.C. Paes, F.J.P. Listoni (2006) Minimal inhibitory concentration of azithromycin in *Rhodococcus equi* strains isolated from foals. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.6, p.1244-1246
246. Romero, A. T. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. 2004; México D. F. pp.122-134.
247. Ronald CL. Review: New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13:229-235.
248. Ruiz. Jhon D. Nicolás F. Ramírez 1 ; Ofelia Arroyave. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Cienc Pec Vol. 14: 2*, 2001 143.
249. Russi, N. 2008. Susceptibilidad de antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. Tesis para optar el título de Magíster Scientiae en Ciencias Veterinarias, Mención Salud Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Litoral. Esperanza, Argentina.
250. Bhavsar. S. K. and A. M. Thaker (2012). Pharmacokinetics of Antimicrobials in Food Producing Animals, Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications, Dr. Ayman Noreddin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0533-6, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/readings-in-advanced-pharmacokinetics-theory-methods-and-applications/pharmacokinetics-of-antimicrobials-in-food-producing-animals>
251. Sanchez, M.S., Ford, C.W. and Yancey, R.J. Effect of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and antibiotics on the killing of intracellular *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 1994; 77:1251-1258.
252. San Martín, B., Morales, M.A., Agüero, H., León, B., Espinoza, S., Iragüen, D., Puga, J. y Boire, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región Metropolitana y Xa Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 34 (2): 221-234
253. Saran A; Ziv G; Glikman A; Israeli Y; Luxembourg D; Saran A (ed.); Soback S The efficacy of an antibiotic preparation [Vetipen DC, nafcillin, benzylpenicillin and dihydrostreptomycin] for the treatment and prevention of subclinical bovine mastitis during the non-lactating period and antibiotic persistence in milk and various organs after calving. *Proceedings of the Third IDF International Mastitis Seminar Tel Aviv, Israel, 28 May – 1 June 1995. Book 2. 1995, s-5,134-135.*
254. Saran, A., y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires. pp. 14-16, 31-42.
255. Sarasola P, Lees P, AliAbadi FS, McKellar QA, Donachie W, Marr KA, Sunderland SJ & Rowan TG. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46** (9), 3013-3019. doi:10.1128/AAC.46.9.3013-3019.2002

256. Sarvaiya J.G.; Bhavsar S.K.; Mody S.K.; Thaker A.M. and Tripathi R.M. (2006). Multiple dose pharmacokinetics and safety of Ciprofloxacin in Buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Toxicology*, Vol. 5, No 1& 2, (December 2006), pp.15-18, ISSN 0972-8872.
257. Schentag. J. J. 1999. Antimicrobial action and pharmacokinetics/pharmacodynamics: the use of AUC to improve efficacy and avoid resistance. *J Chemother. Dec*; 11(6): 426–439.
258. Scorneaux, B. and Shryock T. R. Intracellular Accumulation, Subcellular Distribution, and Efflux of Tilmicosin in Chicken Phagocytes *Poultry Science* 1998; 77:1510-1521.
259. Selbie FR. Comparison of sodium and procaine penicillin in treatment of experimental staphylococcal infection in mice. *Br Med J* 1954;4875:1350-3.
260. Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. 2003. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2283-2292. (PDF) (UCL only - Copyright owned by the publisher)
261. Shryock TR, Mortensen JE, Baumholtz M. The effects of macrolides on the expression of bacterial virulence mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:505-512.
262. Shah, P.M., Huebner, K.G., Stille, W. In vitro untersuchungen zur intermittierenden therapie mit penicillin G und ampicilin. *Med Welt* 1978; 29: 888-892.
263. Smith, K.L. and Hogan, J.S. The world of mastitis [en línea]. Proceedings of the 2 International Symposium on Mastitis and Milk Quality. p.1. NMC Homepage (2001).
264. Solberg, C.O. *Protection of phagocytized bacteria against antibiotics. A new method for the evaluation of neutrophil granulocyte functions.* *Acta Med Scand* 1972; 191: 383-389.
265. Soriano Garcia F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010. doi:10.1016/j.eimc.2010. 02.005.
266. Soriano, F. (2002). Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20(8):407-12.
267. Soriano F, Ponte C. Comments on: Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 1301.
268. Sumano, L.H. 1995. *Farmacología clínica en bovinos.* Editorial Trillas. México. D.F.
269. Sumano L.H., Mateos T.G. y Brumbaugh G.W.: Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis. *Veterinaria México* 27 (1): 63-82 (1996).
270. Sumano L.H., Ocampo C.L. y Paez E.D. Actividad antibacteriana *in vitro* y biodisponibilidad en vacas de varios preparados de benzilpenicilina-G, sola o combinada con sulfato de dihidroestreptomycin. *Veterinaria México.* 31: En prensa, (2000).
271. Taira, K., Koga, H., Kohno, S. Accumulation of a newly developed fluoroquinolone, OPC-17116, by human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1877-1881.
272. Takács-Nováck, K., Béla, N., Hermeecz, I., Kerexztúri, G., Podányi, B. Szasz, G. *Protonation equilibria of quinolone antibacterials.* *J Pharma Sci* 1990; 79: 1023-1028.

