



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Mención: Salud Animal

**ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE CEFQUINOMA SOBRE CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE LECHE DE VACAS CON
SIGNOS DE MASTITIS AGUDA**

Autora: Med. Vet. María Georgina Rubio

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, marzo de 2019



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
Mención: Salud Animal**

**ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE CEFQUINOMA SOBRE CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE LECHE DE VACAS CON
SIGNOS DE MASTITIS AGUDA**

Autora: Med. Vet. María Georgina Rubio

Director: Dr. Eduardo Jesús Picco

Co-Director: Dr. Enrique Antonio Formentini

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS: Dr. Eduardo E. Baroni
Dr. Luis F. Calvino
Dr. Nicolás J. Litterio**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, marzo de 2019

A mis padres, Georgina y Marcelo

A mis hijos, Carla y Matías

Agradecimientos

Muchos han sido los que de manera directa o indirecta colaboraron en la realización de esta tesis. Quiero dejar constancia de todos ellos y agradecerles su participación.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por haberme permitido realizar la Maestría en la misma institución que me formo en mi carrera de grado.

A la Universidad Nacional del Litoral, a través del Curso de Acción para la Investigación el Desarrollo (CAI+D), brindando el apoyo económico para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Picco, director de este proyecto, por el tiempo, enseñanza y dedicación.

Al Dr. Enrique Formentini, quien contribuyó con su experiencia, amistad y conocimiento.

A los pasantes y becarios de la Cátedra de Farmacología, por su apoyo en la fase experimental.

A Marcelo, mi padre, quién a través de su cariño y dedicación profesional supo enseñarme a amar y transitar esta hermosa profesión.

A mis hijos, Carla y Matías por su amor y apoyo incondicional.

Y a todos los que de una u otra forma me alentaron a seguir con este proyecto.

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.- Reseña de la problemática	2
I.2.- Objetivos.....	3
I.3.- Hipótesis de trabajo.....	4
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
II.1.- Terapéutica de antimicrobianos	6
II.1.1.- Introducción	6
II.1.2.- Integración Farmacocinética / Farmacodinamia	7
II.2.- Cefalosporinas	23
II.2.1.- Introducción	23
II.2.2.- Cefquinoma.....	25
II.2.2.1.- Características químicas.....	25
II.2.2.2.- Mecanismo de acción.....	26
II.2.2.3.- Espectro farmacológico.....	28
II.2.2.4.- Resistencia.....	29
II.2.2.5.- Farmacocinética	31
II.2.2.6.- Usos clínicos de la cefquinoma	35
II.2.2.7.- Toxicidad de cefquinoma	37
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	38
III.1.- MATERIALES.....	39
III.1.1.- Microorganismos de campo.....	39
III.1.2.- Microorganismo de referencia.....	39
III.1.3.- Suero bovino.....	39
III.1.4.- Antibiótico	40
III.2.- MÉTODOS.....	40
III.2.1.- Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	40
III.2.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma	41
III.2.2.1.- Determinación de la CIM a diferentes valores de pH.....	41
III.2.2.2.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana a diferentes valores de pH.....	41
III.2.3. Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma	43

III.2.3.1.- Evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del suero bovino	43
III.2.3.2.- Determinación de la CIM en presencia de suero bovino	43
III.2.3.3.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana en presencia de suero bovino	44
III.2.4.- Determinación de efectos de persistencia.....	44
III.2.4.1.- Determinación del efecto post antibiótico (EPA).....	44
III.2.4.2.- Determinación del efecto post antibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM)	45
III.2.5.- Estudio estadístico.....	46
IV.- RESULTADOS.....	48
IV.1.- Concentración Inhibitoria Mínima	49
IV.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma	49
IV.2.1.- Determinación de la CIM de cefquinoma a diferentes valores de pH ...	49
IV.2.2.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana a diferentes valores de pH	50
IV.3.- Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma	65
IV.3.1.- Evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del suero bovino.....	65
IV.3.2. Determinación de la CIM en presencia de suero bovino	67
IV.3.3.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana en presencia de suero bovino.....	68
IV.4. Determinación de efectos de persistencia	78
V.- DISCUSION.....	80
V.1.- Concentración Inhibitoria Mínima	81
V.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma.....	84
V.3.- Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma	86
V.4.- Determinación de efectos de persistencia	90
VI.- CONCLUSIONES.....	93
VII.- BIBLIOGRAFÍA	95

RESUMEN

Se efectuó un estudio farmacodinámico caracterizando el accionar de cefquinoma, una cefalosporina de cuarta generación, frente a cepas autóctonas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de leche de vacas afectadas por mastitis. La CIM de cefquinoma para las cepas aisladas fue de entre 0,512 y 1,024 µg/mL. La acidificación del medio de cultivo hasta alcanzar un pH de 6,5 o 5,5 no introdujo modificaciones en el valor de CIM, en tanto que la incorporación de suero bovino al caldo de cultivo en proporción 50:50 determinó un descenso del 50% en el valor de la CIM. A través de la construcción de curvas de crecimiento y muerte bacteriana se evidenció que la magnitud del desarrollo bacteriano fue similar en los tres valores de pH ensayados, constatándose además que la cinética de muerte era tiempo dependiente, no observándose diferencias en eficacia al emplear concentraciones cuatro veces por encima de la CIM. También empleando las curvas de crecimiento y muerte se constató que la eficacia de cefquinoma en medio de cultivo al que se le incorporaba suero bovino en cada una de las concentraciones ensayadas era superior a lo observado en medio de cultivo solo. Por otra parte, los estudios de persistencia demostraron que el efecto pos antibiótico (EPA) de cefquinoma sobre las cepas de *S. aureus* fue de corta duración ($0,49 \pm 0,39$ horas), en tanto que el EPA sub-CIM inducido por la re exposición de las bacterias a una concentración equivalente a $0,25 \times$ CIM presentó valores de $3,50 \pm 0,52$ horas.

Palabras claves:

Cefquinoma - Farmacodinamia - *Staphylococcus aureus* - Mastitis - CIM - EPA - EPA Sub-CIM

SUMMARY

A pharmacodynamic study was carried out to describe the action of cefquinome, a fourth generation cephalosporin, against *Staphylococcus aureus* local strains isolated from milk samples of cows affected by mastitis. The MIC of cefquinome was between 0,512 and 1,024 µg/mL. These values were not modified at pH values of 6,5 and 5,5, while the presence of bovine serum in 50:50 proportion, decreased the MIC values at the half of the initial ones. Through the construction of growth and kill curves was shown that the magnitude of the bacterial development was similar at the three-pH values tested, also confirming a time dependent kill kinetics. Besides, by time-kill curves assays, was determined that efficacy of different concentrations of cefquinome in presence of bovine serum was greater than that observed in standard culture medium. On the other hand, persistence studies showed that the post-antibiotic effect (PAE) of cefquinome on *S. aureus* strains was short ($0,49 \pm 0,39$ hours), while the sub-MIC PAE was of $3,50 \pm 0,52$ hours.

Keywords:

Cefquinome - Pharmacodynamic - *Staphylococcus aureus* - Mastitis - MIC - PAE - PAE Sub-MIC

Introducción

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- Reseña de la problemática

La mastitis bovina es uno de los problemas más importantes de la producción lechera, ocasionando enormes pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con producción intensiva (Hogeveen y col., 2011; Guimarães y col., 2017).

Si bien los programas efectivos y económicos para el control de la mastitis bovina se basan fundamentalmente en la prevención, la intervención terapéutica es una parte importante del programa de control de este cuadro clínico infeccioso. Por otra parte, a pesar de que en la actualidad el profesional veterinario dispone de un verdadero arsenal terapéutico, las infecciones recidivantes provocadas por *Staphylococcus aureus* generan difíciles problemas sanitarios, obligando a un replanteo de las estrategias terapéuticas, a través de un exhaustivo estudio de la biología del microorganismo patógeno y de la farmacodinamia del agente antimicrobiano seleccionado.

Al respecto, el principal criterio de base científica empleado para seleccionar al agente antibacteriano es la susceptibilidad del microorganismo al fármaco en cuestión, lo cual se efectúa a través de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), ya que los patrones de susceptibilidad pueden variar no solamente de acuerdo con la región geográfica, sino también de un rodeo a otro (Hinckley y col., 1985; Hossain y col., 2017).

Si bien no se puede negar la utilidad de conocer la CIM, éste es un parámetro farmacodinámico estático, que provee limitada información acerca de la actividad del agente antibacteriano, ya que no aporta datos respecto de la velocidad de la actividad bactericida, así como tampoco sobre la persistencia de la actividad luego que la exposición del microorganismo al antibiótico ha disminuido o incluso cesado (Craig, 1998). Por otra parte, se debe tener en cuenta que la CIM se determina *in vitro*, y no en el entorno en el que las bacterias crecen *in vivo*, ya sea, sangre, fluido extracelular, orina, leche, o en presencia de exudado o detritos. El pH y el tenor de oxígeno del ambiente son también importantes, en particular, en localizaciones anatómicas específicas, tales como glándula mamaria o tracto urinario, al igual que el efecto de cuadros patológicos y el

estatus inmunológico del paciente (Ziv y Rasmussen, 1975; Verklin y Mandell, 1977; Strausbaugh y Sande, 1978; Luscombe y Nicholls, 1988; Veiga y Paiva, 2018).

Con el fin de utilizar una herramienta que permita maximizar la eficacia de los antimicrobianos, desde hace unos años se postula el empleo de modelos *in vitro* que se sustentan en un indicador dinámico, como lo es la construcción de curvas de crecimiento y muerte bacteriana, donde a través de la exposición de los microorganismos a diferentes concentraciones del antibiótico se toman muestras a distintos tiempos durante un período pre establecido y se determina la cantidad de bacterias en cada muestra. Sobre la base de este modelo se pueden incluir una serie de variantes que ofrecen una dimensión más amplia y adaptada a la realidad *in vivo* como es la determinación de los efectos de persistencia (Onufrak y col., 2016).

Una de las alternativas terapéuticas actualmente empleada a campo es la cefquinoma, una cefalosporina de cuarta generación aprobada para el uso en bovinos para el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, dermatitis digital y mastitis aguda (Papich, 2016). Esta última indicación terapéutica y la falta de estudios farmacodinámicos evaluando la actividad de cefquinoma frente a cepas de *S. aureus*, son las razones que han motivado al desarrollo de este proyecto de tesis.

I.2.- Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es caracterizar el comportamiento farmacodinámico de cefquinoma frente a cepas autóctonas de *S. aureus* empleando modelos *in vitro*.

Objetivos Específicos

Para lograr este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del pH y la incorporación de suero bovino en el medio de cultivo sobre la CIM de cefquinoma frente a cepas de *S. aureus*.

- Caracterizar la eficacia antibacteriana de cefquinoma en función de la concentración farmacológica, las variaciones en el pH del medio y la incorporación de suero bovino a través de la construcción de curvas de muerte bacteriana.
- Evaluar los efectos de persistencia antibacteriana de cefquinoma mediante el empleo de modelos *in vitro* para estimar el efecto post antibiótico (EPA) y efecto post antibiótico - sub CIM (EPA sub-CIM).

I.3.- Hipótesis de trabajo

- La adecuación del pH del medio de cultivo a valores similares a los encontrados en la leche bovina no modificaría el valor de la CIM ni el perfil de las curvas de crecimiento y muerte bacteriana de cepas de *S. aureus* frente a cefquinoma por tratarse de una molécula zwitterionica.
- Al ser cefquinoma un antimicrobiano perteneciente al grupo de los betalactámicos, ésta tendría un accionar tiempo dependiente con bajo efecto de persistencia frente a cepas de *S. aureus*.
- La actividad bactericida intrínseca del suero bovino potenciaría el accionar antimicrobiano de cefquinoma frente a cepas de *S. aureus*.

Revisión Bibliográfica

II.1.- TERAPÉUTICA DE ANTIMICROBIANOS

II.1.1.- Introducción

El principal indicador del cual se vale el clínico veterinario al momento de establecer el régimen posológico para un antimicrobiano es el conocimiento de la CIM, a la cual podemos definir como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un inóculo bacteriano de concentración conocida (CLSI, 2015).

No obstante, el éxito de la terapia antimicrobiana no depende solamente del conocimiento de la CIM, sino que está condicionado por las interacciones que se desarrollan entre el medicamento, el agente infeccioso y la respuesta inmunológica del hospedador. La complejidad de estas interacciones es tal, que, si alguno de estos componentes no es tenido en consideración, el tratamiento puede fracasar, e incluso pueden aparecer microorganismos resistentes, de allí la necesidad de contemplarlas al momento de establecer la posología (Craig, 1998; Anuforum y col.; 2014; Gjini y Brito, 2016).

En el inicio de la era de los antibióticos se sugirió que el éxito de la terapéutica radicaba en que la concentración plasmática de antimicrobianos, como sulfonamidas y penicilina, debía mantenerse por encima de la CIM durante todo el intervalo de dosificación (Tillett y col., 1944). Sin embargo, a finales de la década del cuarenta y principio del cincuenta, se plantearon dudas sobre la necesidad de administrarlos mediante infusiones continuas y, comienza a postularse la administración intermitente, con intervalos de dosificación relativamente largos (Altemier, 1948; Eagle y col., 1953), sustentándose esta práctica en la demora que los microorganismos presentaban en reiniciar el crecimiento durante el tiempo en que continuaban expuestos a concentraciones inferiores a la CIM.

Sin embargo, a pesar de que llevamos más de 70 años empleando antimicrobianos, los esquemas de dosis óptimos aún no están completamente dilucidados. La selección de una determinada dosis de antibiótico ha tenido siempre mucho más que ver con la tolerancia al mismo, que con la sensibilidad del patógeno al fármaco (Soriano, 2002; Ziesch y Krömker, 2016).

Con el fin de utilizar una herramienta que permita fácilmente ajustar la dosis y la frecuencia de administración de los antibióticos, para así maximizar la eficacia de los mismos, desde hace unos años se postula el empleo de índices farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) predictores de eficacia.

II.1.2.- Integración Farmacocinética/Farmacodinamia

Tal vez la consideración más importante a tener en cuenta al momento de determinar los parámetros farmacocinéticos que se emplearán en los estudios PK/PD, es establecer donde se medirán las concentraciones del fármaco. Dado que el antimicrobiano debe alcanzar el sitio en donde se localizan las bacterias que se desean controlar, se presume que lo más conveniente sería conocer las concentraciones tisulares o celulares del fármaco en cuestión. Sin embargo, dado la dificultad para determinarlas, se asume que las concentraciones plasmáticas reflejan las concentraciones presentes en el sitio donde se localizan las bacterias, llegando éstas a ser buenas predictoras de eficacia clínica en la mayoría de las infecciones tisulares (Schentag, 1989; Toutain y col., 2002, Onufrak y col., 2016, Visser, 2018).

Esta circunstancia se explica por el hecho que, en la mayoría de los tejidos, el fármaco no unido a proteínas difunde libremente hacia el fluido extravascular, por lo que el conocimiento de las concentraciones de fármaco no ligado constituye un referente fiable de las concentraciones tisulares. Dado que sólo la fracción de fármaco libre es farmacológicamente activa, los parámetros farmacocinéticos deberían ser corregidos para reflejar el grado de unión a proteínas. No obstante, por razones de practicidad, hay que señalar que la necesidad de discriminar el grado de unión a proteínas plasmáticas solo es importante en aquellos casos en los que la unión a las mismas es superior al 80%, tal como acontece con clindamicina, cloxacilina, doxiciclina y las sulfonamidas. De todos modos, dado que la unión a proteínas es dependiente de la especie animal, no es conveniente efectuar extrapolaciones entre especies (Onufrak y col., 2016, Visser, 2018).

Por otra parte, cuando existen barreras específicas, sean éstas anatómicas o patológicas, o bien cuando el microorganismo se localiza a nivel intracelular como acontece con los micoplasmas, sería entonces conveniente contar con los datos de

concentración tisular (Toutain y col., 2002; Onufrak y col., 2016, Visser, 2018). Incluso, en algunos casos, sería sumamente útil conocer en qué medida estos fármacos ingresan a los lisosomas y fagolisosomas (Tulkens, 1990). Este aspecto es de especial importancia en el caso de los macrólidos, los cuales tienden a concentrarse a nivel intracelular y, de hecho, no parece existir una correlación directa entre las concentraciones plasmáticas y la eficacia clínica (Gladue y col., 1989; Nightingale, 1999, Toutain y col., 2016).

Luego de efectuar esta consideración, podemos concluir que en la definición de las relaciones PK/PD, los parámetros farmacocinéticos más útiles son el área bajo la curva de concentración plasmática obtenida en 24 horas (AUC_{0-24}), la máxima concentración plasmática alcanzada (C_{max}) y el tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas superan un determinado umbral farmacodinámico (t) (McKellar y col., 2004; Mueller y col., 2004; Toutain y Lees, 2004; Canut Blasco y col., 2015).

Por su parte, existen dos lineamientos farmacodinámicos sobre los que se fundamentan estas relaciones PK/PD, uno de ellos se basa en parámetros farmacodinámicos estáticos, donde la CIM es el principal indicador de eficacia antibiótica a emplear, aunque algunos modelos también utilizan la concentración bactericida mínima (CMB), la cual se define como la mínima concentración de un antimicrobiano, que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de eliminar *in vitro* el 99,9% de una población bacteriana previamente estandarizada (CLSI, 1999). El segundo lineamiento incluye a aquellos modelos que se basan en un indicador dinámico, como lo es la construcción de curvas de crecimiento y muerte bacteriana, principalmente a través de la determinación del efecto de persistencia del antimicrobiano (Mueller y col., 2004).

Luego de haber aclarado estos conceptos, podemos señalar que los principales índices PK/PD predictores de eficacia que se usan en los modelos estáticos son: el tiempo en el que las concentraciones plasmáticas se mantienen por encima de la CIM ($t > CIM$), la relación entre la C_{max} y la CIM (C_{max}/CIM) y la relación entre el AUC_{0-24} y la CIM (AUC_{0-24}/CIM) (Hyatt y col., 1995). Otro índice que puede ser utilizado es el AUIC, que es la relación entre el AUC del período de tiempo, hasta un máximo de 24 h, en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la CIM y la CIM

($AUC_{t>CIM}/CIM$). De todos modos, hay que señalar que este índice es más difícil de calcular que el AUC_{0-24}/CIM , y no representa ninguna ventaja por sobre este último, incluso, cuando la concentración plasmática se mantiene por encima de la CIM durante 24 horas, el AUC y el AUC_{0-24}/CIM son coincidentes (Mueller y col., 2004). En la figura 1 se observa la representación de cada uno de estos índices.

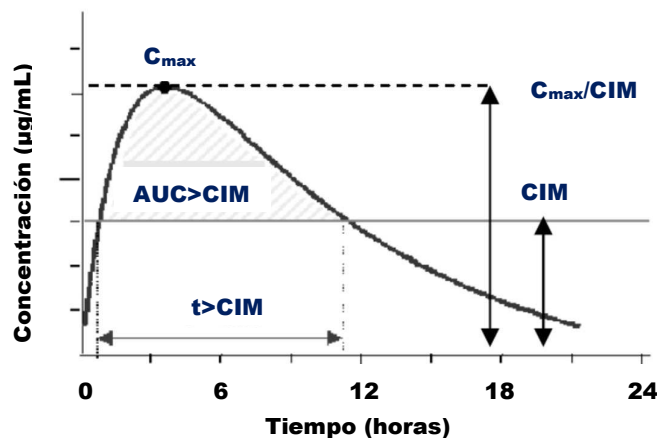


Figura 1: Representación gráfica de los principales índices PK/PD

Todos estos modelos presentan cierta covarianza entre C_{max} , AUC_{0-24} y $t_{>CIM}$. En otras palabras, al aumentar la máxima concentración alcanzada en el plasma también lo hacen el AUC y el $t_{>CIM}$. Con el fin de estudiar la relación entre la C_{max} y $t_{>CIM}$ se utilizó un modelo animal de infección respiratoria. En el mismo, un grupo de terneros fue infectado experimentalmente con *Mannheimia haemolytica* y luego tratado con danofloxacina mediante dos estrategias diferentes. En una de ellas, el antibiótico se administró por vía intravenosa en bolo a fin de obtener una alta relación C_{max}/CIM , en tanto que el otro grupo fue tratado con la misma dosis de fármaco, pero la aplicación se efectuó por infusión intravenosa, a fin de obtener un amplio $t_{>CIM}$. Como la dosis fue la misma en ambos casos, el AUC fue similar, por lo que el indicador AUC/CIM fue idéntico en los dos tratamientos. En este estudio se comprobó que una alta relación C_{max}/CIM confería una mejor respuesta de curación, tanto clínica como bacteriológica que el tiempo $t_{>CIM}$ (Sarasola y col., 2002).

En base a la información generada en estos estudios PK/PD, los antimicrobianos fueron inicialmente clasificados en dos grupos. Por un lado, aquellos cuya actividad es

dependiente del tiempo de exposición del microorganismo (actividad tiempo-dependiente), y por otra, los que presentan actividad dependiente de la concentración a la cual las bacterias son expuestas (actividad concentración-dependiente) (Craig, 1998). Dado a que no todos los antimicrobianos se ajustan a este patrón, se ha introducido un tercer grupo, el cual incluye antibióticos con actividad independiente de la concentración y prolongado efecto de persistencia (Craig, 2014; Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015). Cabe señalar que esta clasificación no sólo es dependiente del antimicrobiano, sino también del microorganismo sobre el cual se ha desarrollado el estudio, por lo que para algunos fármacos los resultados no son concluyentes.

Para los antibióticos con actividad tiempo-dependiente (betalactámicos, y algunos macrólidos), la eficacia está determinada por el tiempo en que el fármaco está en contacto con las bacterias. Si bien su eficacia antibacteriana aumentará con concentraciones crecientes hasta alcanzar una eficacia máxima, ésta generalmente se alcanza con concentraciones comprendidas entre cuatro a cinco veces la CIM, y a partir de allí, mayores concentraciones no incrementarán la eficacia (Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015).

Por otra parte, es preciso señalar que ya en el año 1948 Eagle y Musselman observaron que cuando inóculos de *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. eran expuestos a altas concentraciones de penicilina, la actividad bactericida disminuía en lugar de mantenerse en su techo máximo, es decir que el número de bacterias sobrevivientes se incrementaba en lugar de permanecer en niveles bajos y estables. A partir de ese momento, este fenómeno, al cual denominaron “efecto paradójal o de Eagle”, se ha observado para distintos antimicrobianos y microorganismos; fue descrito para ampicilina frente a *S. faecalis* (Stille y Uffelman, 1973; Yourassowsky y col., 1976), carbenicilina y *Proteus mirabilis* (Yourarsowsky y col., 1976), mecillinam y *Providencia stuartii* (Kerry y col., 1976), cefotaxime frente a *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Shah y col., 1979) y también para aminoglucósidos frente a bacilos gramnegativos (Lorian y col., 1979).

El parámetro más apropiado para evaluar la eficacia de los antibióticos con actividad tiempo-dependiente, es $t > CIM$, lo cual está avalado tanto por estudios

desarrollados *in vitro*, como así también empleando modelos animales y estudios de eficacia clínica en pacientes (Vogelman y col., 1988; Turnidge, 1998; Drusano, 1990; Gunderson y col., 2001; Craig, 2014; Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015).

A partir de trabajos desarrollados con animales afectados experimentalmente por infecciones pulmonares con *Klebsiella pneumoniae*, luego de una terapia de 24 horas con cefotaxime, se observó una clara relación entre la reducción en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y el valor de $t > CIM$, alcanzándose la mayor efectividad cuando los niveles de fármaco en plasma se mantenían por encima de la CIM durante la mitad del intervalo entre dosis (Craig, 1995). De manera similar, en un modelo *in vivo* de infección en muslo de ratones con *Streptococcus pneumoniae* que fueron tratados con cefprozil, se observó que la mayor reducción de UFC y la mayor tasa de sobrevida se obtenía también cuando el $t > CIM$ se mantenía durante al menos el 50% del intervalo entre dosis (Nicolau y col., 2000). El mismo fenómeno se ha observado en pacientes con otitis media tratada con fármacos betalactámicos, puesto que nuevamente se evidenció que el porcentaje de curación bacteriológica aumentó aproximadamente de 40 al 80% en la medida que el $t > CIM$ se incrementaba de 10 al 100% del intervalo de dosificación (Craig y Andes, 1996).

De todos modos, cabe señalar que existen diferencias asociadas al tipo de microorganismo, respecto al $t > CIM$ que estos necesitan para ser adecuadamente eliminados, por ejemplo, penicilinas y cefalosporinas requieren un menor $t > CIM$ para ser eficaces contra estafilococos que contra bacilos gramnegativos y estreptococos. Esto parece deberse a que el estafilococo es el único contra el cual estas drogas exhiben un prolongado efecto post antibiótico (Gunderson y col., 2001).

En términos generales se acepta que para lograr una tasa de cura bacteriológica superior al 85%, el $t > CIM$ debe ser mayor al 40% del intervalo entre dosis (Craig, 1998). Por su parte otros autores establecen que para los betalactámicos las concentraciones del fármaco deben mantenerse entre una y cinco veces por encima de la CIM durante el 40 y el 100% del intervalo entre dosis (Gunderson y col., 2001; Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015).

Si asumimos que $t_{>CIM}$ es el parámetro PK/PD que permite optimizar la terapéutica de los betalactámicos, existen varias estrategias que posibilitan aumentar el $t_{>CIM}$. Esto puede conseguirse no solo mediante perfusión continua, sino también empleando agentes con semividas de eliminación más largas, como el caso de las formulaciones procaínicas o benzatínicas, prolongando así el intervalo entre dosis, o bien utilizando fármacos que originen metabolitos activos o administrando inhibidores de la eliminación del fármaco, tal el caso del probenecid (Gunderson y col., 2001).

En el caso de los macrólidos, si bien se ha demostrado que tanto para eritromicina como claritromicina el mejor índice PK/PD predictor de eficacia frente a infecciones causadas por *S. pneumoniae* es $t_{>CIM}$, no ocurre lo mismo con azitromicina. De todos modos, hay que tener presente que los macrólidos tienden a concentrarse a nivel tisular, por lo que no necesariamente la concentración plasmática sea un buen indicador de efectividad clínica (Gunderson y col., 2001, Onufrak y col., 2016).

El segundo grupo de antibióticos, que incluye a los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y el metronidazol, exhibe un diferente patrón bactericida. En este caso, la tasa de muerte bacteriana se ve aumentada con concentraciones crecientes del antibiótico, por lo que el objetivo en este caso es maximizar la concentración plasmática del fármaco. Este grupo se caracteriza además por presentar un prolongado efecto post antibiótico. Los índices PK/PD más utilizados para predecir la eficacia de estos compuestos son entonces C_{max}/CIM y AUC_{0-24}/CIM (Craig, 2014; Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015, Onufrak y col., 2016).

La relación AUC_{0-24}/CIM y la eficacia ha sido demostrada en un modelo murino de infección bacteriana empleando un microorganismo gramnegativo, en el que el tratamiento con fluoroquinolonas redujo la mortalidad aproximadamente en el 100%, cuando la relación AUC_{0-24}/CIM era superior a 100 (Craig, 1998). La relación AUC_{0-24}/CIM también ha demostrado ser un efectivo indicador de cura bacteriológica en enfermos afectados por neumonía causada por bacterias gramnegativas que fueron tratados con ciprofloxacina, ya que se evidenció que cuando la proporción AUC_{0-24}/CIM era superior a 125 se observaba un 80% de efectividad, en tanto que cuando la relación era inferior a 125 el

porcentaje de cura bacteriológica era de aproximadamente el 50% (Schentag, 2000). Por su parte, cuando se trató de infecciones respiratorias bajas causadas por *S. pneumoniae* se observó que se obtenía buena efectividad con el tratamiento a base de fluoroquinolonas cuando la relación AUC_{0-24}/CIM era superior a 40 (Nicolau, 2003).

La relación entre C_{max}/CIM y el desarrollo de una respuesta clínica favorable también se ha demostrado en pacientes humanos que padecían infecciones causadas por bacterias gramnegativas que fueron tratados con antibióticos aminoglucósidos. Cuando la relación C_{max}/CIM fue 2, se obtuvo una respuesta clínica favorable en aproximadamente el 50% de los pacientes, mientras que cuando la relación fue 12 se obtuvo una respuesta clínica favorable en aproximadamente el 90% de los individuos (Moore y col., 1987).

Por su parte, la principal característica de los antimicrobianos incluidos en el tercer grupo es que, si bien su actividad es independiente de la concentración, presentan un prolongado efecto de persistencia. Es por ello que, para tetraciclina, azitromicina y la asociación quinupristina/dalfopristina, el índice AUC_{0-24}/CIM resulta ser un buen indicador para predecir eficacia terapéutica. Esto se debería al efecto post antibiótico que presentan *in vivo* (Craig, 2014; Asín-Prieto y col., 2015; Canut Blasco y col., 2015).

En el caso de vancomicina, si bien se ha demostrado que *in vitro* su actividad es mayor cuando las concentraciones se mantienen por encima de la CIM durante todo el intervalo entre dosis (Larsson y col., 1996), en modelos murinos de peritonitis por *S. pneumoniae* y *S. aureus*, se ha reportado que tanto $t > CIM$, C_{max}/CIM como AUC_{0-24}/CIM fueron buenos predictores de eficacia, lo cual sugiere que para este glicopéptido puede haber una co-dependencia entre el tiempo de exposición y la concentración (Knudsen y col., 2000), razón por la cual se lo incluye en este tercer grupo de antimicrobianos con actividad independiente de la concentración y prolongado efecto de persistencia.

La extrapolación de estos resultados a situaciones clínicas veterinarias se debe hacer con precaución ya que los modelos utilizan ratones neutropénicos y pacientes humanos gravemente enfermos, los cuales también son propensos a ser neutropénicos, por lo que un

buen indicador PK/PD debería tener en cuenta el papel que desempeñan los mecanismos defensivos propios de cada paciente (McKellar y col., 2004; Asín-Prieto y col., 2015).

Por otra parte, en la interpretación de estos índices predictores de eficacia se debe tener en cuenta que la CIM se determina *in vitro*, y no en el entorno en el que las bacterias crecen *in vivo*, ya sea, sangre, fluido extracelular, orina, leche, o en presencia de exudado o detritos (Visser, 2018). El pH y el tenor de oxígeno del ambiente son también importantes, en particular, en localizaciones anatómicas específicas, tales como glándula mamaria o tracto urinario, al igual que el efecto de cuadros patológicos, como ser inflamación o presencia de abscesos (Ziv y Rasmussen, 1975; Verklin y Mandell, 1977; Strausbaugh y Sande, 1978; Luscombe y Nicholls, 1988).

A estos factores debe sumarse el hecho que el cálculo de la CIM se efectúa generalmente empleando diluciones dobles del antimicrobiano, dejando entre cada dilución una “zona de incertidumbre”, y aunque la sensibilidad del método podría mejorarse empleando diluciones de antibióticos intermedias, esta modificación no es una herramienta práctica para implementarla de forma rutinaria (Aliabadi y Lees, 2003; Aliabadi y col., 2003).

Otro aspecto a tener en cuenta es que la CIM sólo proporciona información descriptiva limitada a la eficacia antibacteriana observada luego de 24 horas de exposición de las bacterias a diferentes concentraciones fijas del antibiótico y no brinda ningún tipo de información acerca de la velocidad de eliminación y de la eficacia absoluta de cada concentración de antibiótico expresada como porcentaje de bacterias eliminadas respecto del tamaño inicial del inóculo. Dado que la determinación de la CIM depende del número de bacterias presentes en un único momento de tiempo, diferentes combinaciones de tasas de crecimiento y muerte pueden originar un mismo valor de CIM, y obviamente una diferencia en la cinética de muerte bacteriana tendrá relevancia terapéutica. De manera similar, la CIM no proporciona ninguna información acerca de la persistencia de la actividad del agente antimicrobiano después que el microorganismo fuera expuesto al fármaco (Hoffman y Stepensky, 1999; Onufrak y col., 2016).

Un inconveniente adicional e importante asociado a este parámetro farmacodinámico, es que la CIM es calculada a concentraciones constantes del antimicrobiano, por lo que en realidad se está determinando un valor umbral de actividad, e implica la existencia de una respuesta concentración-efecto del tipo todo o nada. Esto puede dar lugar a la errónea interpretación de que todas las concentraciones por debajo de la CIM son igualmente inefectivas, siendo esta interpretación simplista e incorrecta, ya que se ha demostrado que concentraciones ligeramente inferiores a la CIM (sub-CIM) presentan algún efecto antibacteriano (Mueller y col., 2004; Andersson y Hughes, 2014).

Lo anteriormente citado es sumamente importante, puesto que luego que el fármaco ingresa al organismo, sus concentraciones no se mantienen constantes a lo largo del tiempo, sino que fluctúan en función de los procesos de absorción, distribución y eliminación (Visser, 2018).

Este tipo de observaciones acerca de la actividad de los antibióticos a concentraciones sub-CIM no son nuevas. Poco después del descubrimiento de la penicilina, hubo un informe que describía que bajas concentraciones de penicilina producían formas filamentosas de bacterias gramnegativas (Gardner, 1940). Lo mismo se observó en los pacientes tratados con bajas dosis de antibióticos, ya que aparecían filamentos y otras formas aberrantes de bacterias en la orina, cultivos de sangre y líquido cefalorraquídeo (Lorian y Waluschka, 1972; Middleton y Chemel, 1978). Eagle y Musselman reportaron una inhibición temporal del crecimiento de espiroquetas y estreptococos después de exponerlos *in vitro* a concentraciones sub-CIM de penicilina (Eagle y Musselman, 1944; Eagle y Musselman 1948).

Ensayos clínicos desarrollados en la década del cuarenta revelaron resultados satisfactorios cuando los pacientes con neumonía neumocócica severa fueron tratados con penicilina, cuyos niveles séricos apenas si alcanzaban los valores de CIM (Tillett y col., 1944). En el año 1943, Rammelkamf y Keefer demostraron que, tras la inyección de una dosis de penicilina, ésta podía destruir los estreptococos, incluso durante los siguientes 25 minutos posteriores a la no detección de penicilina en sangre.

Lorian y Atkinson el año 1975 reportaron una disminución en la densidad de los ribosomas de *Salmonella typhimurium* expuestos a la mitad del valor de la CIM de gentamicina. También mostraron que los estafilococos expuestos a un tercio del valor de la CIM de penicilina incrementaban al doble su tamaño y presentaban gruesas paredes transversales.

Concentraciones sub-CIM de macrólidos suprimieron la expresión de factores de virulencia de diferentes cepas de bacterias gramnegativas. Aunque *P. aeruginosa* normalmente es altamente resistente a este grupo, se ha demostrado que cuando es expuesta a concentraciones sub-CIM de eritromicina o claritromicina, ésta disminuye la síntesis proteica, fenómeno que estaría asociado a la inhibición de ciertos factores de virulencia y a alteraciones de componentes de la superficie de la célula bacteriana, tales como lipopolisacáridos y proteínas de membrana, con lo cual disminuye la viabilidad de la bacteria luego de un largo período de exposición, además de sensibilizarla a la actividad bactericida del suero (Tateda y col., 1993; Tateda y col., 2000).

También hay evidencia de que concentraciones sub-CIM de integrantes de este grupo producen inhibición de la expresión de flagelina en cepas de *P. aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, la cual es uno de los factores de virulencia de estas especies bacterianas, desempeñando un importante papel en la formación inicial de biofilms y en la motilidad (Kawamura-Sato y col., 2000).

La adhesión de *Escherichia coli* a la superficie de células eucariotas es mediada por estructuras proteicas asociadas a la membrana bacteriana. Las concentraciones sub-CIM de ciprofloxacina, ceftazidima, ampicilina, gentamicina y cotrimoxazole inhiben la síntesis y la expresión de adhesinas sobre la superficie de la pared de esta especie bacteriana, dando lugar a la formación de adhesinas afuncionales o al desprendimiento de las mismas desde la superficie de ésta, interfiriendo así en la capacidad de los microorganismos de acoplarse a los receptores de la superficie de la membrana de las células del hospedador (Vidya y col., 2005).

También se ha comprobado que concentraciones sub-CIM de dicloxacilina disminuyen la formación de biofilms, posiblemente por una disminución en la hidrofobicidad y en la expresión del exopolisacárido poli-N-acetilglucosamina, que se ha comprobado desempeña un papel muy importante en la capacidad de formación de biofilms por parte de los estafilococos (Cerca y col., 2005).

Se sabe también que concentraciones sub-CIM pueden ejercer un efecto directo en la virulencia de las bacterias afectando la producción de diferentes toxinas bacterianas (Odenholt, 2001).

Además, se ha demostrado que concentraciones subinhibitorias de algunos antibióticos modulan la expresión de factores de virulencia en *S. aureus*; así, al evaluar el efecto de concentraciones sub-CIM de cinco fármacos frente a cepas MRSA se observó que clindamicina y linezolid suprimían consistentemente la expresión de diferentes factores de virulencia, mientras que tigeciclina suprimió específicamente la expresión de sólo uno de los factores. Por su parte, daptomicina y vancomicina no tuvieron efectos significativos en estas concentraciones. Por lo tanto, la eficacia del tratamiento con antibióticos para las infecciones por *S. aureus* puede depender no solo de los efectos bacteriostáticos o bactericidas del antibiótico, sino también de su capacidad para prevenir la liberación de factores de virulencia (Otto y col., 2013).

A esto debe sumarse que *in vivo* el efecto sub-CIM se ve condicionado por la interacción con el sistema inmune. En un modelo que empleaba conejos no-neutropénicos a los que se les implantaban cajas tisulares, se demostró que concentraciones de bencilpenicilina equivalentes a 0,3 x CIM inhibían la multiplicación de los estreptococos durante varias horas (Odenholt y col., 1990). Similares resultados se obtuvieron en ratones, donde se evidenció que concentraciones sub-CIM de ampicilina inhibían el desarrollo de los estafilococos durante aproximadamente 18 horas (Zak y Kradolfer, 1979). Roosendahl y colaboradores (1986) demostraron, empleando un modelo de neumonía en ratas, que concentraciones sub-CIM de ceftazidima desarrollaban un efecto curativo en ratas normales infectadas con *Klebsiella pneumoniae*, mientras que se requerían dosis mucho más altas para lograr la curación en ratas neutropénicas.

A fin de poder valorar estos efectos empleando parámetros PK/PD es donde cobran importancia los modelos dinámicos basados en curvas de crecimiento y muerte bacteriana, los cuales permiten evaluar el crecimiento y la muerte tanto en función del tiempo como de la concentración del antimicrobiano, pudiendo esta última mantenerse constante o fluctuar simulando lo que acontece *in vivo*.

La típica curva de muerte bacteriana en función del tiempo, se caracteriza por presentar una fase inicial de latencia, en donde no se producen modificaciones en el conteo bacteriano, seguida de una fase de muerte, donde la cantidad de bacterias decrece en forma exponencial. Ésta puede ser seguida por una segunda fase de latencia previa a la fase de regeneración, a consecuencia del crecimiento de subpoblaciones bacterianas resistentes. Cabe señalar que en algunos casos ésta última puede presentarse como una fase estática cuando los nutrientes del medio se han agotado (Li, 2000).

En un intento por estandarizar la metodología de valoración para efectuar comparaciones entre distintos fármacos, y utilizando estos modelos, el efecto sub-CIM fue definido con la siguiente ecuación: $T_s - C$, donde T_s es el tiempo que tarda un cultivo de microorganismos tratado con concentraciones sub-CIM de antibiótico en incrementar $1 \log_{10}$ el número de bacterias viables respecto del \log_{10} del conteo de bacterias viables realizado al momento de incorporar el antibiótico y C es el tiempo correspondiente al cultivo control (Odenholt, 2001).

También en base a estos modelos podemos determinar el efecto post antibiótico (EPA), al cual se lo define como a la supresión temporal del crecimiento bacteriano, luego de la exposición de un inóculo a un agente antimicrobiano durante un breve período de tiempo. Para el cálculo de la duración del EPA se utiliza la siguiente ecuación: $EPA = T - C$, donde T es el tiempo que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar el número de bacterias viables en $1 \log_{10}$ respecto del \log_{10} del conteo de bacterias viables realizado al momento de haber removido el antibiótico, en tanto que C es el tiempo que tarda el cultivo control (Odenholt y col., 2001).

El EPA tiene la dimensión de tiempo (horas) y la duración del mismo depende de varios factores tales como: la concentración del antibiótico, el tiempo durante el cual las bacterias son expuestas al mismo, la especie bacteriana y eventualmente la cepa y el agente antibiótico. Se ha demostrado que el EPA es una propiedad que poseen todos los antibióticos, quienes lo inducen en mayor o menor grado. De esta manera todos los antibióticos parecen ser capaces de inducir EPA en cocos grampositivos, pero los betalactámicos inducen un EPA corto o insignificante sobre bacilos gramnegativos con excepción de carbapenems sobre *P. aeruginosa*. Los EPAs de mayor duración son inducidos sobre bacterias gramnegativas por aminoglucósidos, fluoroquinolonas y por antibióticos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica (Onufrak y col., 2016).

El EPA no solo es un fenómeno observado *in vitro*, sino que también ha sido demostrado en diferentes modelos animales y en general, el EPA registrado *in vivo* es siempre mayor que el observado *in vitro* (Odenholt, 2001).

El EPA constituye una de las muchas explicaciones del éxito de los regímenes de dosificación discontinuos. Sin embargo, el tiempo en que las concentraciones de antibióticos están por encima de la CIM más el EPA no suelen cubrir todo el intervalo de dosis. Cuando se determina el EPA *in vitro*, las bacterias están expuestas al antibiótico durante un período de tiempo a una concentración constante, seguida de la eliminación del mismo por lavado del inóculo. En contraste, en el escenario *in vivo*, las bacterias se exponen a concentraciones suprainhibitorias seguidas por niveles subinhibitorios.

Uno de los primeros informes sobre los efectos de las concentraciones sub-CIM en bacterias previamente expuestas a concentraciones por encima de la MIC, provino de Tuomanen (1986), quien demostró que en neumococos expuestos a bencilpenicilina a una concentración igual a 50 veces la CIM, la reexposición en concentraciones sub-CIM prolongaba el tiempo requerido para la regeneración del microorganismo en comparación con los controles expuestos solamente a 50 veces la CIM. En 1989 Odenholt y colaboradores demostraron que los estreptococos β -hemolíticos en la fase post antibiótica eran hipersensibles a concentraciones sub-CIM, situación que no se presentaba en las

bacterias que previamente no habían sido expuestas a concentraciones suprainhedorias, no hallando diferencias entre las curvas de crecimiento de éstas y los controles no expuestos.

Empleando las curvas de crecimiento y muerte bacteriana, el EPA a concentraciones sub-CIM (EPA sub-CIM) fue definido entonces con la siguiente fórmula: $EPA \text{ sub-CIM} = T_{pa} - C$, donde T_{pa} es el tiempo que tarda un cultivo bacteriano tratado a concentraciones suprainhedorias y luego reexpuesto a concentraciones sub-CIM en incrementar en $1 \log_{10}$ el número de bacterias viables respecto del \log_{10} del conteo bacteriano realizado al momento de la dilución del medio de cultivo, en tanto que C es el tiempo requerido por el control no expuesto (Odenholt-Tornqvist y col., 1991).