- 273.** Taponen, S, K. Dredge, B. Henriksson, A-M Pyyhtiä, L. Suojala, R. Junni, K. Heinonen, S. Pyörälä. 2003. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria--a double blind field study. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003 Jun; 26(3): 193–198.
- 274.** Teagle. C.P. and David. G.P. 1999. Antibiotic resistance in mastitis bacteria. In the British mastitis conference. Pp. 24 – 29. Axient institute of animal health milk development council Novartis animal health. Steneleg USA.
- 275.** Thomas, J.K., Forrest, A., Bhaunani, S.M., Hyatt, J.M., Cheng, A., Ballow, C.H. and Schentag, J.J. (1998) Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 5210-5217.
- 276.** Timmers, K., Sternglanz, R. Ionization and divalent cation dissociation constants of nalidixic and oxolinic acids. *Bioinorg Chem* 1978; 9: 145-155.
- 277.** Tormo MA, Marti M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penades JR (2005) SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* 187:2348-2356.
- 278.** Trouet, A.L., Tulkens, P. Intracellular penetration and distribution of antibiotics: The basis for an improved chemotherapy of intracellular infections. En: Ninet, L., Bost, P.E., Bouanchaud, D.H., Florent, J. (Eds.). *The future of antibiotherapy and antibiotic research.* Academic Press, London 1981; 336-349.
- 279.** Turnidge JD. The pharmacodynamics of β -lactams. *Clin Inf Dis* 1998; 27:10-22.
- 280.** Toutain, P. L. and Lees, P. 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27: 467–477. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00613.
- 281.** Toutain, P. L. and Bousquet -Mélou, A. 2004. Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27: 455–466. doi:10.1111/j.1365-2885.2004.00604.
- 282.** Tu Quoc P; Genevaux P; Pajunen M; Savilahti H; Georgopoulos C; Schrenzel J, Kelley W.L. Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2007; 75: 1079-1088.
- 283.** Turic Esteban. (2010) Farmacocinética de Azitromicina en vacas lecheras Holando Argentino. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata
- 284.** Uivarosi. Valentina. 2013 Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, 6 Traian Vuia St, Bucharest 020956, Romania; E-Mail: uivarosi.valentina@umf.ro; Tel.: +4-021-318-0742; Fax: +4-021-318-0750.
- 285.** UNAD. 2014., Curso de Microbiología. Lección 16: Cinética del crecimiento microbiano. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf
- 286.** Van den Broek, P.J. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 213-245.

287. Van den Broek, P. J. Activity of antibiotics against microorganisms ingested by mononuclear phagocytes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991. 10:114–118.
288. Van Bambeke, F., M. Barcia-Macay, S. Lemaire, and P. M. Tulkens. 2006. Cellular pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics: current views and perspectives. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 9:218–230.
289. Van Bambeke F, Tulkens PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents* 2001, 18:S17-S23.
290. Van Bambeke F. 2014. Renaissance of antibiotics against difficult infections: Focus on oritavancin and new ketolides and quinolones. *Ann Med.* 2014 Nov;46(7):512-29. doi: 10.3109/07853890.2014.935470. Epub 2014 Jul 24.
291. Van Bambeke F, Tyteca D, Ouadrhiri Y, Tulkens PM. Optimisation des traitements antibactériens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Med* 1999; 118:43-63.
292. Van Bambeke F. Macrolides and Ketolides 2014. In *Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Eds. Alexander A. Vinks, Hartmut Derendorf and Johan W. Mouton. Ed. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. 257-279.
293. Vasil' M., Fotta M., Elečko J. (2005): Výskyt a druhová špecifikácia *Staphylococcus* sp. izolovaných z prvový- roby ovčieho mlieka. *Mliekarstvo*, 36: 25–27.
294. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 2003; 92: 179-185.
295. Vazifeh, D., Abdelghaffar, H., Labro, M.T. 1997. Cellular accumulation of the new ketolide RU 64004 by human neutrophils: Comparison with that of azithromycin and roxithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 2099-2107.
296. Vazifeh, D., Bryskier, A., Labro, M.T. 1999. Mechanism underlying levofloxacin uptake by human polymorphonuclear neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 246-252.
297. Waage S, Bjorland J, Caugant DA, Oppegaard H, Tollersrud T, Mork T, Aarestrup FM. 2002 Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. *Epidemiol Infect.* 129(1):193-202.
298. Waddell, W.J., Bates, R.G. *Intracellular pH*. *Physiol Rev* 1969; 49: 285-329.
299. Wallace, Richard L. Production of Quality Milk Through Environmental Mastitis Control. Illini DairyNet. <http://traill.outreach.uiuc.edu/dairynet/paperDisplay.cfm?ContentID=198>.
300. Walters JD, Zhang F, Nakkula RJ. Mechanisms of fluoroquinolone transport by human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2710–5.
301. Watts, J.L.; Nickerson, S.C.; Boddie, R.L. and Ray, C. 1991. Effects of a 1.94% sulfonic acid teat dip and a 1% iodophor teat dip canal infections lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74(3):1115-1123.
302. Wang Yang, Cong-Ming Wu, Li-Ming Lu, Gao-Wa Na Ren, Xing-Yuan Cao, Jian-Zhong Shen. 2008. Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary Microbiology* 130: 118–125
303. Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, Article 2361, pp. 2-21.