En general, se ha encontrado que para aquellas combinaciones antibiótico/bacteria en las que existe EPA, también se presenta un largo EPA sub-CIM, en tanto que cuando la combinación no presenta EPA, tampoco se manifiesta EPA sub-CIM o como el caso del meropenem frente a *P. aeruginosa*, el EPA sub-CIM es similar al efecto sub-CIM solo (Odenholt-Tornqvist, 1993).

La existencia del EPA sub-CIM también se ha demostrado *in vivo*, de hecho, los EPA más largos reportados *in vivo* en comparación con los resultados *in vitro* probablemente puedan explicarse por el EPA sub-CIM, ya que en animales se presentarán inevitablemente concentraciones sub-CIM luego de las suprainhedorias (Craig y Gudmunsson, 1996). Así, empleando un modelo experimental de meningitis en conejos, se demostró que el EPA de ampicilina frente a *S. pneumoniae* se debió a las sostenidas concentraciones sub-CIM (Täuber y col., 1984; Fantin y col., 1991). En experimentos desarrollados en conejos inmunocompetentes empleando el modelo de implante de cajas tisulares, se evidenció un prolongado EPA sub-CIM cuando los *Streptococcus pyogenes* eran expuestos a concentraciones sub-CIM en la fase post antibiótica, ya que el EPA paso de 1,9 horas a más de 24 horas luego de exponerlos a $0,3 \times CIM$ (Odenholt y col., 1990). Fantin y colaboradores (1991) demostraron que el EPA de amikacina frente a *K. pneumoniae* fue varias veces mayor en ratones con insuficiencia renal respecto a individuos normales, probablemente debido a la semivida de eliminación más prolongada

de amikacina, lo que determinaría que las bacterias estén expuestas durante más tiempo a concentraciones sub-CIM.

El mecanismo implicado en estos efectos no está claro, pero se ha planteado la hipótesis, en el caso de los antibióticos betalactámicos, que cuando las bacterias están expuestas a concentraciones suprainhedorias de un antibiótico, el fármaco se unirá covalentemente a los sitios activos de las proteínas de unión a penicilina (PBP). Cuando se elimina el exceso de drogas y se expone a la bacteria a concentraciones sub-CIM, es un hecho que la mayoría de las PBP estarán todavía inactivadas, por lo que sólo se necesitaría una baja concentración de fármaco para inhibir la PBP recién formada. Esto da lugar a una inhibición prolongada de la multiplicación celular hasta que un número crítico de PBP libre vuelva a estar disponible. También parece que, para fármacos con otros mecanismos de acción, tales como la unión a la ADN girasa o al ARN, sólo una pequeña cantidad de fármaco es necesario para evitar el crecimiento normal de las células una vez que el bacterias han sido dañadas por una concentración suprainhedoria del antibiótico (Odenholt-Tornqvist, y col., 1991).

En conclusión, podemos decir que la determinación del efecto sub-CIM, del EPA y del EPA sub-CIM son clínicamente más relevantes que la sola determinación de la CIM o de la CMB, ya que en un escenario *in vivo* la exposición de las bacterias a concentraciones suprainhedorias siempre será seguida por concentraciones sub-CIM. De hecho, la presencia de un prolongado EPA sub-CIM, más el conocimiento de los efectos sub-CIM que se presentan para una determinada combinación bacteria/antibiótico, sumado a la correcta funcionalidad del sistema inmunológico del paciente, podría justificar el éxito terapéutico que se presenta *in vivo* con antibióticos de corta semivida de eliminación que son administrados con prolongados intervalos de dosificación (Odenholt, 2001).

De todos modos, aunque la resistencia antimicrobiana se ha estudiado principalmente a concentraciones superiores a la CIM, está claro que las cepas resistentes se seleccionan para un rango de concentraciones mucho más amplio, incluidas las inferiores a la CIM, ya que bajas concentraciones de antibióticos pueden afectar varios

procesos celulares que aumentan la variabilidad genética y alteran el comportamiento celular. Sin embargo, el conocimiento de los detalles mecanicistas de estos efectos es aún limitado y, en particular, las implicaciones evolutivas y médicas de la exposición bacteriana a estas bajas concentraciones de antibióticos son en su mayor parte inexploradas (Andersson y Hughes, 2014; Li y col., 2017).

Por otra parte, ya en el año 1997 Baquero y Negri sugirieron que existe un peligroso rango de concentraciones donde las mutantes resistentes son seleccionadas con mayor frecuencia, siendo el inicio del concepto de la ventana de selección de mutantes (VSM).

De este planteo se deriva la concentración preventiva de mutantes (CPM), definida como la concentración que restringe la amplificación de mutantes resistentes de primer paso dentro de una población sensible, porque por encima de esta concentración el crecimiento bacteriano solo se espera que ocurra con 2 o más mutaciones concomitantes (Canut Blanco *et al.*, 2013).

El concepto de CPM se deriva de los estudios realizados con fluoroquinolonas, e inicialmente no se aplicó a antimicrobianos con múltiples dianas o frente a bacterias con múltiples mecanismos de resistencia. Aunque el término CPM surgió considerando la resistencia por mutación, también se aplica a mecanismos de resistencia derivados de transmisión genética horizontal ya que, una vez que una población sensible adquiere los genes de resistencia, puede actuar como donante de estos genes además de trasmisora a sus descendientes, por lo que, en presencia de antibióticos, puede darse la selección de la subpoblación resistente (Blondeau, 2009).

El rango de concentraciones entre la CIM y la CPM se define como ventana de selección de mutantes; la misma no debe verse como un rango de concentraciones uniformemente asociado a la probabilidad de selección sino como el rango de concentraciones donde determinados factores relacionados con el patógeno y con la exposición influyen en dicha probabilidad (Canut Blanco *et al.*, 2013).

II.2.- CEFALOSPORINAS

II.2.1.- Introducción

La historia de las cefalosporinas se inicia en el año 1945, cuando Giuseppe Brotzu aísla de aguas contaminadas en la costa sur de Cerdeña un hongo identificado como *Cephalosporium acremonium*, cuyo extracto crudo mostraba acción bactericida frente a gérmenes grampositivos y gramnegativos. Años más tarde se determinó que uno de los componentes de este extracto era la Cefalosporina C.

El grupo activo básico de las cefalosporinas deriva de la remoción de la cadena lateral de la cefalosporina C, lo que da origen al anillo 7-amino-cefalosporánico (Figura 2). La sustitución de varios grupos en la estructura básica de las cefalosporinas a nivel de R₁ y R₂, ha generado una amplia variedad de compuestos con diferencias en el espectro de actividad, en la estabilidad a la hidrólisis por betalactamasas y en la farmacocinética.

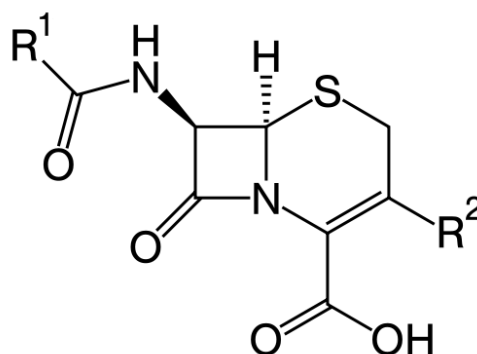


Figura 2: Núcleo químico común de las cefalosporinas

A pesar de que las cefalosporinas pueden clasificarse en base a su estructura química o características clínico farmacológicas, es muy útil el sistema de clasificación por generaciones. Ésta se basa en el orden de aparición histórica, y reflejan, en parte, el espectro de actividad antibacteriana (Tabla 1).

Las cefalosporinas de primera generación son generalmente activas contra cocos grampositivos, incluyendo *S. aureus* y *S. epidermidis* productores y no productores de

penicilinasas, y estreptococos del grupo A y B hemolítico. En general, las cefalosporinas de esta generación poseen limitada efectividad contra bacterias gramnegativas.

Tabla 1. Clasificación de las cefalosporinas según generaciones.

Generación de cefalosporinas			
PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA	CUARTA
Cefalexina	Cefaclor	Cefoperazona	Cefepima
Cefradina	Cefuroxima	Ceftiofur	Cefpiroma
Cefacetrilo	Cefalonio	Cefbuperazona	Cefquinoma
Cefapirina	Cefprozil	Cefdinir	
Cefadroxilo	Loracarbef	Cefetamet	
Cefaloglicina	Cefmetazol	Cefixima	
Cefaloridina	Cefamandol	Cefpodoxima	
Cefalotina	Cefonicida	Cefotaxima	
Cefazolina	Ceforanida	Ceftibuten	
	Cefotetam	Cefmenoxima	
	Cefoxitina	Ceftizoxima	
		Ceftriaxona	

Las cefalosporinas de segunda generación son activas sobre los mismos microorganismos que son susceptibles a las de primera generación, pero se les ha ampliado el espectro frente a diversos organismos gramnegativos, tales como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Haemophilus* spp., *Salmonella* spp. y *Proteus* spp.

Las cefalosporinas de tercera generación fueron diseñadas para tener mayor actividad contra bacterias gramnegativas y mantener una buena actividad contra grampositivas, aunque son generalmente menos efectivas contra estafilococos susceptibles a las cefalosporinas de primera generación. Compuestos de esta clase han mejorado la estabilidad hidrolítica a muchas de las betalactamasas activas frente a cefalosporinas de generaciones anteriores y penicilinas. Las cadenas laterales oximino, presentes en la mayoría de éstas cefalosporinas, fueron introducidas para conferir estabilidad al anillo β -lactámico frente a ciertas betalactamasas que surgieron a raíz de la

presión selectiva ejercida por el uso de ampicilina, carbenicilina, y cefalosporinas de primera y segunda generación en la década de 1960 (Hornish y Kotarski, 2002).

La cuarta generación de cefalosporinas, donde se encuentra la cefquinoma, incorpora diferentes grupos activos en su estructura que le confieren una mayor potencia hacia una amplia gama de microorganismos e inclusive una mayor actividad contra bacterias sensibles a las cefalosporinas de tercera generación con una mayor estabilidad a la hidrólisis por betalactamasas (El-Gendy y col., 2009).

En años recientes, nuevos antibióticos como ceftobiprol y ceftarolina se han clasificado como cefalosporinas de quinta generación, caracterizándose por su espectro extendido frente a bacterias grampositivas multiresistentes (Kollef, 2009; Mehta y Sharma, 2016).

II.2.2.- Cefquinoma

II.2.2.1.- Características químicas

La cefquinoma es una cefalosporina de cuarta generación de uso exclusivo en medicina veterinaria. La presencia de un nitrógeno cuaternario en el grupo ciclohexenopiridina (Figura 3), hace que mantenga una carga positiva tanto en condiciones de pH ácido como alcalino, mientras que la carga negativa a nivel del C₄ del núcleo cefem hace que esta molécula se comporte como *zwitterión*, es decir que en condiciones *in vivo* la molécula mantenga un equilibrio entre sus cargas. Esta característica química estructural determina que la capacidad de penetración a través de las porinas bacterianas sea superior a las de tercera generación, lo cual le permite alcanzar altas concentraciones en el espacio periplásmico de bacilos gramnegativos (Mella y col., 2001; El-Gendy y col., 2009).

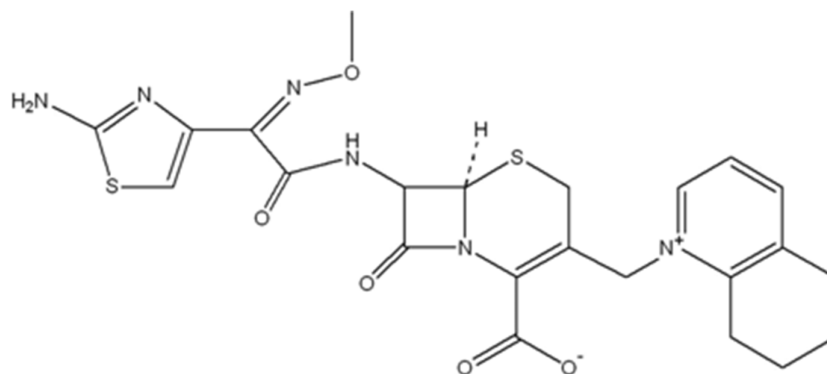


Figura 3. Estructura química de la Cefquinoma.

II.2.2.2.- Mecanismo de acción

La actividad de la cefquinoma, al igual que el resto de los betalactámicos se debe principalmente a la inhibición que produce en la reacción de transpeptidación en la fase final de la biosíntesis de la mureína o peptidoglicano, que es un polímero esencial en la pared de casi todas las bacterias (Meroueh y col., 2006).

La unidad estructural del peptidoglicano, sintetizada en el citoplasma bacteriano, contiene dos aminoazúcares alternantes (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y un polipéptido unido al ácido N-acetilmurámico, cuyos últimos residuos se añaden como un dímero D-ala-D-ala. Una vez transportada a la cara externa de la membrana celular, cada nueva unidad se agrega a la pared en los puntos de crecimiento de ésta. Primero se unen los aminoazúcares a la cadena lineal mediante enlaces glucosídicos y, por último, se forman enlaces cruzados entre las cadenas enfrentadas para formar un entramado. Esta reacción es catalizada por las transpeptidasas, mientras que las carboxipeptidasas eliminan los residuos D-ala terminales de cualquier pentapéptido que no participe del entrecruzamiento (Mediavilla y García-Lobo, 2014).

Los sitios de fijación de los betalactámicos son proteínas ubicadas en la cara externa de la membrana celular de las bacterias, denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Coincidentemente, algunas PBP son enzimas con actividad transpeptidasa y carboxipeptidasa, quedando inhibidas cuando el antibiótico se fija a los centros activos enzimáticos. La estructura similar del anillo betalactámico a la del sustrato

natural de las transpeptidasas, el dipéptido D-ala-D-ala, permite un enlace covalente con la enzima y su inactivación irreversible. Como resultado se altera la última etapa de la síntesis y se forman paredes celulares incompletas, lo que sumado a la actividad normal de las mureinhidrolasas o autolisinas, lleva finalmente a la destrucción de la bacteria por lisis osmótica.

Los betalactámicos, para ser activos, deben acceder a la membrana citoplasmática donde se encuentran las enzimas a las que han de inhibir. La dificultad para alcanzar estos puntos puede explicar, al menos en parte, la ineficacia de los betalactámicos sobre muchas especies bacterianas; por ejemplo, clamidias y rickettsias de localización intracelular, o bacterias ácido-resistentes con una pared muy rica en lípidos impermeables a los betalactámicos (Mediavilla y García-Lobo, 2014).

Aparte de estas bacterias, que presentan una resistencia natural a estos antibióticos, existen también, entre bacterias potencialmente sensibles, diferencias notables que condicionan la llegada de los betalactámicos a los sitios de acción. En organismos grampositivos, la pared celular, de estructura mucho más simple que en los gramnegativos, es permeable a moléculas polares. En bacterias gramnegativas existe una membrana externa que constituye una fuerte barrera para la entrada de solutos polares. En la membrana externa de estas bacterias y en las de las micobacterias se encuentran unas proteínas, denominadas *porinas* que son proteínas integrales de la membrana y que contienen un poro de carácter hidrófilo que permite el paso de compuestos polares por difusión.

La mayoría de los betalactámicos atraviesan la membrana externa para alcanzar su sitio de acción en la membrana citoplásmica, a través de las porinas por un *proceso pasivo* y, por lo tanto, la concentración de antibiótico en el espacio extracelular y en el espacio periplásmico tenderá a igualarse. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el espacio periplásmico existen enzimas capaces de inactivar los betalactámicos, por lo que la concentración de antibiótico en el espacio periplásmico dependerá de la difusión a través de la membrana externa y de la susceptibilidad a las betalactamasas.

El lipopolisacárido (LPS) también constituye una barrera de permeabilidad ya que al poseer un carácter iónico puede bloquear la vía de entrada hidrófoba a través de las bicapas lipídicas, evitando así la entrada de los compuestos menos polares. Las bacterias gramnegativas presentan resistencia natural a penicilinas muy grandes o muy cargadas o que, por otras razones, no pueden atravesar la barrera impuesta por el LPS y la membrana externa (Mediavilla y García-Lobo, 2014).

II.2.2.3.- Espectro farmacológico

Si bien la alta capacidad para atravesar membranas que presenta la cefquinoma es condicionante de su espectro farmacológico, los principales determinantes de la mayor actividad frente a bacterias gramnegativas resistentes a moléculas de tercera generación, son la estabilidad frente a las betalactamasas, tanto cromosomales como plasmidiales, así como su afinidad para con las PBP (Mella y col., 2001).

En forma general puede señalarse que el espectro de actividad antimicrobiana de cefquinoma involucra bacterias grampositivas, como *S. aureus* meticilino sensibles, *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*, *Propionibacterium acnes* y *Clostridium* spp, así como también numerosos microorganismos gramnegativos, donde despliega una actividad superior a las cefalosporinas de tercera generación sobre bacilos multiresistentes, tales como *Salmonella* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacteriaceae* spp., *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Citrobacter* spp. y *Serratia marcescens* y equivalente sobre cepas *Actinobacillus equuli* y *Arcanobacterium pyogenes* (Limbert y col., 1991; Böttner y col., 1995; Fung-Tomc, 1997; San Martín y col., 1998; Deshpande y col., 2000; Guérin-Faublée y col., 2002; Guérin-Faublée y col., 2003; Wallmann y col., 2003; Sheldon y col., 2004; Thomas y col., 2006; Melnikow y col., 2008, Zonca y col., 2011; Katsuda y col., 2013; Shan y, Wang, 2016; Yu y col., 2016).

Por su parte, estudios realizados por Limbert y colaboradores (1991), Thomas y colaboradores (2006) y Aarestrup y Skov (2010) determinaron que *P. aeruginosa*, *S. aureus* resistente a meticilina y *Rhodococcus equi* presentan moderada sensibilidad a cefquinoma. Para anaerobios gramnegativos, tales como *Bacteroides* spp. y

Fusobacterium spp., se ha determinado que el 80% de 14 cepas testeadas presentaban una CIM superior a 100 µg/mL (Limbert y col., 1991). Del mismo modo Sheldon y colaboradores (2004) informaron una CIM₉₀ superior a los 32 µg/mL en 22 cepas de *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus* aisladas de muestras uterinas de vacas postparto con pirexia y/o metritis y/o endometritis.

Al evaluarse la susceptibilidad *in vitro* a diferentes antimicrobianos frente a cepas de *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *M. haemolytica* y *E. coli* aisladas de casos clínicos de bovinos y porcinos durante los años 2007 a 2011 en República Checa se encontró que en los porcinos todos los aislamientos de *A. pleuropneumoniae* fueron susceptibles, en tanto que se encontró un nivel muy bajo de resistencia a *P. multocida* (0,3%) y *E. coli* (1,4%). En el caso de los bovinos, todos los aislamientos de *P. multocida* fueron sensibles, en tanto que para *E. coli* y *M. haemolytica* los niveles de resistencia fueron del 0,9% y 1,6%, respectivamente (Nedbalcova y col., 2014).

II.2.2.4.- Resistencia

El principal mecanismo de resistencia bacteriana para cefalosporinas es la producción de betalactamasas que inactivan a éstas moléculas por hidrólisis del anillo betalactámico. Los genes que las codifican pueden estar ubicados en el cromosoma o en plásmidos. Las enzimas cromosómicas son universales en una determinada especie bacteriana, mientras que la presencia de enzimas codificadas por plásmidos es variable, pudiendo ser transferidas entre diversas especies bacterianas (Kalman y Barriere, 1990; Mediavilla y Garcia-Lobo, 2014).

En organismos grampositivos, la síntesis de betalactamasas suele ser inducible por la presencia de antibiótico y las enzimas se secretan al medio externo en gran cantidad, produciendo su detoxificación, con lo que la resistencia tiene un efecto poblacional. En bacterias gramnegativas, las betalactamasas se sintetizan de forma constitutiva y en pequeña cantidad, secretándose posteriormente al periplasma. Su situación es estratégica y escasas moléculas de enzima pueden inactivar al antibiótico a su paso al periplasma a través de las porinas (Yoneyama y Katsumata, 2006; Tenover, 2006).

Si bien la cefquinoma resiste a la mayoría de las betalactamasas, puede resultar susceptible a las denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), al igual que acontece con otras cefalosporinas de cuarta generación (Seiffert y col., 2013). Las BLEE son secretadas por bacterias gramnegativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, y a los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* y los genes que las codifican se asocian a menudo con estructuras genéticas móviles, como plásmidos, transposones e integrones, permitiendo una rápida diseminación de los mismos con la consecuente expresión de resistencia (Jacoby y Munoz-Price, 2005).

La pérdida de las porinas constituye un mecanismo inespecífico de resistencia que muy a menudo produce resistencia cruzada para todos los compuestos que usan las porinas como vía de entrada a las bacterias. Las mutantes son resistentes simultáneamente a penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol y tetraciclinas; sin embargo, el nivel de resistencia alcanzado por esta vía no es muy alto y sólo suele tener significado clínico cuando se asocia con otros mecanismos de resistencia (Mediavilla y Garcia-Lobo, 2014). Este tipo de resistencia hasta el momento no se ha reportado para cefquinoma.

La resistencia a los betalactámicos puede deberse también a modificaciones en la afinidad por las PBP. El caso más característico de resistencia por este mecanismo es la resistencia a meticilina en *S. aureus* que presentan una forma nueva de esta proteína llamada PBP2a que tiene muy baja afinidad por la meticilina. La proteína PBP2a es producto de un gen *mecA* presente sólo en el cromosoma de *S. aureus* resistentes a meticilina, que se supone lo ha adquirido de otra especie bacteriana (Mediavilla y Garcia-Lobo, 2014). Este tipo de resistencia, que como se mencionó es frecuente en bacterias grampositivas, hasta el momento tampoco parece haberse desarrollado para cefquinoma.

Para que se desarrolle un alto nivel de resistencia en cefalosporinas de cuarta generación se requiere al menos de la actividad sinérgica de dos mutaciones, por un lado, un incremento en la producción y en la actividad hidrolítica de las BLEE, y por otro de una disminución en la permeabilidad de la membrana celular (Fung-Tomc y col., 1996; Tzouveleki y col., 1998).

La falta de eficacia para el tratamiento de las afecciones causadas por *S. aureus* también puede deberse a la capacidad de este microorganismo para producir biofilms. Así, en un modelo de infección experimental por *S. aureus* en ratones con formación de biofilm asociado a un catéter se demostró que ni siquiera con el régimen de dosificación más alto de cefquinoma (256 mg/kg/12 h) se consiguió erradicarlas. La falta de eficacia antimicrobiana para las infecciones relacionadas con biofilms puede estar relacionada con la tolerancia intrínseca de las poblaciones bacterianas, así como con la pobre penetración de la cefquinoma a través de la matriz polimérica extracelular de las formaciones de biofilms. Otros mecanismos, como las contribuciones de los componentes de la matriz y los aumentos de la β -lactamasa cromosómica, también pueden conducir a esta resistencia (Yu y col., 2016).

En un modelo PK/PD *in vivo* empleando cajas tisulares en conejos y la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, se demostró que mantener las concentraciones de cefquinoma por encima de la concentración preventiva de mutantes (1,6 μ g/mL) durante al menos el 58% del intervalo de administración proporciona una estrategia para lograr una actividad antibacteriana efectiva y minimizar la aparición de resistencia. Por último, esos autores señalan que, debido al alto valor de la CPM de cefquinoma frente a esta cepa, las concentraciones alcanzadas con las dosis de 8 a 16 mg/kg se encontraban dentro de la ventana de selección de mutantes, con lo cual se producían dramáticos incrementos en la presentación de bacterias resistentes. También señalan que, aunque ningún mutante resistente fue observado para el grupo animales tratados a razón 32 mg/kg, la dosis parece ser demasiado alta, en comparación con los 1 a 3 mg/kg empleados en la clínica (Xiong y col., 2016).

II.2.2.5.- Farmacocinética

La cefquinoma, al igual que acontece con otras cefalosporinas, prácticamente no se absorbe luego de la administración oral debido a que es sumamente inestable en un ambiente acuoso (Yuan y col., 2011).

Luego de la aplicación intramuscular en bovinos, ovinos y búfalos la absorción fue relativamente rápida, ya que la máxima concentración plasmática se alcanza entre las 0,5 y 2 horas posteriores a la aplicación (EMEA, 1999, Errecalde y col., 2001, Errecalde

y col., 2002, Uney y col., 2011, Venkatachalam y col., 2017). Similares resultados se han obtenido en otras especies, así, tras la administración intramuscular en cerdos, la máxima concentración plasmática se alcanzó a las 0,28 horas posteriores a la administración (Li y col., 2008), mientras que en pollos se alcanzó a las 0,25 horas (Xie y col., 2013) y en patos a las 0,38 horas (Yuan y col., 2011). En todas estas especies la biodisponibilidad luego de la aplicación intramuscular fue superior al 93% (EMEA, 1999).

Las cefalosporinas son moléculas ácidas por lo que en el organismo se comportan como moléculas polares. Son muy poco liposolubles y poseen una capacidad deficiente para penetrar al interior de las células. El volumen de distribución generalmente está comprendido entre 0,2 a 0,3 L/kg y raramente exceden los 0,5 L/kg. Cefquinoma no es la excepción; su distribución no es amplia debido a que es un ácido orgánico con un valor de pKa de $2,71 \pm 0,2$ y su solubilidad en lípidos es baja lo que limita el transporte a través de la bicapa lipídica. En los perros el volumen aparente de distribución en el estado de equilibrio fue de 0,2 L/kg mientras que en cerdos y vacunos fue de 0,23 y 0,21 L/kg, respectivamente (Limbert y col., 1991; EMEA, 1999). En el caso de los equinos, luego de la aplicación endovenosa a la dosis de 1 mg/kg el mismo fue de 0,24 L/kg, en tanto que en otro ensayo empleando la dosis de 2 mg/kg fue de 0,339 L/kg (Winther y col., 2011; Uney y col., 2016).

Cefquinoma se une poco a proteínas plasmáticas; estudios desarrollados en bovinos, caninos, porcinos y ovinos determinaron que el mismo oscila entre el 5 y el 15%, dependiendo de la especie animal (Limbert y col., 1991; EMEA, 1999; Lohr y col., 2004; Tohamy, 2011). No obstante, en el caso de los equinos, se ha encontrado un mayor porcentaje de unión a proteínas, ya que el mismo se encuentra comprendido entre el 20 y el 30% (Winther y col., 2011)

En general la distribución de las cefalosporinas al líquido cefalorraquídeo (LCR) es limitada, y las concentraciones alcanzadas corresponden a un 0,5 a 2% de las concentraciones máximas logradas en sangre. Esto es debido a las características físico-químicas de las cefalosporinas y al hecho que, si logran alcanzar el LCR, son transportadas activamente fuera del sistema nervioso central. Sin embargo, este

mecanismo se interrumpe en el caso de inflamación meníngea, situación donde además se alteran las uniones celulares estrechas y el transporte de vesículas. Por lo tanto, el pasaje de moléculas betalactámicas a través de la barrera hematoencefálica se ve favorecido, logrando éstas concentraciones del 55% respecto al pico de concentración plasmática (Dowling y Kruth, 2006). No obstante, algunas cefalosporinas de tercera generación, tales como cefaloridina, y ceftriaxona logran niveles elevados en SNC (Nau y col., 2010), situación que no acontece con el ceftiofur (Cervantes y col., 1993).

Al igual que todas las cefalosporinas, cefquinoma difunde bien en el sistema respiratorio, logrando concentraciones superiores a la CIM₉₀ de patógenos pulmonares como *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (Böttner y col., 1995; Sellyei y col., 2009).

En los huesos, articulaciones y músculo, la distribución de las cefalosporinas es aceptable, aunque con algunas variaciones dependientes del compuesto, pero en general difunden bien al líquido sinovial (Caprile, 1988). Se ha demostrado en equinos que cefquinoma penetra fácilmente en el líquido sinovial donde la proporción $AUC_{Líquido\ Sinovial} / AUC_{Plasma}$ es de entre 0,57-1,37 después de la administración de dosis ascendentes múltiples, aunque sin acumularse luego de aplicaciones repetidas (Uney y col., 2016).

En los aparatos digestivo y urinario todo el grupo alcanza concentraciones terapéuticas, especialmente en orina, que es la principal vía de excreción, ya que dentro de las 4 horas post administración se recupera entre el 50 y el 80% de la cefquinoma administrada por vía parenteral (EMEA, 1999).

Hay pocos estudios *in vivo* que describan la distribución de los compuestos activos en el tejido mamario, pero los ácidos débiles, como los antibióticos betalactámicos presentan limitada capacidad para penetrar las membranas lipídicas, como es la barrera sangre/glándula mamaria, debido a su alto grado de ionización tanto a pH del plasma como de la leche (Rasmussen, 1959, 1971; Ziv y Sulman, 1975).

En un estudio desarrollado por Ehinger y colaboradores (2006) empleando un modelo *in vitro*, donde la glándula mamaria aislada se mantenía perfundida con solución Tyrode (136,8 mmol/L de NaCl, 2,7 mmol/L de KCl, 1,8 mmol/L de CaCl₂ x 2H₂O, 1,05 mmol/L de MgCl₂ x 6H₂O, 0,416 mmol/L de NaH₂PO₄ x 2H₂O, 11,9 mmol/L de NaHCO₃ y 5,5 mmol/L de D(+)-glucosa), a 39° C en un ambiente gasificado con carbogen (95% O₂, 5% CO₂) empleando una bomba peristáltica, se comprobó que luego de la aplicación intramamaria de cefquinoma, la misma no difundía al perfundido durante el periodo de 6 horas que duró el muestreo. Por su parte, en un estudio *in vivo* en el cual se administró cefquinoma por vía intramamaria durante tres días cada 12 horas, la máxima concentración plasmática alcanzada tanto en animales sanos como afectados de mastitis era de aproximadamente 0,1 µg/mL (Zonca y col., 2011). Estos resultados no hacen más que apoyar las conclusiones enunciadas por Rasmussen (1959) y Ziv y Sulman (1975).

En contraste, cuando cefquinoma se administró a través del fluido de perfusión simulando una administración sistémica de cefquinoma, ésta alcanzó en el tejido mamario concentraciones antibacterianas superiores a los valores de CIM₉₀ para *E. coli*. Por su parte, cuando se administró cefquinoma por vía intramamaria y “sistémica” al mismo tiempo, la concentración máxima en el perfundido a las 2 h posteriores a la administración fue superior a la que se encontraba después del tratamiento sistémico sólo, lo cual posiblemente se debía a la disminución de la difusión de cefquinoma desde el fluido de perfusión en el tejido mamario, probablemente debido al gradiente de concentración reducido resultante de la administración simultánea de cefquinoma por la ruta intramamaria (Ehinger y col., 2006).

En cuanto a la biotransformación, las cefalosporinas son mínimamente metabolizadas en el hígado, y cefquinoma no es la excepción, ya que se excreta casi totalmente en forma inalterada a través del riñón. Esto se comprobó utilizando cefquinoma radiomarcada, donde el único compuesto identificado positivamente en la orina de los bovinos tratados fue cefquinoma sin modificar. En terneros, entre un 50 y un 80% de la dosis se recuperó en la orina dentro de las 4 primeras horas, y el 90% dentro de las 24 horas, mientras que en igual lapso un 5% de la dosis fue recuperada de las heces. (EMEA, 1999). Por su parte, en porcinos se recuperó en la orina hasta las 48 horas post

tratamiento el 86% de la cefquinoma administrada, en tanto que el 9% se encontró en las heces (EMA, 1999).

En lo que respecta al aclaramiento corporal de cefquinoma, tras la administración endovenosa de una dosis de 10 mg/kg, el mismo fue de 0,12 L/kg/h en bovinos y de 0,16 L/kg/h en porcinos (Limbert y col., 1991). Un mayor aclaramiento corporal fue reportado en pollos, en los cuales tras la administración de cefquinoma a una dosis de 2 mg/kg por vía endovenosa éste fue de 0,35 L/kg/h (Xie y col., 2013).

Limbert y colaboradores (1991), evaluaron la eliminación de la cefquinoma en caninos, bovinos y porcinos tras la administración intravenosa a una dosis de 10 mg/kg y reportaron valores de semivida de eliminación de 0,98, 1,33 y 1,23 horas, respectivamente para cada una de estas especies. Luego de la administración por vía endovenosa a dosis de 1 mg/kg a bovinos la semivida de eliminación fue de $2,10 \pm 0,45$ horas (Ahnad y col., 2014). Por su parte, luego de la administración intramuscular en bovinos a una dosis de 1 mg/kg, la semivida de eliminación fue de 1,56 horas (Errecalde y col., 2002). Esta mayor semivida de eliminación luego de la aplicación intramuscular también fue reportada en otras especies, ya que se evidenció en porcinos y patos (Li y col., 2008; Lu y col., 2007; Yuan y col., 2011), no así en pollos (Xie y col., 2013).

En un ensayo en el cuál se evaluó una formulación de liberación sostenida de cefquinoma formulada en microesferas de gelatina, se reportó que luego de su administración intramuscular en porcinos a la dosis de 4 mg/kg de peso vivo, la vida media de absorción con este preparado se incrementaba en más de tres veces respecto a la formulación tradicional. Esta absorción más lenta fue consistente con un desplazamiento en el T_{max} , y una menor C_{max} , en tanto que el AUC fue de más del doble. Por último, la lenta desaparición de la droga desde el organismo quedó evidenciada con la semivida de eliminación, la cual fue casi diez veces más alta, ya que pasó de $4,44 \pm 0,29$ a $45,89 \pm 3,03$ horas (Zhang y col., 2017).

II.2.2.6.- Usos clínicos de la cefquinoma

El uso clínico de cefquinoma está condicionado por la sensibilidad del microorganismo y la localización del foco infeccioso. Las diferentes sensibilidades

fueron demostradas por estudios desarrollados *in vitro* y/o *in vivo* en bovinos (Amiridis y col., 2003; Ganière y col., 2004; Sheldon y col., 2004; Palanivel y col., 2005; Bradley y col., 2011), bubalinos (Palanivel y col., 2005), porcinos (Wisselink y col., 2006; Cavaco y col., 2008; Sellyei y col., 2009; Stannarius y col., 2009), equinos (Thomas y col., 2006; Rohdich y col., 2009), caninos (Ganière y col., 2005) y en pollos (El-Gendy y col., 2009; Sellyei y col., 2009) con diferentes afecciones infecciosas.

En bovinos se la indica para el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*, dermatitis digital, panadizo interdigital y mastitis aguda por *E. coli* con signos de afectación sistémica. Además, para mastitis bovina, existe un preparado comercial para la administración intramamaria. Las formulaciones para administración intravenosa son recomendadas, entre otros, para los cuadros septicémicos, fundamentalmente en animales jóvenes, como los potrillos y los terneros. La cefquinoma también es utilizada para tratamiento de enfermedades respiratorias porcinas a la dosis de 2 mg/kg por vía intramuscular una vez al día durante 3 a 5 días (EMEA, 1999). En esta especie también se recomienda el síndrome mastitis-metritis-agalactia y, al igual que el bovino, para mastitis producida por *E. coli*.

Parlevliet y colaboradores (2008), sugieren el empleo de cefquinoma intrauterina en yeguas para el tratamiento de la endometritis crónica a razón de 1,5 g/33 mL de diluyente aplicándola cada 24 horas durante 3 días. La cefquinoma también se ha utilizado como antibiótico en el diluyente del semen equino, no habiendo afectado negativamente a los parámetros seminales (Parlevliet y col., 2006).

Finalmente, es conveniente señalar que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha incluido a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación en la categoría de agentes antimicrobianos de importancia crítica tanto para la salud humana como para la sanidad animal. Por lo tanto, no deberían usarse como tratamiento de primera elección a menos que esté justificado; en tanto que su empleo como segundo tratamiento, en teoría deberá hacerse sobre la base de los resultados de pruebas bacteriológicas y cuando se hayan agotado otros antimicrobianos alternativos (OIE, 2018).

II.2.2.7.- Toxicidad de cefquinoma

Al igual que resto de los betalactámicos, cefquinoma posee un amplio margen de seguridad, siendo su toxicidad aguda baja. Tras la exposición a dosis repetidas y crecientes sólo se observó anemia hemolítica en ratones, en este caso la dosis fue de 2500 mg/kg/día por vía oral durante 90 días. No se observaron alteraciones reproductivas, teratogénicas, mutagénicas, carcinogénicas, ni sobre el sistema inmunológico (EMEA, 1999).

Las recomendaciones y precauciones para su uso, están más bien relacionadas a las probables reacciones de hipersensibilidad, así como su uso terapéutico racional (no preventivo), para evitar la emergencia de resistencia bacteriana, tal como se mencionara anteriormente.

Materiales y Métodos

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- MATERIALES

III.1.1.- Microorganismos de campo

Se utilizaron 30 cepas de *S. aureus* meticilino sensibles aisladas durante los años 2009 a 2010 de secreciones lácteas de vacas en producción afectadas por mastitis clínica o subclínica pertenecientes a establecimientos lecheros de la cuenca central argentina.

Los microorganismos se identificaron por caracterización fenotípica en base a la morfología de la colonia en agar sangre ovina al 5%, tinción de Gram, pruebas de catalasa y coagulasa, capacidad de hidrolizar manitol en agar manitol salado (Laboratorios Britania), presencia de DNAsa (ensayo de DNasa Agar, Difco) y pirrolidonicarilamidasa (Pyr-A-ENT, Laboratorio Britania), y producción de acetoina a partir de piruvato por la prueba de Voges-Proskauer. A posteriori fueron caracterizadas en función de su sensibilidad a la meticilina empleando discos de oxacilina de 1 µg, mediante la técnica de difusión en placa. Todas estas cepas se conservan en caldo Müller-Hinton con glicerol al 15% a -20° C.

Para las etapas posteriores del estudio se seleccionaron al azar 5 cepas de las 30 originalmente aisladas. A estas cepas se las identificó como SA-01, SA-02; SA-03, SA-04 y SA-05.

III.1.2.- Microorganismo de referencia

En todos los ensayos se empleó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 como microorganismo control.

III.1.3.- Suero bovino

Se utilizó suero bovino de animales adultos (SBA) y de neonatos que no habían calostrado (STsC). El SBA consistió en un pool de suero obtenido a partir de sangre venosa de seis bovinos clínicamente sanos de seis meses a un año de edad, que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los últimos tres meses, a los cuales se los considera como inmunocompetentes. El pool de STsC se obtuvo a partir de sangre venosa de seis terneros recién nacidos, sin calstrar y clínicamente sanos. La esterilidad de las muestras de suero

fue corroborada por ausencia de desarrollo bacteriano mediante pruebas bacteriológicas clásicas (OIE, 2008). La presencia de inmunoglobulinas del pool de SBA y la agamaglobulinemia del pool de STsC se corroboró mediante proteinograma por electroforesis.

III.1.4.- Antibiótico

Para todos los ensayos farmacodinámicos se utilizó un estándar de sulfato de cefquinoma (Lote: 01-01), con un título de 801 mg/g de cefquinoma, proporcionado gentilmente por Intervet Argentina S.A. Este estándar se conservó a refrigerado a -20°C.

III.2.- MÉTODOS

III.2.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM de cefquinoma fue determinada por el método de macrodilución en caldo siguiendo las recomendaciones establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Para este estudio se utilizaron las 30 cepas de *S. aureus* aisladas a campo y la cepa ATCC 29213.

Se preparó una solución acuosa de cefquinoma con una concentración de 2.560 µg/mL, a partir de la cual se efectuaron diluciones en agua destilada estéril, hasta conseguir una concentración final de 16,364 µg/mL.

El medio de cultivo líquido, caldo Mueller-Hinton (CMH; Britania, Buenos Aires, Argentina) fue preparado según las instrucciones del fabricante, esterilizado en autoclave y almacenado a 4°C, no trascurriendo más de doce horas desde su preparación hasta su uso.

Por otra parte, se prepararon inóculos bacterianos en solución salina isotónica a partir de colonias en fase de crecimiento. Una alícuota de esta suspensión, con turbidez equivalente al grado 0,5 de la escala McFarland, se incorporó al CMH a fin de obtener un inóculo con una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL).

Por cada microorganismo se preparó una batería de tubos con 1 mL de CMH estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añadió 1 mL de la solución de cefquinoma con una concentración de 16,364 $\mu\text{g/mL}$. Tras mezclar adecuadamente, se trasvasó 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repitió tantas veces como diluciones a testear. La serie de diluciones se completó con un tubo control sin antimicrobiano que solamente contenía CMH. Finalmente, a cada uno de estos tubos se incorporó 1 mL de inóculo bacteriano, de modo que los microorganismos fueron expuestos a las siguientes concentraciones de cefquinoma: 0,128, 0,256, 0,512, 1,024, 2,048 y 4,096 $\mu\text{g/mL}$.

Todos los tubos fueron incubados a 35 ± 1 °C y la lectura de los resultados se realizó luego de 20 horas de incubación. La CIM fue definida como la menor dilución de cefquinoma que evitó el desarrollo bacteriano visible. Los ensayos con cada cepa se realizaron por duplicado.

III.2.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma

III.2.2.1.- Determinación de la CIM a diferentes valores de pH

Se evaluó el efecto del pH del medio de cultivo sobre la CIM de cefquinoma empleando el método de macrodilución, el cual fue desarrollado tal como se describió en el apartado anterior, con la diferencia que el pH original del medio (7,4) fue ajustado con ácido ortofosfórico hasta pH 6,5 y 5,5. En este ensayo se utilizaron las 5 cepas de campo seleccionadas y la cepa ATCC 29213, las cuales fueron enfrentadas a concentraciones de 0,128, 0,256, 0,512, 1,024, 2,048 y 4,096 $\mu\text{g/mL}$ de cefquinoma.

La comparación de los valores de CIM obtenidos a los tres valores de pH (7,4, 6,5 y 5,5) se realizó mediante el test estadístico de ANOVA. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

III.2.2.2.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana a diferentes valores de pH

La actividad y la eficacia de concentraciones fijas de cefquinoma sobre las seis cepas de *S. aureus* se evaluaron mediante curvas de muerte bacteriana durante 24 horas en CMH a los tres valores de pH que se utilizaron en el ensayo anterior, esto es al pH original del caldo (7,4) y a pH 6,5 y 5,5.

Para la construcción de las curvas de muerte bacteriana todas las cepas fueron expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM tomando como referencia el valor de CIM estimado para cada cepa y pH. En todos los casos el conteo bacteriano inicial fue de al menos $0,5 \times 10^6$ UFC/mL, incubándose en estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Cada una de las cepas fue cultivada en CMH a los tres valores de pH en ausencia de antibiótico e incubada en estufa bajo idénticas condiciones para la construcción de las curvas de crecimiento testigo.

De cada cultivo se obtuvieron alícuotas de 0,1 mL a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas, las que fueron sometidas a diluciones seriadas en solución salina isotónica a 4°C . Una alícuota de cada última dilución fue extendida sobre la superficie de una placa de agar e incubada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Las curvas de crecimiento y muerte de cada cepa bacteriana fueron construidas por duplicado.

Los valores de UFC/mL fueron estimados multiplicando el número de UFC/placa por el factor de corrección que derivó de la dilución seriada correspondiente a cada muestra en particular. En cada curva de muerte y crecimiento, el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

La actividad bactericida de cada concentración de cefquinoma a cada tiempo de muestreo se evaluó considerando como punto de corte la reducción de 3 logaritmos decimales en el número inicial de bacterias viables (CLSI, 1999), lo que equivale a una reducción del 99,9 % del tamaño inicial del inóculo.