- 304.** Wetzstein HG, De Jong A. In Vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluorquinolones used in veterinary medicine. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet.* 1996; 18 (2): 22-29.
- 305.** Wildfeuer, A., Laufen, H., Zimmermann, T. *Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under in vivo conditions.* *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 75-79.
- 306.** Wilkinson GR. Pharmacokinetics: the dynamics of drugs absorption, distribution and elimination. In: Hardman JG, Limbird LL, editors. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 3–30.
- 307.** Wilson, C.D. and Richards, M.S. 1980. A survey of mastitis in British dairy herds. *Vet. Rec.* 106:431-435.
- 308.** Wrigth, C.L. and Yoxall, A.T., (1993) Eds: *Pharmacological basis of large animal medicine,* Philadelphia, Blackwell Scientific Publications.
- 309.** Xiong, Y., Caillon, J., Drugeon, H., Potel, G. and Baron, D. (1996) Influence of pH on Adaptive Resistance of *Pseudomona aeruginosa* to Aminoglycosides and their Postantibiotic Effects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Jan. 35-39.
- 310.** Yadlin, B.; Leitner, O.; Olickman, A.; Lubashevsky, O. y Saran, A. 1998. Prueba de Elisa para detectar anticuerpos contra *Staphylococcus aureus* en el bovino. *Memorias del Congreso Panamericano de Control de la Mastitis y Calidad de la Leche.* Mérida, Yucatán, México. p. 132.
- 311.** Yamaoka, K., Nakaawa, T. and Uno, T. (1978) Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics.* 6, 165-175.
- 312.** Yamaoka, k.; Nakagawa, T. and T.Uno (1978) Application of Akaike.s Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equation. *Journal of Pharmacokinetics.*
- 313.** Zadoks, RN., Gillespie, BE. Barkema, HW., Sampimon, OC., Oliver, SP., Schukken, YH. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology and Infection* 130(2): 335-49.
- 314.** Zadoks, R.N., Schukken, Y.H., 2006 Use of the molecular epidemiology in veterinary practice.
- 315.** Zhanel, G.G., Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., Davidson, R.J. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing-curve method and the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 1991; 37: 114-121.
- 316.** Zhanel, G.G. Influence of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles on Antibiotic Selection. *Curr Infect Dis Rep.* 2001 Feb;3(1):29-34.
- 317.** Zandarín, A.; Rampone, A.; Giraudó, J. y Calzolar, A. 1996. Inducción de cápsula de *Staphylococcus aureus* "in vivo" e "in vitro". *Memorias del Congreso Nacional de Calidad de la leche y Mastitis.* Río Cuarto. poster A-3:5-6.
- 318.** Zelenitsky SA, Harding GK, Sun S, Ubhi K, Ariano RE. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: An antibiotic pharmacodynamics analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 52:668–74.
- 319.** Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: How a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 28: S14-20.

320. Zhi, J. Nightingale, C.H. and Quintiliani, R. (1986) A Pharmacodynamic Model for the Activity of Antibiotics against Microorganism under Nonsaturable Conditions. *J. Pharm. Assoc.* 77, 991-992.
321. Zhi, J. Nightingale, C.H. and Quintiliani, R. (1988) Microbial Pharmacodynamics of Piperacillin in Neutropenic mice of Systematic Infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 16, 355-375.
322. Ziv, G. Drug selection and use in mastitis: Systematic vs. local therapy. *JAVMA.* 1980; 176:1109–1115.
323. Ziv, G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy.1. Parenteral treatment. *Vet. Med.*1980; 75:277–290.
324. Ziv, G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy. 2. Practical and therapeutic applications. *Vet. Med.* 1980; 75:469–474.
325. Ziv, G., Storper, M. Intramuscular treatment of subclinical staphylococcal mastitis in lactating cows with penicillin G, methicillin and their esters. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1985;8:276–283.
326. Ziv, G. and Sulman, F.G. 1974. Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes. *Am. J. Vet. Res.*, 34:329-333.