El crecimiento bacteriano a cada pH, determinado por el número de bacterias viables a las 24 horas, se comparó mediante ANOVA. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

III.2.3.- Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma

III.2.3.1.- Evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del suero bovino

Para la evaluación *in vitro* de la actividad bactericida intrínseca del suero bovino se construyeron curvas de crecimiento bacteriano para la cepa ATCC 29213 de *S. aureus* en CMH y en CMH al que se le incorporó SBA y STsC, de modo que el medio de cultivo quedo constituido por CMH:SBA 50:50 y CMH:STsC 50:50, incubándose en estufa a 35 ± 1 °C.

Tal como se describió anteriormente, de cada cultivo se tomaron alícuotas al tiempo cero y luego de 2, 4, 6, 8 y 10 horas de incubación, las que previa dilución en solución fisiológica estéril fueron extendidas sobre placas de agar, para posteriormente realizar el conteo de las UFC/placa. Todo el ensayo se realizó por duplicado.

La magnitud del desarrollo bacteriano en CMH:SBA 50:50 y CMH:STsC 50:50 se expresó como conteo de bacterias viables (UFC/mL) al final del experimento. La actividad bactericida intrínseca de CMH:SBA 50:50 y CMH:STsC 50:50, respecto del crecimiento en medio de cultivo estándar (CMH), se expresó como porcentaje de bacterias eliminadas.

La comparación de los porcentajes de eficacia antibacteriana, se realizó mediante el test estadístico de ANOVA. Cuando se compararon más de dos grupos entre sí, las diferencias entre estos fueron determinadas con el test de Bonferroni. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

III.2.3.2.- Determinación de la CIM en presencia de suero bovino

La CIM de cefquinoma frente a las seis cepas de trabajo de *S. aureus* fue determinada por el método de macrodilución empleando CMH al que se le adicionó SBA en proporción 50:50 (CMH:SBA). A la mezcla CMH:SBA con concentraciones de cefquinoma de entre 0,128 y 4,096 $\mu\text{g/mL}$ se les incorporó el inóculo bacteriano, y tras 20 horas de incubación a 35 ± 1 °C se procedió a la lectura. La CIM fue definida como la menor dilución de cefquinoma que evitó el desarrollo bacteriano visible. El ensayo se realizó por duplicado.

La CIM de cefquinoma en CMH:SBA se comparó con la obtenida en CMH mediante el test estadístico *t* de diferencia de medias de Student, fijando el límite de significancia al 5% ($p = 0,05$).

III.2.3.3.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana en presencia de suero bovino

Se realizó un ensayo de muerte bacteriana en CMH al que se le añadió SBA en proporción 50:50, de modo que cada cepa se enfrentó a concentraciones de cefquinoma equivalentes a 0,5, 1, 2 y 4 veces la CIM previamente determinada en CMH:SBA. Al igual que en los otros ensayos, también se empleó un inóculo sin antimicrobiano a fin de construir la curva de crecimiento. Tal como se describió anteriormente, de cada inóculo se tomaron alícuotas a tiempos preestablecidos, las que previa dilución fueron extendidas sobre placas de agar, para realizar el conteo de UFC/placa. Este ensayo se realizó por duplicado.

Se comparó la actividad antibacteriana de las distintas concentraciones de cefquinoma obtenidas en CMH:SBA con los resultados obtenidos en los ensayos de curvas de muerte en CMH. El test estadístico empleado fue Kruskal-Wallis y el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

III.2.4.- Determinación de efectos de persistencia

III.2.4.1.- Determinación del efecto post antibiótico (EPA)

Los ensayos de EPA se realizaron mediante modificación de la técnica reportada por Wang y Zhang (2009). Brevemente, un cultivo en medio líquido de cada una de las seis cepas bacterianas, con una densidad de al menos $0,5 \times 10^6$ UFC/mL, fue expuesto a una concentración de cefquinoma equivalente a 4 veces la CIM. Para cada cepa fue realizado un cultivo bacteriano sin antibiótico que actuara como testigo.

El medio de cultivo (CMH) en presencia de cefquinoma fue incubado durante 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, posteriormente el antibiótico fue removido del medio por dilución 1:1.000 con medio de cultivo sin antibiótico. A fin de estandarizar el conteo de bacterias viables en el cultivo control, éste también fue diluido 1:1.000 con medio de cultivo sin antibiótico.

Los conteos de bacterias viables se realizaron por extensión de una alícuota del medio de cultivo, incubación y posterior conteo de UFC/placa según el método descrito anteriormente a los siguientes tiempos: al inicio del ensayo (hora -2), inmediatamente luego de haber realizado la dilución (hora 0), y posteriormente a intervalos de una hora hasta transcurridas ocho horas de iniciado el ensayo.

El EPA es definido como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste durante un tiempo determinado tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano. Para el cálculo de la duración del EPA se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{EPA} = T - C$$

donde T es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar el número de bacterias viables en $1 \log_{10}$ respecto del conteo realizado al momento de haber removido el antibiótico por dilución y C es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar $1 \log_{10}$ el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo (Craig y Gudmundsson, 1996).

Los ensayos de EPA y de crecimiento testigo de cada cepa bacteriana fueron realizados por duplicado, y el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

III.2.4.2.- Determinación del efecto post antibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM)

Los ensayos de EPA sub-CIM se realizaron mediante modificación de la técnica reportada por Wang y Zhang (2009). Al igual que en el estudio anterior, cultivos en medio líquido (CMH) de cada una de las cepas bacterianas fueron expuestos a una concentración de cefquinoma equivalente a 4 veces la CIM, dejando un cultivo bacteriano sin antibiótico como testigo.

Luego de incubar los medios de cultivo en presencia de cefquinoma durante 2 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, las concentraciones del antibiótico fueron reducidas a un nivel

equivalente a 0,25 veces la CIM mediante dilución 1:16 con medio de cultivo sin antibiótico. A fin de estandarizar el conteo de bacterias viables en el cultivo control, este también fue diluido 1:16 con medio de cultivo sin antibiótico.

Los conteos de bacterias viables se realizaron según el método descrito anteriormente en el ensayo de EPA. El EPA sub-CIM fue definido por Odenholt-Tornqvist y colaboradores (1992) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{EPA sub-CIM} = T_{pa} - C$$

donde T_{pa} es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo de microorganismos tratados con el antibiótico y nuevamente expuestos a concentraciones subinhibitorias (<CIM) en incrementar $1 \log_{10}$ el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo y C es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo control en incrementar en $1 \log_{10}$ el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo (Odenholt-Tornqvist y col., 1992).

Los ensayos de EPA sub-CIM de cada cepa bacteriana fueron realizados por duplicado, y el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

3.2.5.- Estudio estadístico

Se utilizó el Software InfoStat (2008), *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Para definir el tratamiento estadístico a utilizar en cada ensayo se realizó la comprobación de la distribución normal de los datos experimentales empleando el test de Kolmogorov-Smirnov y la verificación de la homocedasticidad de la varianza mediante el test de Bartlett.

Los grupos que presentaron distribución normal y homocedasticidad de varianza se compararon mediante *t* de Student o ANOVA de una vía; en los casos en que se detectaron diferencias, se compararon los grupos entre sí con el test de Bonferoni. Los grupos que no mostraron homocedasticidad de varianza (heterocedasticidad) se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no-paramétrico), y al detectar diferencias, los grupos se compararon mediante el test de Dunn. En todos los casos el límite de significancia fue fijado en 5% ($p=0,05$)

Resultados

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Concentración Inhibitoria Mínima

Al caracterizar la actividad antibacteriana de cefquinoma frente a 30 cepas locales de *S. aureus* meticilino sensibles aisladas de secreciones lácteas de vacas en producción afectadas por mastitis clínica o subclínica se encontró que la CIM para 18 de las cepas, así como para la cepa testigo, ATCC 29213, fue de 0,512 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que en las 12 restantes la CIM fue de 1,024 $\mu\text{g/mL}$.

Teniendo en cuenta estos resultados, puede evidenciarse que en el 60% de las cepas aisladas el valor de CIM fue coincidente con el de la cepa de referencia (Figura 4).

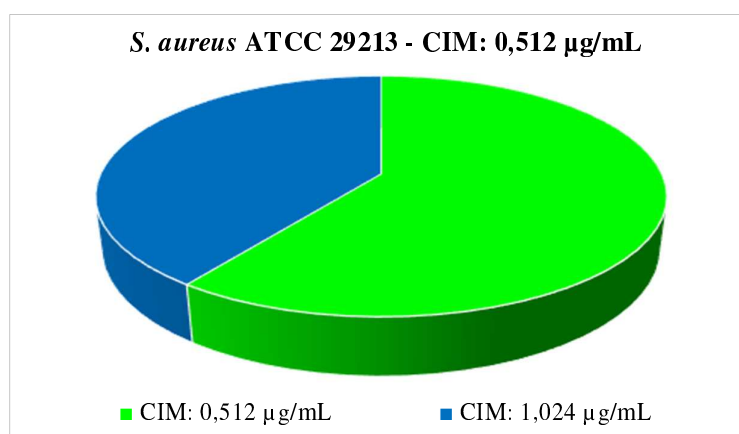


Figura 4: Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$) de cefquinoma frente a 30 cepas de *S. aureus* aisladas de secreciones lácteas de vacas en producción afectadas por mastitis.

IV.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma

IV.2.1.- Determinación de la CIM de cefquinoma a diferentes valores de pH

A pH 7,4 los valores de CIM de cefquinoma para las seis cepas seleccionadas de *S. aureus* estuvieron comprendidos entre 0,512 y 1,024 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que a pH 6,5 y 5,5 la CIM presentó valores entre 0,256 y 1,024 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5).

Solamente en una de las cepas bajo estudio se encontró que el valor de la CIM se redujo al disminuir el pH a valores de 6,5 y 5,5, por lo que no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) entre los valores de CIM obtenidos a los valores de pH bajo estudio. Los

resultados obtenidos permiten inferir que la actividad antibacteriana de cefquinoma sobre *S. aureus* no es afectada por el pH del medio, dentro de rangos factibles de presentarse en cuadros de afecciones mastíticas, donde el valor es superior al de la leche normal (Ogola y col., 2007).

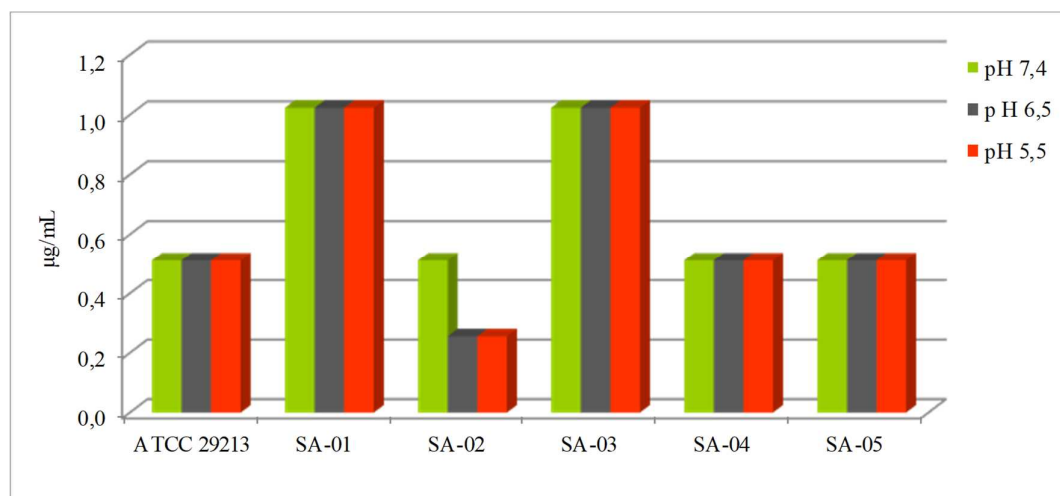


Figura 5: Concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$) de cefquinoma sobre 6 cepas seleccionadas de *S. aureus* determinada a diferentes valores de pH del medio de cultivo.

IV.2.2.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana a diferentes valores de pH

Al evaluar el crecimiento bacteriano de las seis cepas de *S. aureus* después de incubar los respectivos inóculos durante 24 horas a diferentes valores de pH, no se hallaron diferencias en la magnitud del desarrollo bacteriano observado a valores de pH de 6,5 y 5,5 respecto del crecimiento a pH 7,4 ($p > 0,05$) (Figura 6).

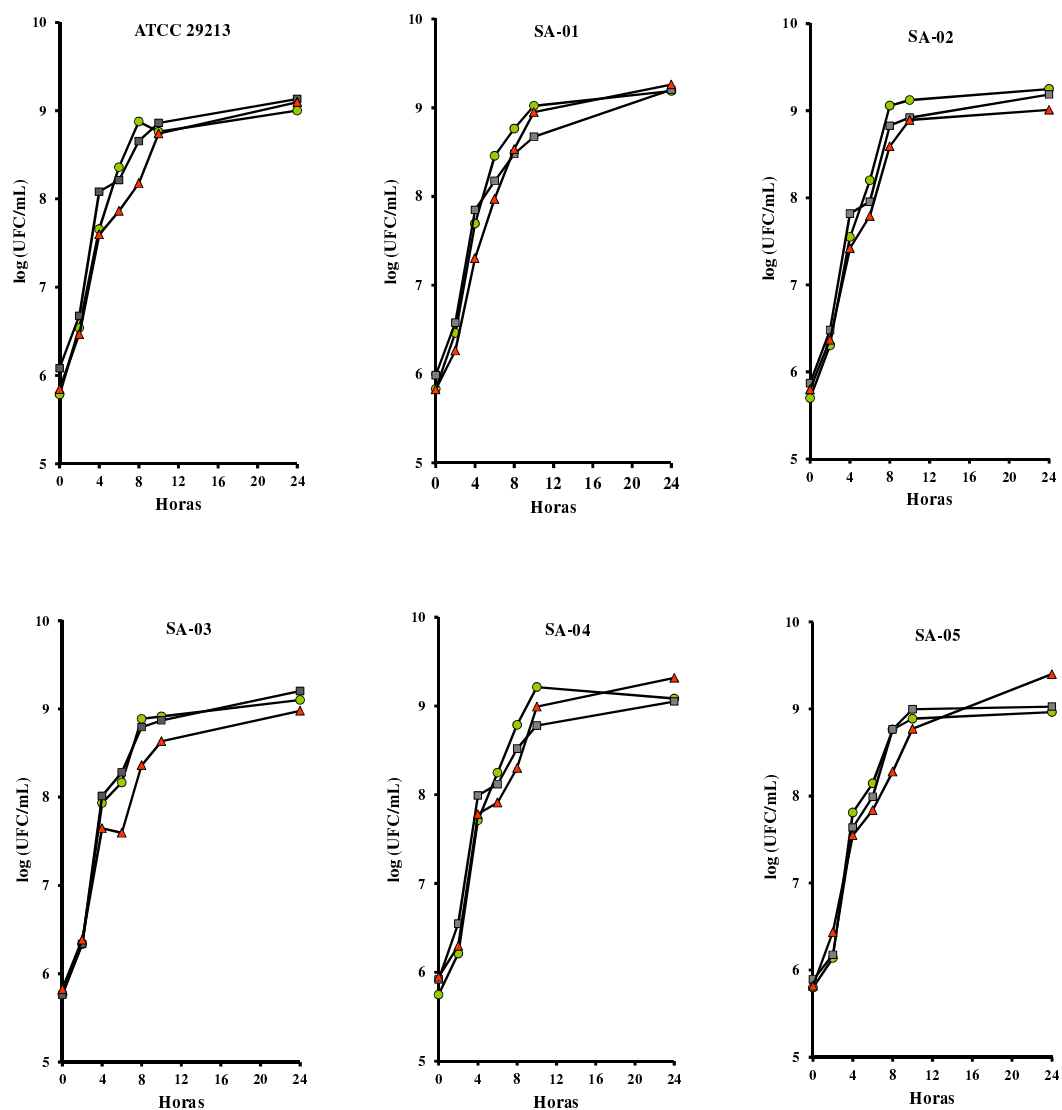


Figura 6. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* en caldo Muller-Hinton a diferentes pH. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● pH 7,4; ■ pH 6,5; ▲ pH 5,5.

En la figura 7 puede verse la evolución de la masa bacteriana de cada una de las seis cepas de *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 hs en CMH a pH 7,4.

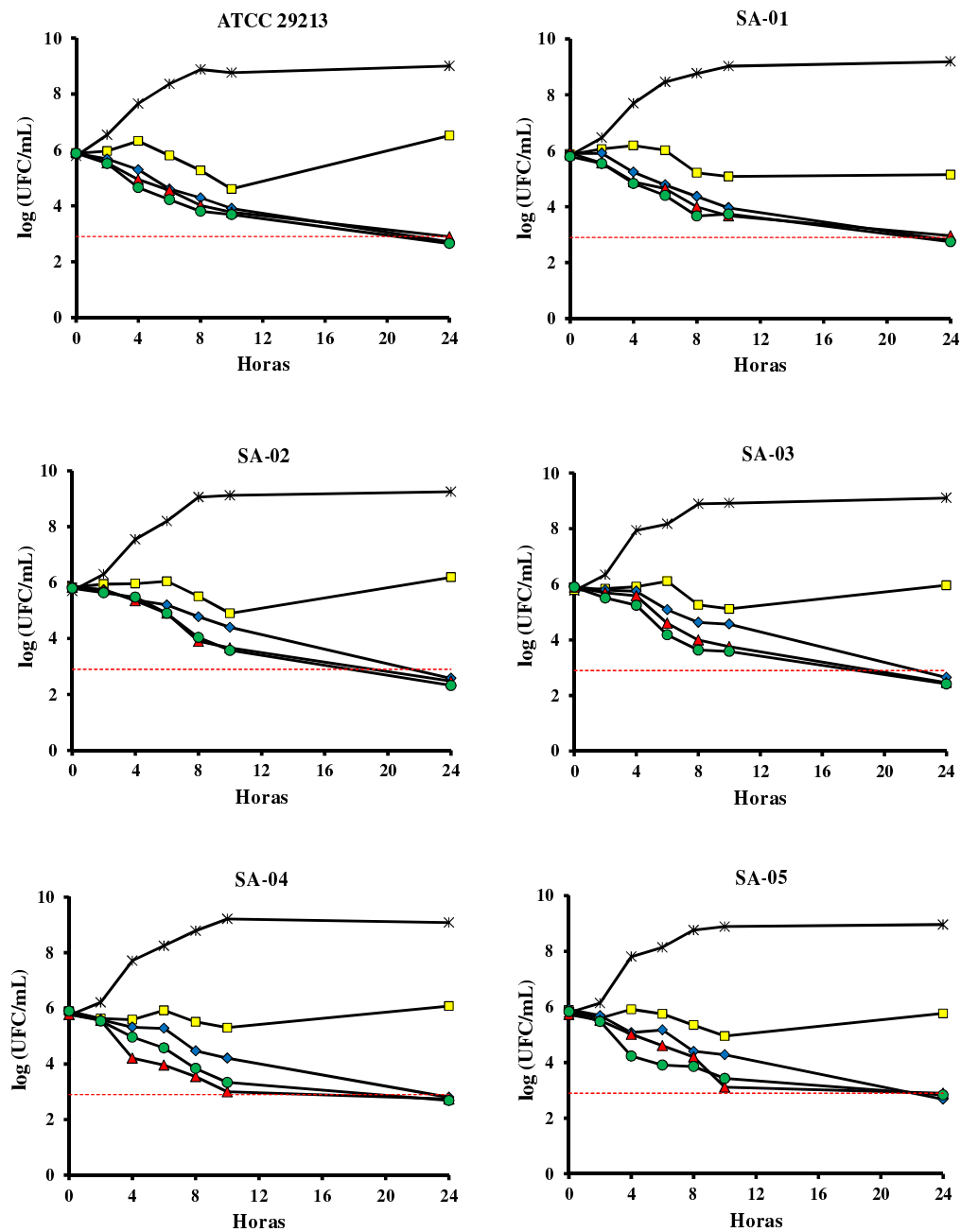


Figura 7. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas a pH 7,4. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: * crecimiento control; ■ 0,5 x CIM; ◆ 1 x CIM; ▲ 2 x CIM; ● 4 x CIM. La línea punteada horizontal corresponde a una reducción de 3 log₁₀ respecto del número inicial de bacterias viables.

La actividad antibiótica de cefquinoma se evaluó teniendo en cuenta la eficacia acumulativa de sus concentraciones en el medio de cultivo, entendiéndose ésta como la cantidad de bacterias eliminadas al final del experimento respecto del número inicial de bacterias (Tabla 2). Si bien la actividad de cefquinoma se hizo manifiesta en todas las concentraciones evaluadas, las equivalentes a 4 x CIM no presentaron mayores eficacias que las observadas a concentraciones iguales a 2 x CIM, las que al final del ensayo llevaron a una reducción del 99,9% respecto al número inicial de bacterias viables.

De la observación de las gráficas presentadas en la figura 8 se deduce que las seis cepas estudiadas presentaron una cinética de muerte bacteriana similar; esto se corrobora al observarse similares valores de coeficiente de variación (CV) al comparar la carga bacteriana de las seis cepas a los distintos tiempos de muestreo en las curvas de crecimiento y muerte. En la tabla 3 se presenta el rango entre el cual fluctuaron los valores de CV para cada curva a los diferentes tiempos de muestreo.

Tabla 2. Eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas. La eficacia de cada concentración se expresa como reducción del \log_{10} del conteo bacteriano observado al final, respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	0,5 x CIM	1 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
0	-	-	-	-
2	-4,94 \pm 42,93	26,54 \pm 16,12	40,99 \pm 15,39	50,60 \pm 10,79
4	-53,36 \pm 82,08	67,12 \pm 18,83	79,21 \pm 17,60	83,18 \pm 16,55
6	-30,68 \pm 52,53	83,59 \pm 9,42	94,05 \pm 3,51	95,54 \pm 4,23
8	67,50 \pm 9,84	95,53 \pm 2,20	98,59 \pm 0,83	99,03 \pm 0,41
10	84,62 \pm 7,31	97,49 \pm 1,32	99,48 \pm 0,25	99,45 \pm 0,21
24	-78,22 \pm 146,99	99,93 \pm 0,02	99,91 \pm 0,04	99,94 \pm 0,03

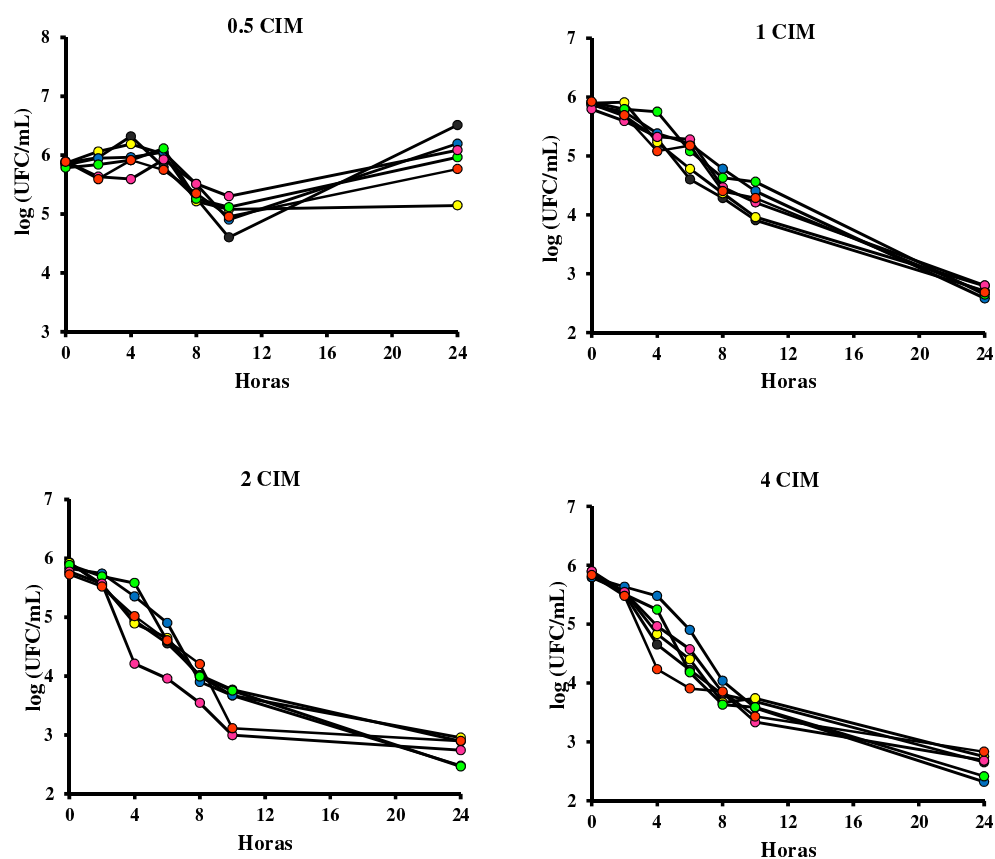


Figura 8. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en \log_{10} UFC/mL. Símbolos: ● ATCC 29213; ● SA-01; ● SA-02; ● SA-03; ● SA-04; ● SA-05.

Tabla 3: Rangos de valores de CV en la carga bacteriana a distintos tiempos de muestreo en las curvas de crecimiento y muerte de seis cepas de *S. aureus* expuestas a diferentes concentraciones de cefquinoma a un pH de 7,4.

Concentración	CV (%)
Crecimiento	0,80 - 2,37
0,5 x CIM	0,68 - 26,39
1 x CIM	0,80 - 6,13
2 x CIM	1,43 - 9,44
4 x CIM	0,83 - 7,91

En la figura 9 y en la tabla 4 se muestra la actividad antimicrobiana de cefquinoma frente a seis cepas de *S. aureus* ajustando el pH del medio de cultivo a 6,5 con ácido ortofosfórico.

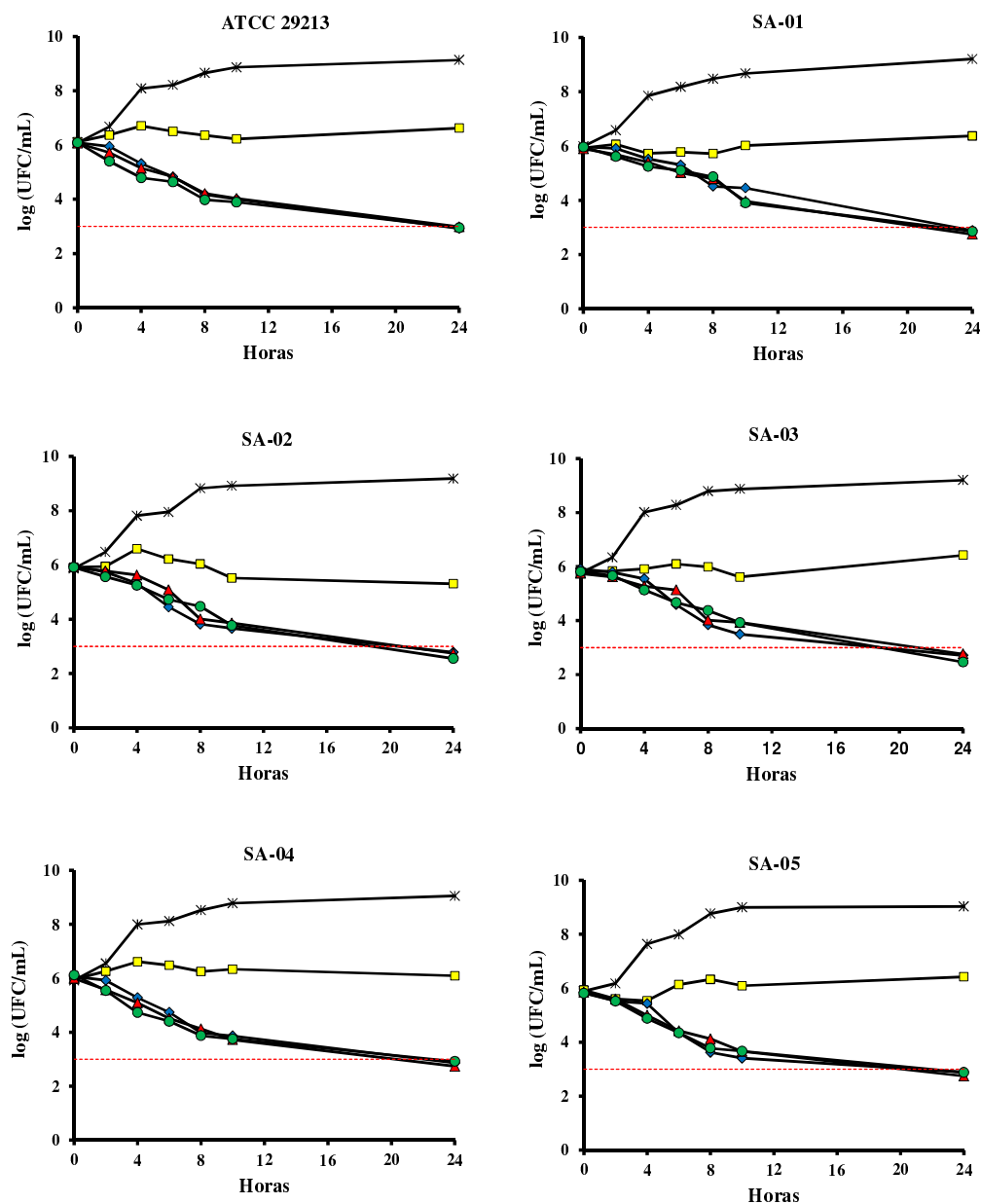


Figura 9. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas a pH 6,5. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: * crecimiento control; ■ 0,5 x CIM; ◆ 1 x CIM; ▲ 2 x CIM; ● 4 x CIM. La línea punteada horizontal corresponde a una reducción de 3 log₁₀ respecto del número inicial de bacterias viables.

Tabla 4. Eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas en medio de cultivo con pH ajustado a 6,5. La eficacia de cada concentración se expresa como reducción del \log_{10} del conteo bacteriano observado al final, respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	0,5 x CIM	1 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
0	-	-	-	-
2	-29,11 \pm 53,70	30,32 \pm 13,30	42,60 \pm 14,27	56,82 \pm 17,91
4	-156,84 \pm 199,65	70,87 \pm 11,74	74,11 \pm 15,82	86,20 \pm 8,00
6	-101,09 \pm 85,78	92,82 \pm 7,23	89,25 \pm 8,12	93,93 \pm 4,30
8	-61,07 \pm 62,64	98,70 \pm 1,14	97,43 \pm 2,55	97,07 \pm 2,87
10	-21,97 \pm 67,89	99,04 \pm 1,04	99,06 \pm 0,36	99,22 \pm 0,29
24	-149,55 \pm 146,34	99,92 \pm 0,02	99,92 \pm 0,04	99,93 \pm 0,03

Al evaluar la eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre las seis cepas tras 24 horas de incubación, no se hallaron diferencias al incrementar las concentraciones por encima de la CIM, observándose en casi todos los casos una reducción de 3 \log_{10} respecto del conteo bacteriano inicial, lo cual permite inferir que la actividad de cefquinoma se mantiene a valores de pH ligeramente por debajo del fisiológico.

Al igual que en el caso anterior, la evolución temporal del número de bacterias viables obtenidas en las curvas de crecimiento y muerte bacteriana de las 5 cepas autóctonas de *S. aureus* mostró similitud con el comportamiento de la cepa ATCC (Figura 10). En la tabla 5 se muestra el rango en el que osciló el CV para las curvas de crecimiento y muerte a cada tiempo de muestreo.

Tabla 5: Rangos de valores de CV en la carga bacteriana a distintos tiempos de muestreo en las curvas de crecimiento y muerte de seis cepas de *S. aureus* expuestas a diferentes concentraciones de cefquinoma a un pH de 6,5.

Concentración	CV (%)
Crecimiento	1,27 - 2,80
0,5 x CIM	1,33 - 19,18
1 x CIM	1,83 - 9,03
2 x CIM	1,39 - 6,56
4 x CIM	1,63 - 9,93

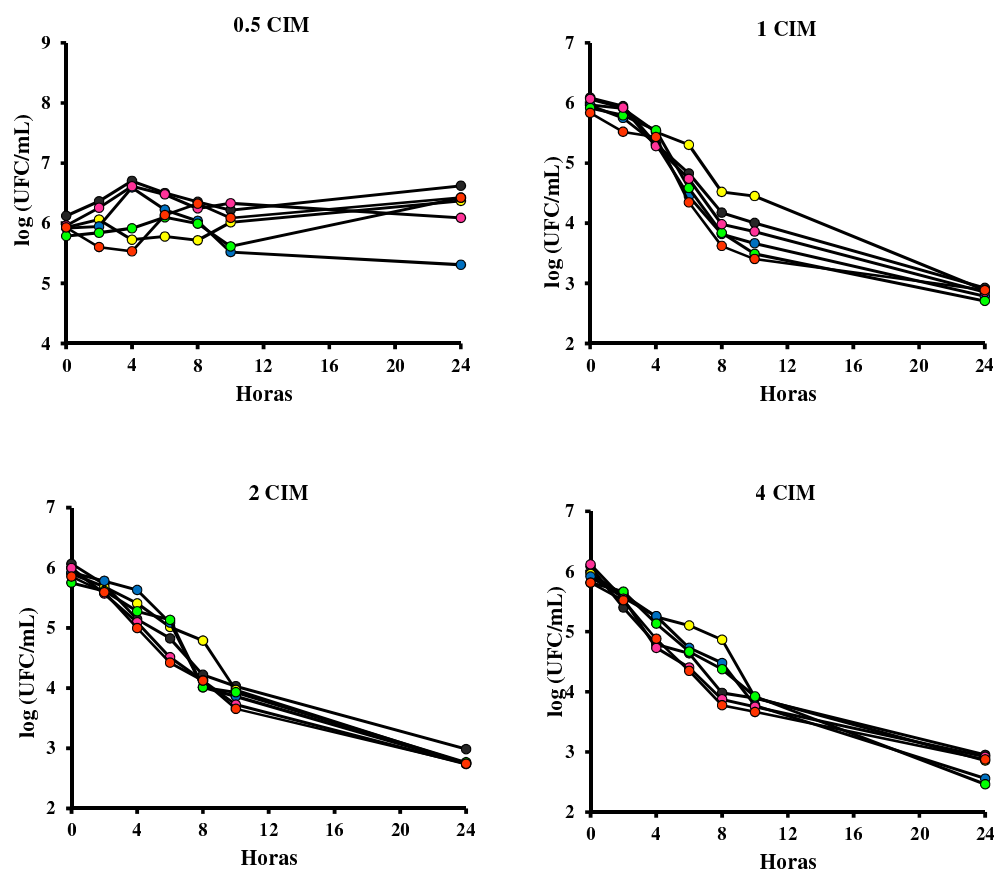


Figura 10. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0.5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas a pH 6,5. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● ATCC 25.923; ● SA-01; ● SA-02; ● SA-03; ● SA-04; ● SA-05.

La evolución temporal de la masa bacteriana de las seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas a pH de 5,5 puede observarse en la figura 11. Como en los casos anteriores, no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) en la eficacia del antimicrobiano al incrementar la concentración a valores 4 veces la CIM, tal como se aprecia en la tabla 6.

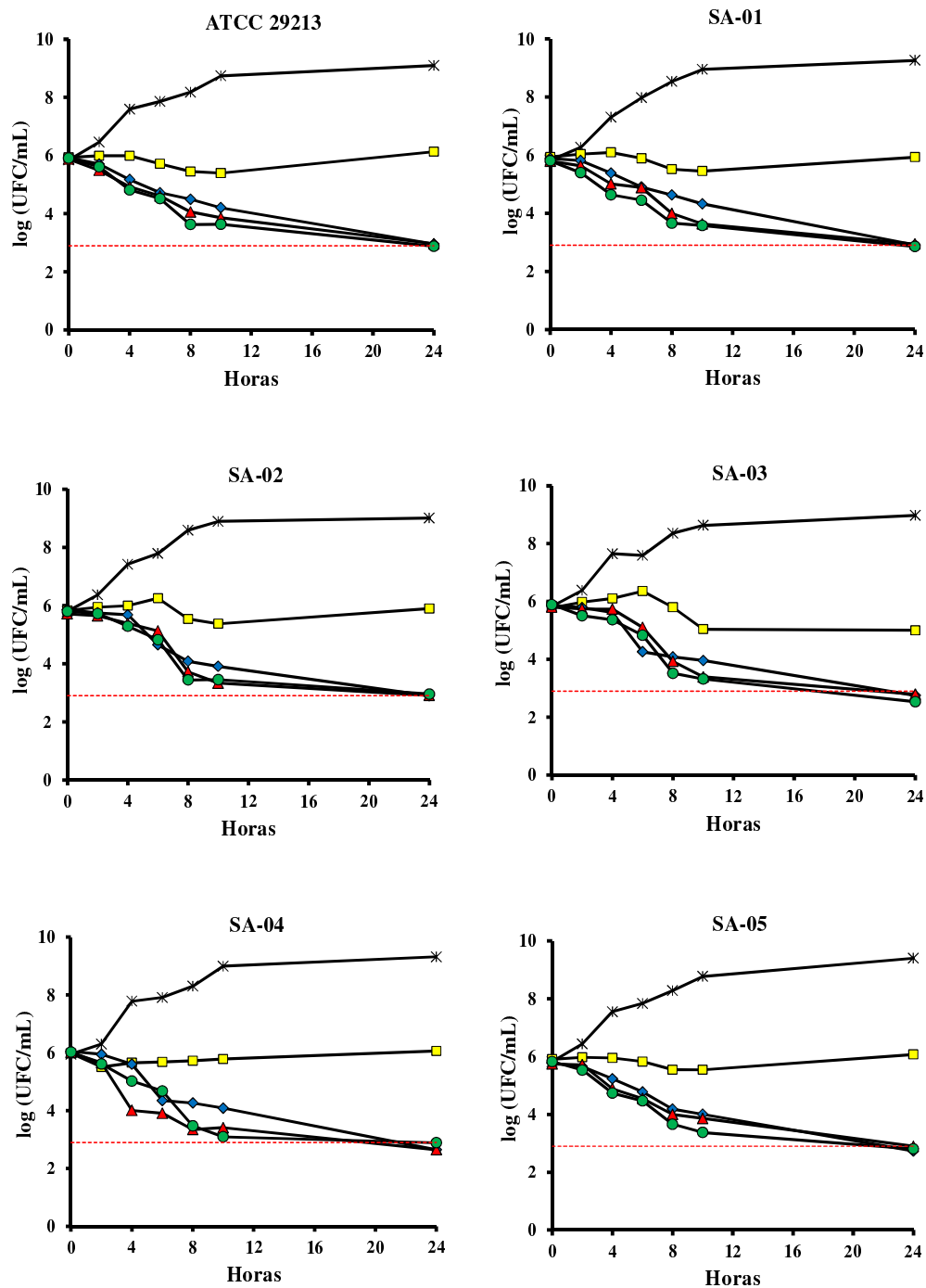


Figura 11. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas a pH 5,5. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: * crecimiento control; ■ 0,5 x CIM; ◆ 1 x CIM; ▲ 2 x CIM; ● 4 x CIM. La línea horizontal corresponde a una reducción de 3 log₁₀ respecto del número inicial de bacterias viables.

Tabla 6. Eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas en medio de cultivo con pH ajustado a 5,5. La eficacia de cada concentración se expresa como reducción del \log_{10} del conteo bacteriano observado al final, respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	0,5 x CIM	1 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
0	-	-	-	-
2	-13,07 \pm 42,12	23,00 \pm 8,60	30,06 \pm 22,71	49,20 \pm 17,21
4	-28,79 \pm 54,15	60,32 \pm 18,59	70,93 \pm 31,54	84,29 \pm 11,63
6	-54,52 \pm 135,40	93,78 \pm 3,57	88,27 \pm 9,46	93,89 \pm 2,82
8	45,91 \pm 25,93	97,21 \pm 1,56	98,75 \pm 0,57	99,49 \pm 0,17
10	63,17 \pm 15,17	98,36 \pm 0,64	99,33 \pm 0,40	99,61 \pm 0,18
24	-8,97 \pm 49,88	99,90 \pm 0,05	99,88 \pm 0,04	99,91 \pm 0,03

En este ensayo, tal como se puede apreciar en la figura 12, la evolución temporal del número de bacterias viables fue similar en las seis cepas. En la Tabla 7 se muestra el rango en el que varió el CV para las curvas de crecimiento y muerte a cada tiempo de muestreo. Es de destacar, que al igual que en los casos anteriores, la mayor dispersión se presentó a las 24 horas en las cepas expuestas a concentraciones de 0,5 x CIM, lo cual evidencia un comportamiento menos predecible al emplear concentraciones sub-CIM.

Tabla 7: Rangos de valores de CV de la carga bacteriana a distintos tiempos de muestreo en las curvas de crecimiento y muerte de seis cepas de *S. aureus* expuestas a diferentes concentraciones de cefquinoma a un pH de 5,5.

Concentración	CV (%)
Crecimiento	1,21 - 2,23
0,5 x CIM	3,34 - 24,45
1 x CIM	1,75 - 8,21
2 x CIM	1,59 - 10,19
4 x CIM	2,01 - 6,04

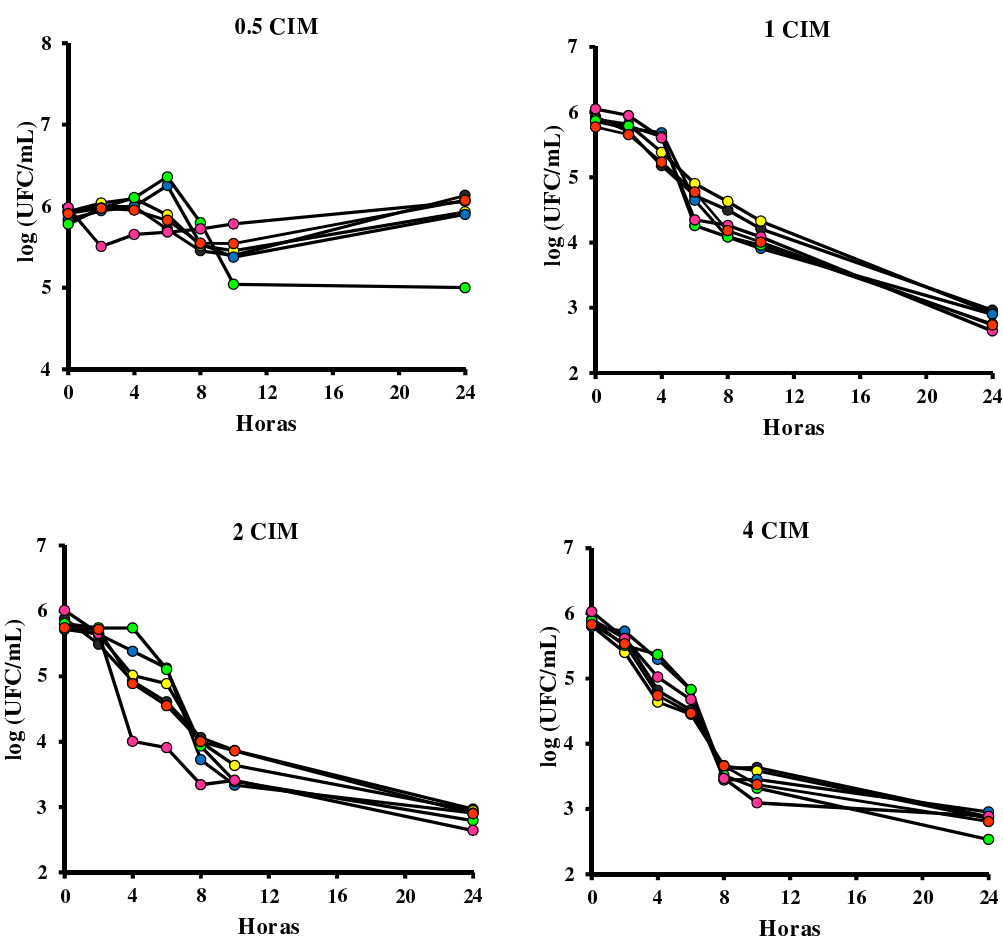


Figura 12. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas a pH 5,5. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/ml. Símbolos: ● ATCC 25923; ● SA-01; ● SA-02; ● SA-03; ● SA-04; ● SA-05.

No se hallaron diferencias en la evolución temporal del número de bacterias viables de las seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM en valores de pH de 7,4, 6,5 y 5,5.

La evolución temporal de las poblaciones bacterianas observadas para cada valor de pH en función de las diferentes concentraciones de cefquinoma ensayadas se presentan en las figuras 13 a 16.

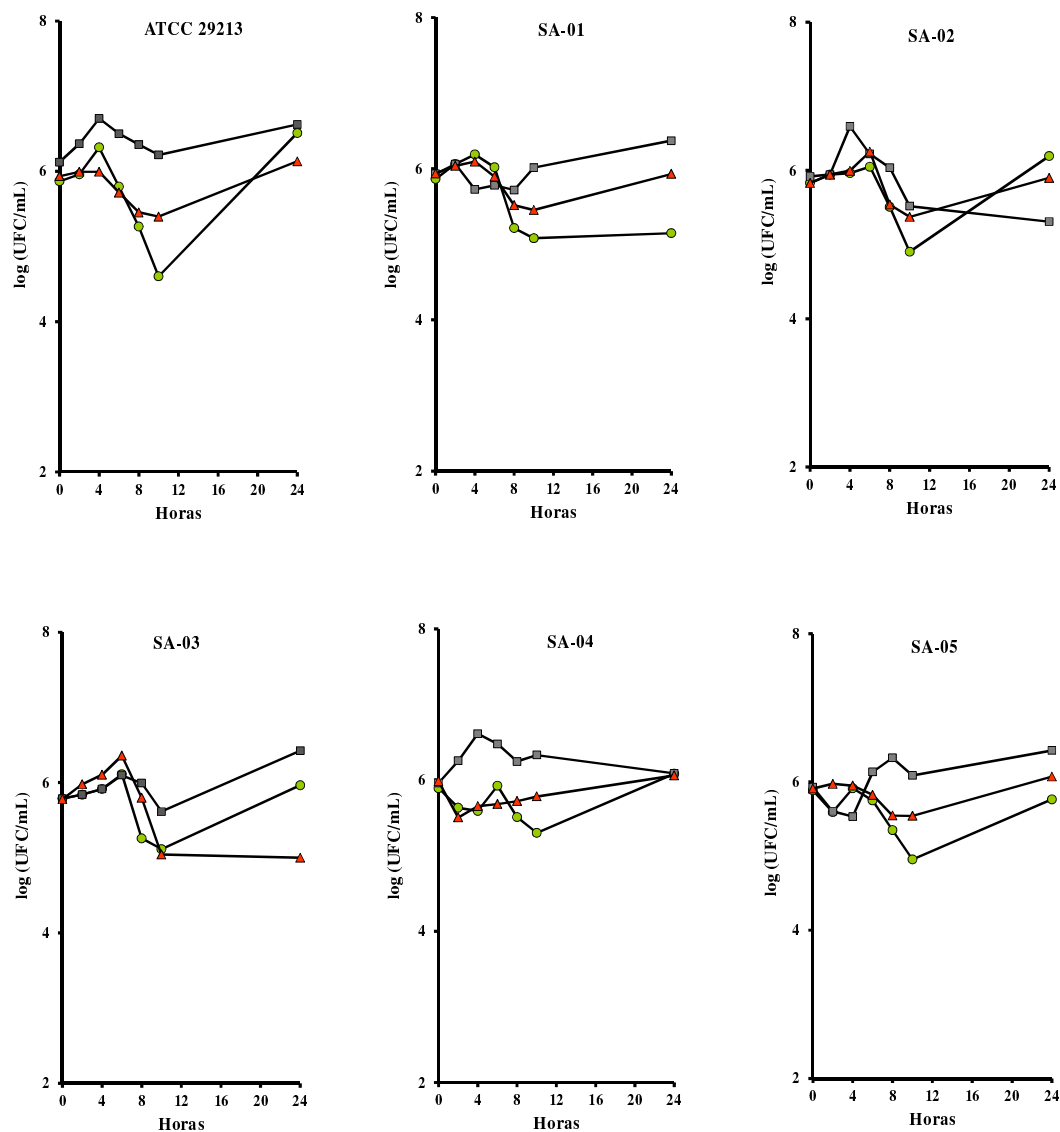


Figura 13.- Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM durante 24 horas a diferentes valores de pH en el medio de cultivo. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● pH 7,4; ■ pH 6,5; ▲ pH 5,5.

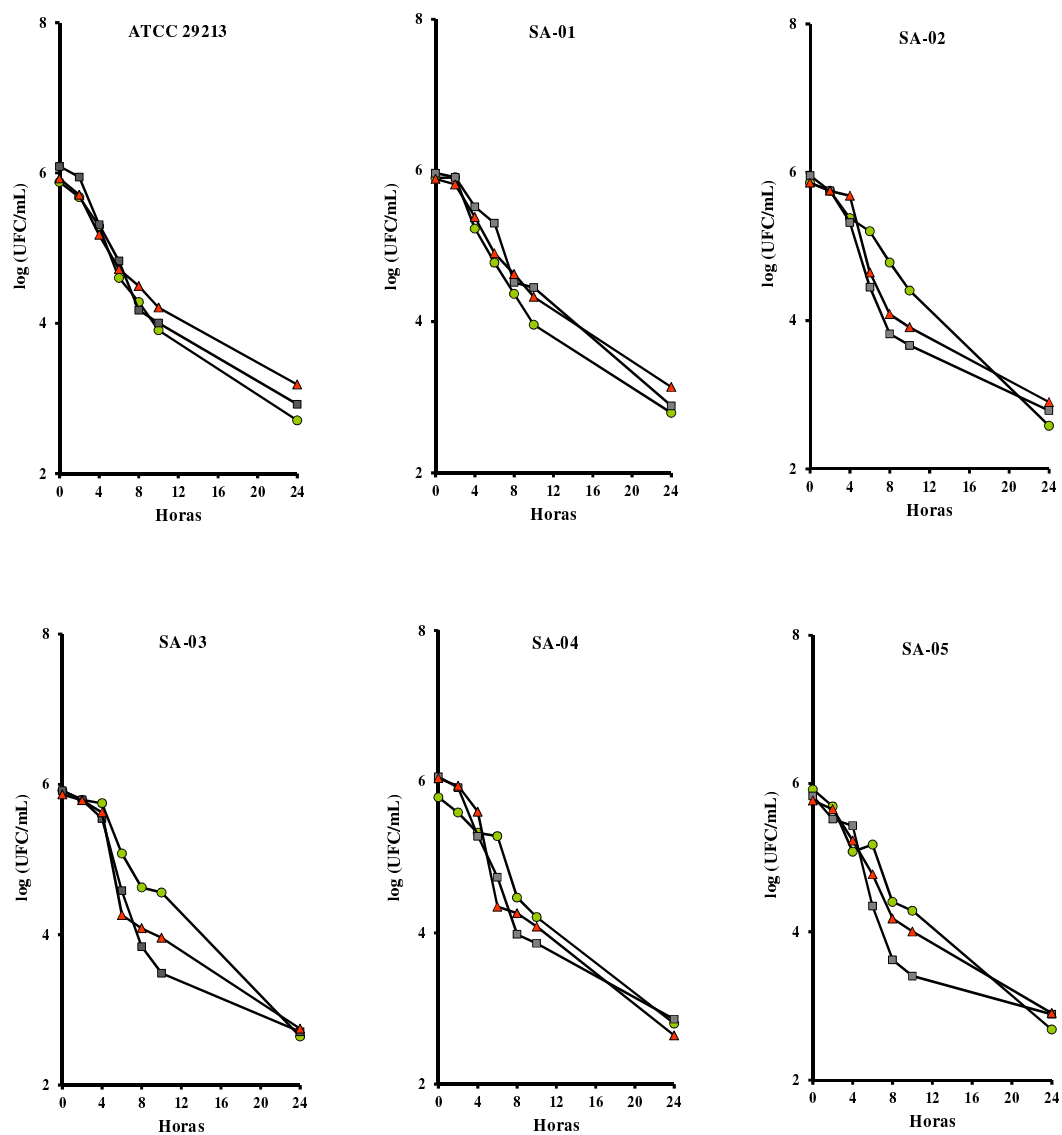


Figura 14. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 1 x CIM durante 24 horas a diferentes valores de pH en el medio de cultivo. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● pH 7,4; ■ pH 6,5; ▲ pH 5,5.

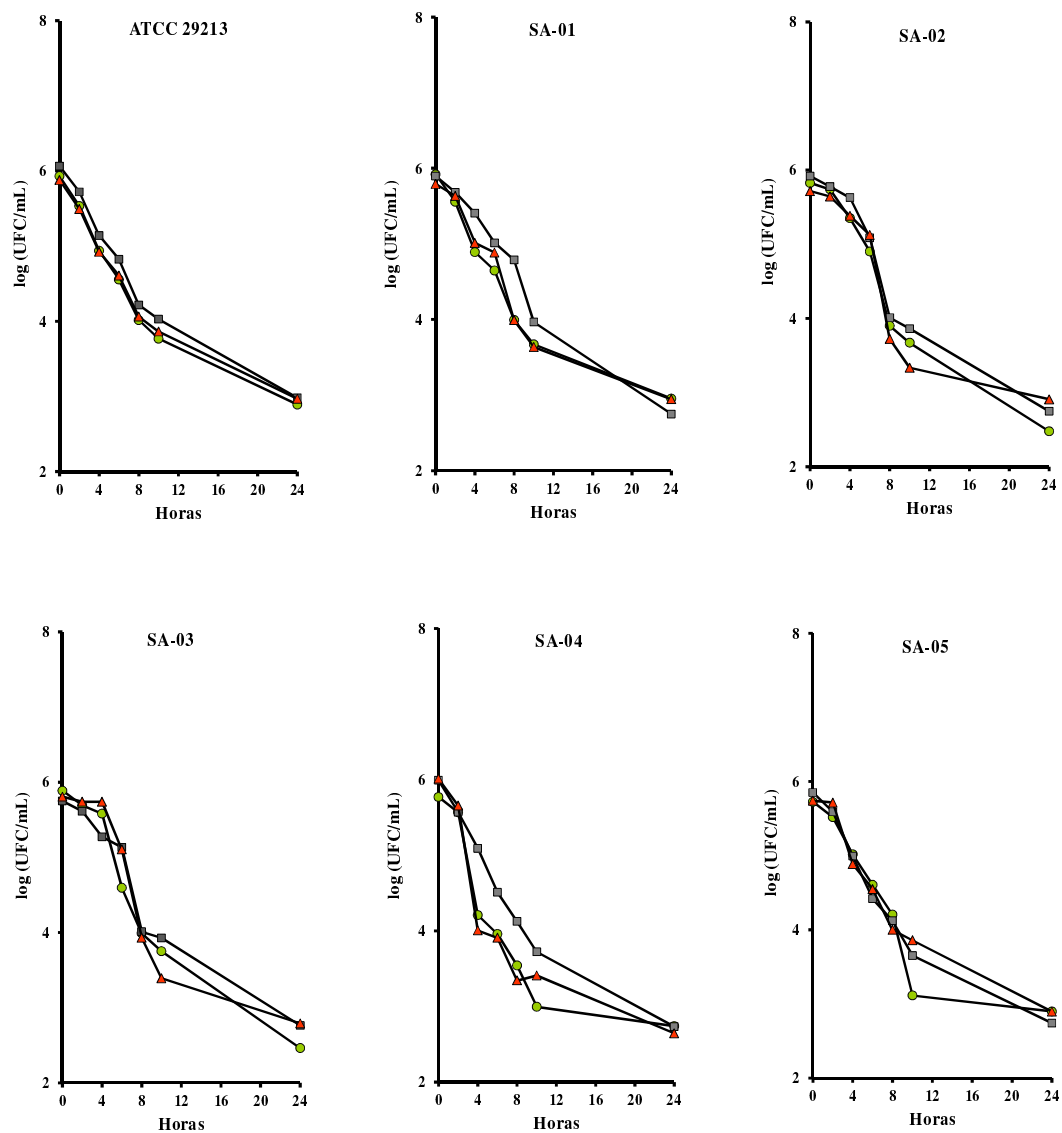


Figura 15. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 2 x CIM durante 24 horas a diferentes valores de pH en el medio de cultivo. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● pH 7,4; ■ pH 6,5; ▲ pH 5,5.

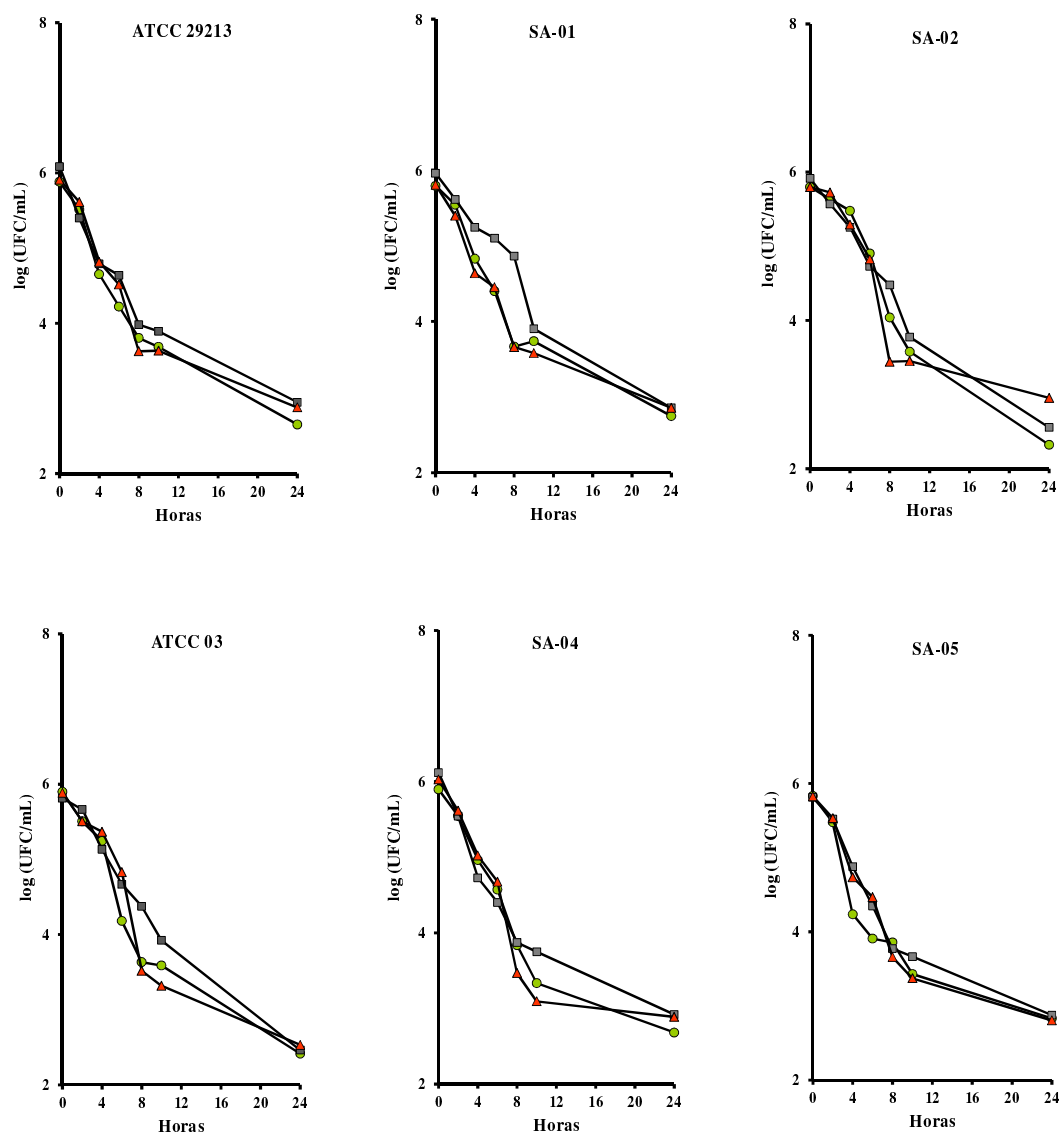


Figura 16. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 4 x CIM durante 24 horas a diferentes valores de pH en el medio de cultivo. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en \log_{10} UFC/mL. Símbolos: ● pH 7,4; ■ pH 6,5; ▲ pH 5,5.

IV.3.- Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma

IV.3.1.- Evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del suero bovino

Los resultados del proteinograma por electroforesis de los pools de SBA y STsC utilizados para la evaluación *in vitro* de la actividad bactericida intrínseca del suero de bovinos se presentan en la figura 17 y la tabla 8.

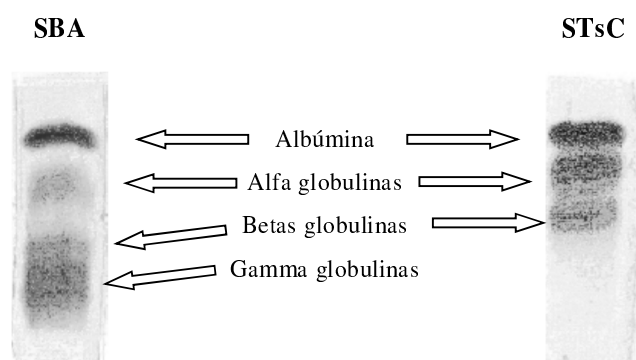


Figura 17: Fracciones proteicas de pool de sueros proveniente de bovinos adultos (SBA) y de pool de sueros agamaglobulinémicos de terneros sin calostro (STsC) separadas por electroforesis.

Tabla 8. Proteinogramas de pool de sueros proveniente de bovinos adultos (SBA) y de pool de sueros agamaglobulinémicos de terneros sin calostro (STsC) obtenidos por electroforesis.

Fracciones proteicas	SBA	STsC
Proteínas totales	5,69 g%	4,59 g%
Albúmina	2,48 g%	2,86 g%
Globulinas totales	3,21 g%	1,73 g%
Alfa globulinas	0,48 g%	0,86 g%
Beta globulinas	0,52 g%	0,71 g%
Gamma globulinas	2,21 g%	0,16 g%
Relación albúminas/globulinas	0,80 g%	1,70 g%

El pool de STsC presentó bajos niveles de globulinas totales a causa de la baja concentración de gammaglobulinas respecto del suero proveniente de un animal inmunocompetente.

La evolución temporal de las masas bacterianas de *S. aureus* (ATCC 29213) en CMH, CMH:STsC 50:50 y CMH:SBA 50:50 durante 10 horas se presentan en la figura 18.

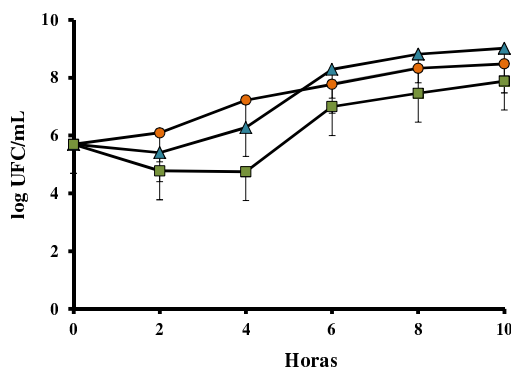


Figura 18. Representación semilogarítmica de la evolución temporal de la masa bacteriana de *S. aureus* (ATCC 29213) en CMH (●), CMH:STsC 50:50 (▲) y CMH:SBA 50:50 (■) durante 10 horas. En cada tiempo de muestreo los datos están expresados como \log_{10} del número de UFC/mL. Los valores se presentan como promedio \pm desvío estándar.

Puede observarse que esta cepa de *S. aureus* presentó en el suero de ternero sin calostro un desarrollo significativamente superior al registrado en el medio de cultivo convencional, tal como lo demuestra la mayor masa bacteriana observada en CMH:STsC respecto a CMH. Por otra parte, el desarrollo bacteriano en CMH:SBA 50:50 fue menor ($p < 0,05$).

La eficacia antibacteriana del medio de cultivo que incorporó el pool de sueros agamaglobulinémicos (CMH:STsC 50:50) no pudo ser estimada ya que como se expresó anteriormente, la sobrevivencia de esta bacteria en CMH:STsC 50:50 fue del $347,5 \pm 204,3\%$ respecto de la observada en CMH (Tabla 9). Sin embargo, la eficacia antibacteriana del medio de cultivo que incorporó el pool de sueros de animales inmunocompetentes (CMH:SBA 50:50) fue de $74,7 \pm 20,5\%$.

Tabla 9. Sobrevida bacteriana de *S. aureus* (ATCC 29213) en las curvas de crecimiento realizadas en CMH:STsC 50:50 y CMH/SBA 50:50. Los valores están expresados como porcentaje del número de bacterias sobrevivientes al final del ensayo respecto del desarrollo de una masa bacteriana observada en CMH.

Medio de cultivo	Porcentaje de sobrevida
CMH:STsC 50:50	347,5 ± 204,3%*
CMH:SBA 50:50	25,3 ± 20,5%*

* indica diferencias significativas.

IV.3.2.- Determinación de la CIM en presencia de suero bovino

Como se mencionó anteriormente, los valores de CIM de cefquinoma en CMH sobre las cepas de *S. aureus* fluctuaron entre 0,512 y 1,024 µg/mL, en tanto que luego de la incorporación de SBA, la misma descendió a valores de 0,256 y 0,512 µg/mL dependiendo de la cepa estudiada, lo que determinó que en las seis cepas evaluadas el valor de la CIM se redujera en un 50% (Figura 19).

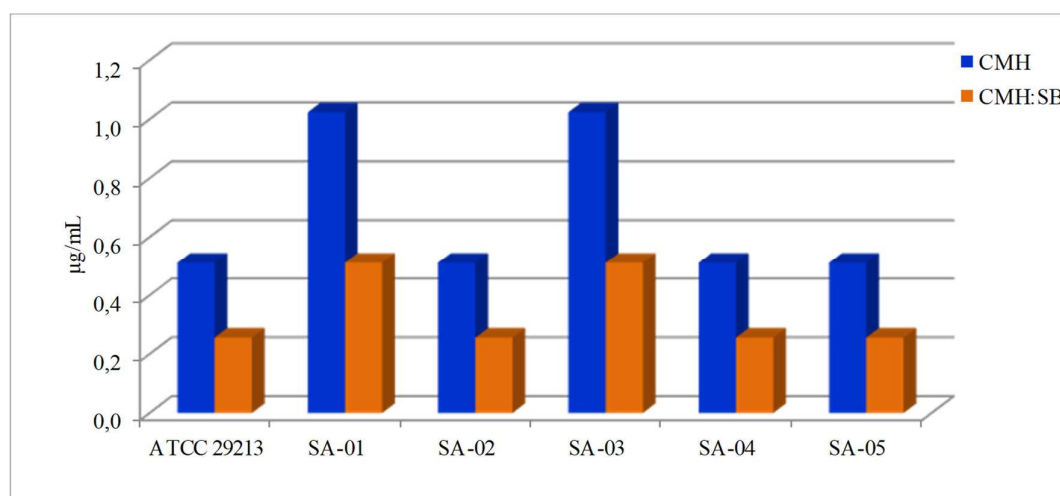


Figura 19: Valores de concentración inhibitoria mínima (µg/mL) de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* en presencia de SBA.

Se encontraron diferencias ($p = 0,0067$) entre los valores de CIM en CMH y los cultivos efectuados en caldo al que se le adicionaba SBA. Los resultados muestran que la actividad antibacteriana de cefquinoma fue potenciada por los factores de respuesta inmune presentes en el suero de los bovinos inmunocompetentes.

IV.3.3.- Curvas de crecimiento y muerte bacteriana en presencia de suero bovino

La incorporación de SBA al caldo de cultivo determinó que la CIM de cefquinoma frente a las seis cepas de *S. aureus* se redujera en un 50%. A fin de estudiar las consecuencias de este fenómeno sobre la evolución de una población bacteriana es que se construyeron curvas de crecimiento para cada una de estas cepas. En las mismas se observó una reducción en el desarrollo de la población bacteriana en presencia de SBA respecto de lo observado en CMH. La eficacia antibacteriana del SBA expresada como porcentaje de reducción del desarrollo de la masa bacteriana respecto al desarrollo en CMH para las seis cepas a las 10 horas fue del $61,95 \pm 13,99\%$, en tanto que a las 24 horas fue de $59,68 \pm 23,99\%$.

Los valores de eficacia total de cefquinoma en presencia de SBA observados en cada una de las concentraciones testeadas se presentan en la tabla 10, en tanto que la evolución temporal de la masa bacteriana de las seis cepas de *S. aureus* se presentan en la figura 20.

Tabla 10. Eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas en medio de cultivo al cual se le incorporó SBA. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	CMH:SBA	0,5 x CIM	1 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
0	-	-	-	-	-
2	$37,99 \pm 12,82$	$42,30 \pm 7,59$	$51,94 \pm 30,77$	$92,40 \pm 2,64$	$95,22 \pm 1,57$
4	$47,33 \pm 23,56$	$94,93 \pm 1,83$	$97,84 \pm 1,12$	$99,43 \pm 0,17$	$99,80 \pm 0,23$
6	$-2395,63 \pm 2023,01$	$99,09 \pm 1,46$	$99,24 \pm 0,14$	$99,82 \pm 2,82$	$99,95 \pm 0,03$
8	$-11547,55 \pm 6316,39$	$99,84 \pm 0,06$	$99,88 \pm 0,04$	$99,91 \pm 0,04$	$99,95 \pm 0,02$
10	$-67977,97 \pm 19340,18$	$99,93 \pm 0,06$	$99,90 \pm 0,05$	$99,96 \pm 0,01$	$99,95 \pm 0,04$
24	$-90997,05 \pm 47501,65$	$99,96 \pm 0,02$	$99,97 \pm 0,01$	$99,98 \pm 0,01$	$99,99 \pm 0,00$

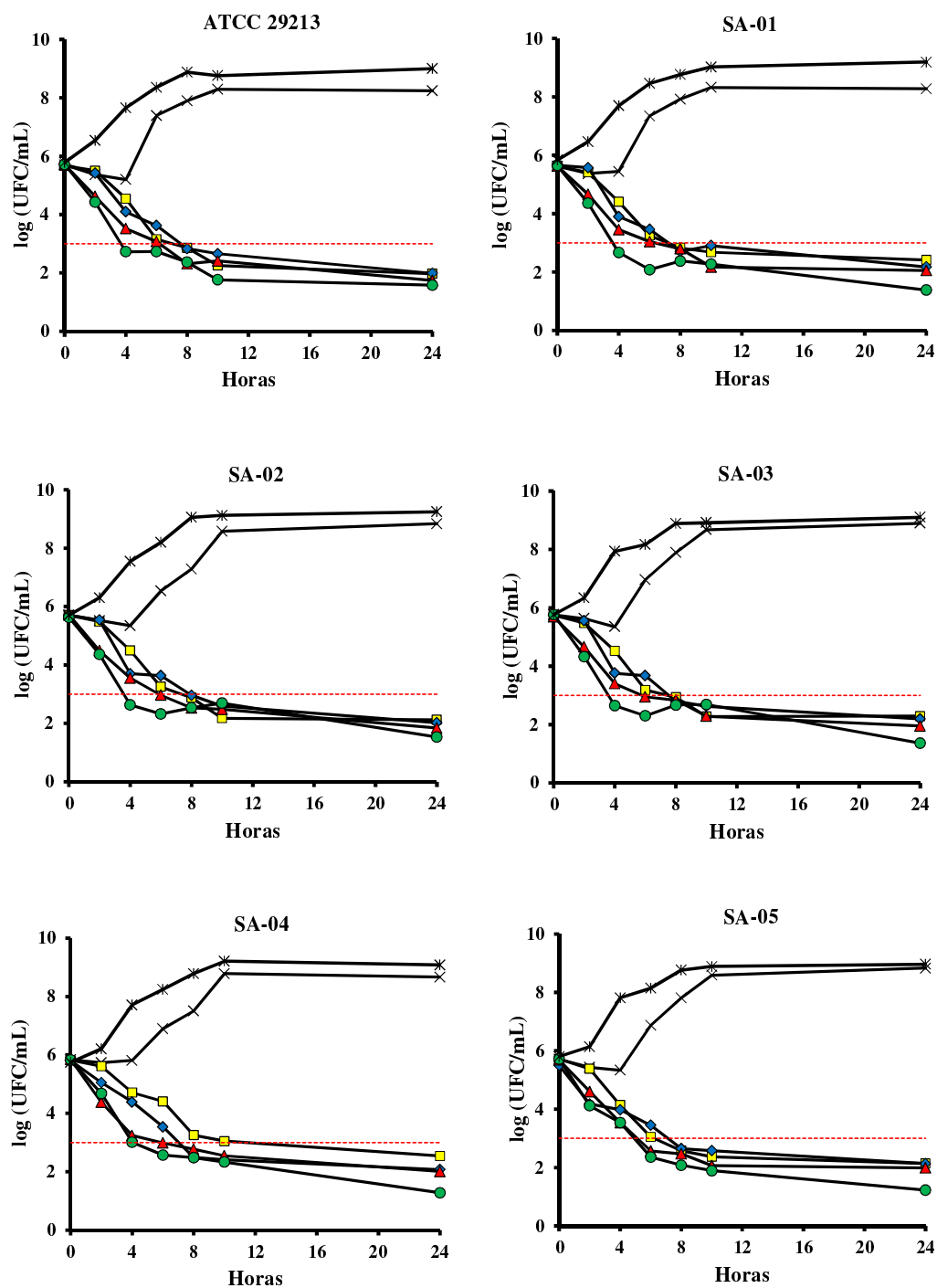


Figura 20. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas en CMH al que se le incorporó SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: * crecimiento control en CMH; × crecimiento control en CMH:SBA; ■ 0,5 x CIM; ◆ 1 x CIM; ▲ 2 x CIM; ● 4 x CIM. La línea punteada horizontal corresponde a una reducción de 3 log₁₀ respecto del log₁₀ del conteo bacteriano inicial.

Las curvas de crecimiento y muerte bacteriana no presentaron diferencias entre las seis cepas utilizadas en el ensayo (Figura 21). En la tabla 11 se muestra el rango en el que osciló el CV para las curvas de crecimiento y muerte a cada tiempo de muestreo.

Tabla 11: Rangos de valores de CV de la carga bacteriana a distintos tiempos de muestreo en las curvas de crecimiento y muerte de seis cepas de *S. aureus* expuestas a diferentes concentraciones de cefquinoma y SBA.

Concentración	CV (%)
Crecimiento en CMH	0,79 - 2,37
Crecimiento en CMH:SBA	1,27 - 4,59
0,5 x CIM	1,11 - 13,56
1 x CIM	1,85 - 10,46
2 x CIM	1,29 - 244
4 x CIM	1,27 - 17,08

No se observó incremento en la eficacia antibacteriana al aumentar la concentración de cefquinoma a valores superiores a la CIM. Por otra parte, los valores de eficacia total de cefquinoma en CMH:SBA observados en cada una de las concentraciones fijas fueron mayores a los valores de eficacia total observados en CMH, pudiéndose apreciar en las tablas 12 a 15 los puntos en los cuales se encontraron diferencias.

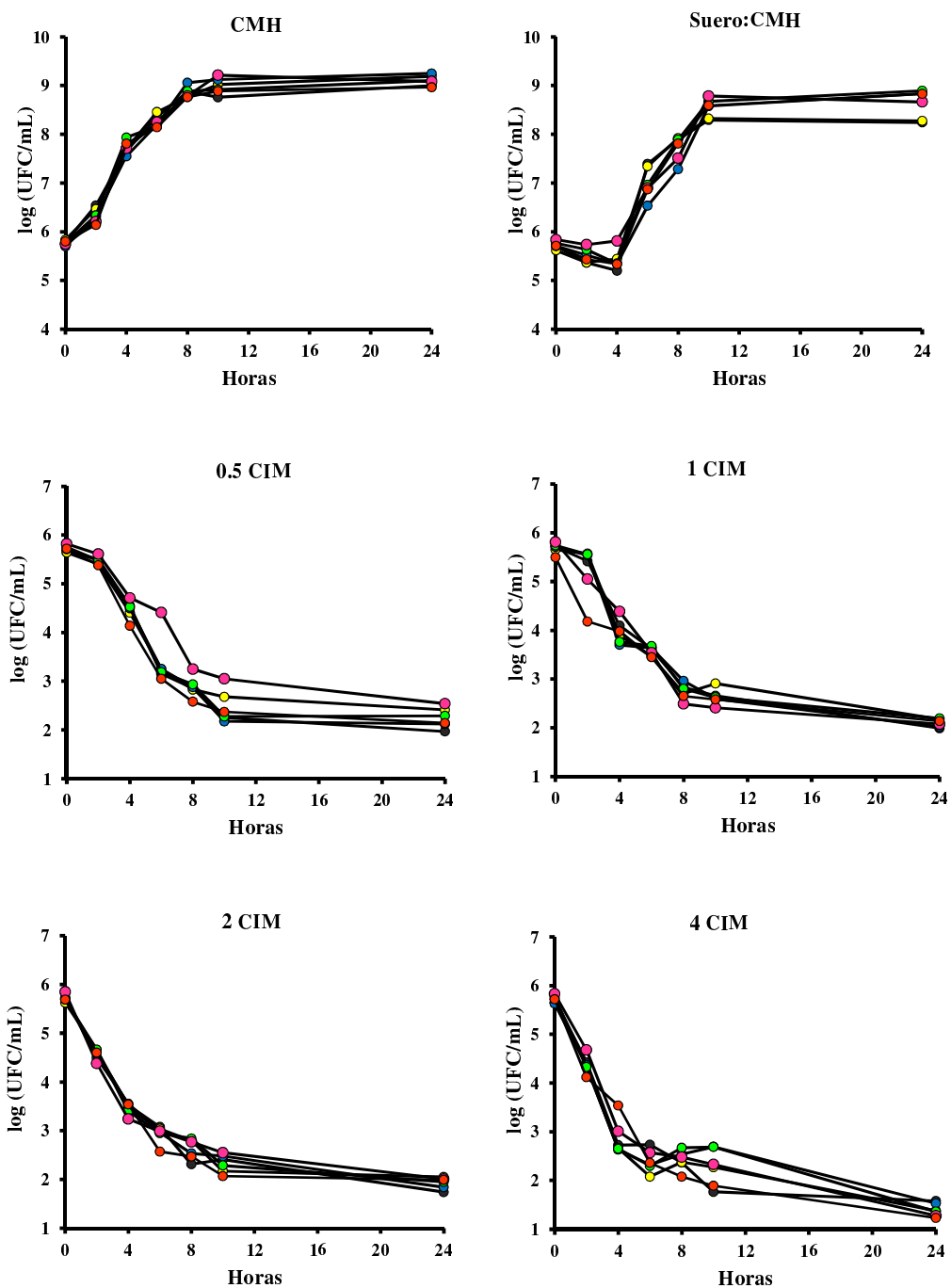


Figura 21. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 24 horas en CMH:SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ● ATCC 25.923; ● SA-01; ● SA-02; ● SA-03; ● SA-04; ● SA-05.

Tabla 12. Comparación de la eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones equivalentes a 0,5 x CIM durante 24 horas en CMH y CMH:SBA. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	CMH	CMH:SBA
2	-4,94 \pm 42,93	42,30 \pm 7,59
4	-53,36 \pm 82,08	94,93 \pm 1,83 (*)
6	-30,68 \pm 52,53	99,09 \pm 1,46 (*)
8	67,50 \pm 9,84	99,84 \pm 0,06 (*)
10	84,62 \pm 7,31	99,93 \pm 0,06 (*)
24	-78,22 \pm 146,99	99,96 \pm 0,02 (*)

Tabla 13. Comparación de la eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 1 x CIM durante 24 horas en CMH o CMH:SBA. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	CMH	CMH:SBA
2	26,54 \pm 16,12	51,94 \pm 30,77
4	67,12 \pm 18,83	97,84 \pm 1,12 (*)
6	83,59 \pm 9,42	99,24 \pm 0,14 (*)
8	95,53 \pm 2,20	99,88 \pm 0,04 (*)
10	97,49 \pm 1,32	99,90 \pm 0,05 (*)
24	99,93 \pm 0,02	99,97 \pm 0,01 (*)

Tabla 14. Comparación de la eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 2 x CIM durante 24 horas en CMH o CMH:SBA. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	CMH	CMH:SBA
2	40,99 \pm 15,39	92,40 \pm 2,64 (*)
4	79,21 \pm 17,60	99,43 \pm 0,17 (*)
6	94,05 \pm 3,51	99,82 \pm 2,82 (*)
8	98,59 \pm 0,83	99,91 \pm 0,04 (*)
10	99,48 \pm 0,25	99,96 \pm 0,01 (*)
24	99,91 \pm 0,04	99,98 \pm 0,01 (*)

Tabla 15. Comparación de la eficacia antibacteriana de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus* expuestas a concentraciones constantes equivalentes a 4 x CIM durante 24 horas en CMH o CMH:SBA. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar.

Horas	CMH	CMH:SBA
2	50,60 \pm 10,79	95,22 \pm 1,57 (*)
4	83,18 \pm 16,55	99,80 \pm 0,23 (*)
6	95,54 \pm 4,23	99,95 \pm 0,03 (*)
8	99,03 \pm 0,41	99,95 \pm 0,02 (*)
10	99,45 \pm 0,21	99,95 \pm 0,04 (*)
24	99,94 \pm 0,03	99,99 \pm 0,00 (*)

En las figuras 22 a 25 puede evidenciarse que concentraciones iguales a la mitad de la CIM en presencia de suero consiguieron reducir la masa bacteriana en 3 \log_{10} respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial, lo cual demuestra que a concentraciones inferiores a CIM la cefquinoma consigue desarrollar su actividad bactericida, lo cual pone en evidencia que factores inespecíficos presentes en el suero potencian su accionar.

Por otra parte, cuando las concentraciones fueron iguales o superiores a la CIM, si bien el test estadístico halló diferencias en el porcentaje de eficacia del fármaco al incorporar SBA al medio de cultivo (CMH), es preciso señalar que las mismas solamente cobran trascendencia clínica con concentraciones iguales a 4 veces la CIM, ya que en este caso se consigue un efecto de erradicación bacteriana al disminuir en 4 \log_{10} la carga microbiana inicial (Sidhu, y col., 2010), mientras que a 1 x CIM y 2 x CIM se consigue el efecto bactericida.

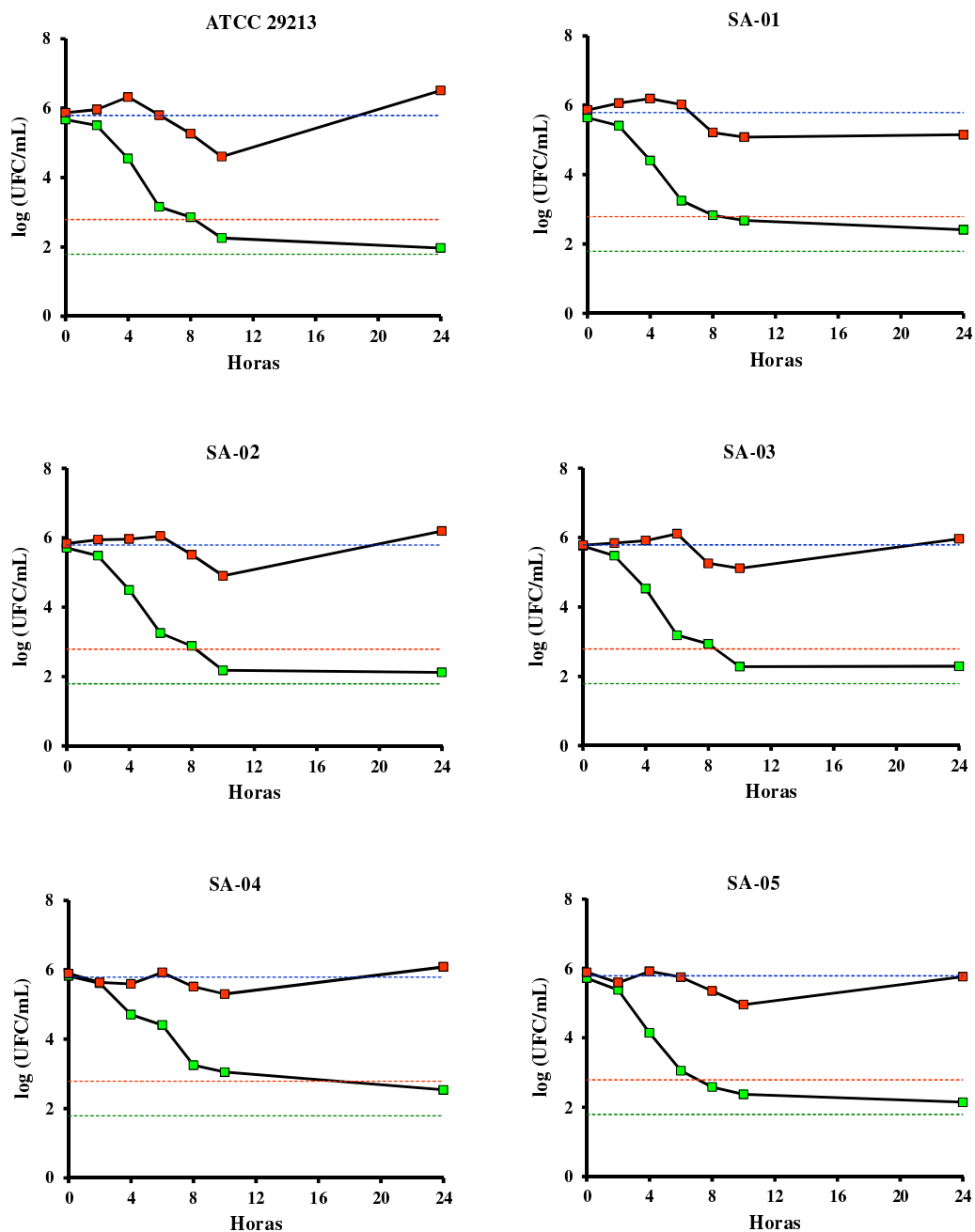


Figura 22. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM durante 24 horas en CMH y CMH:SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ■ crecimiento en CMH; ■ crecimiento en CMH:SBA. La línea punteada horizontal azul corresponde al log₁₀ del conteo de bacterias viables inicial, en tanto que las líneas roja y verde corresponden a una reducción de 3 y 4 log₁₀ respecto del log₁₀ del conteo bacteriano inicial respectivamente.

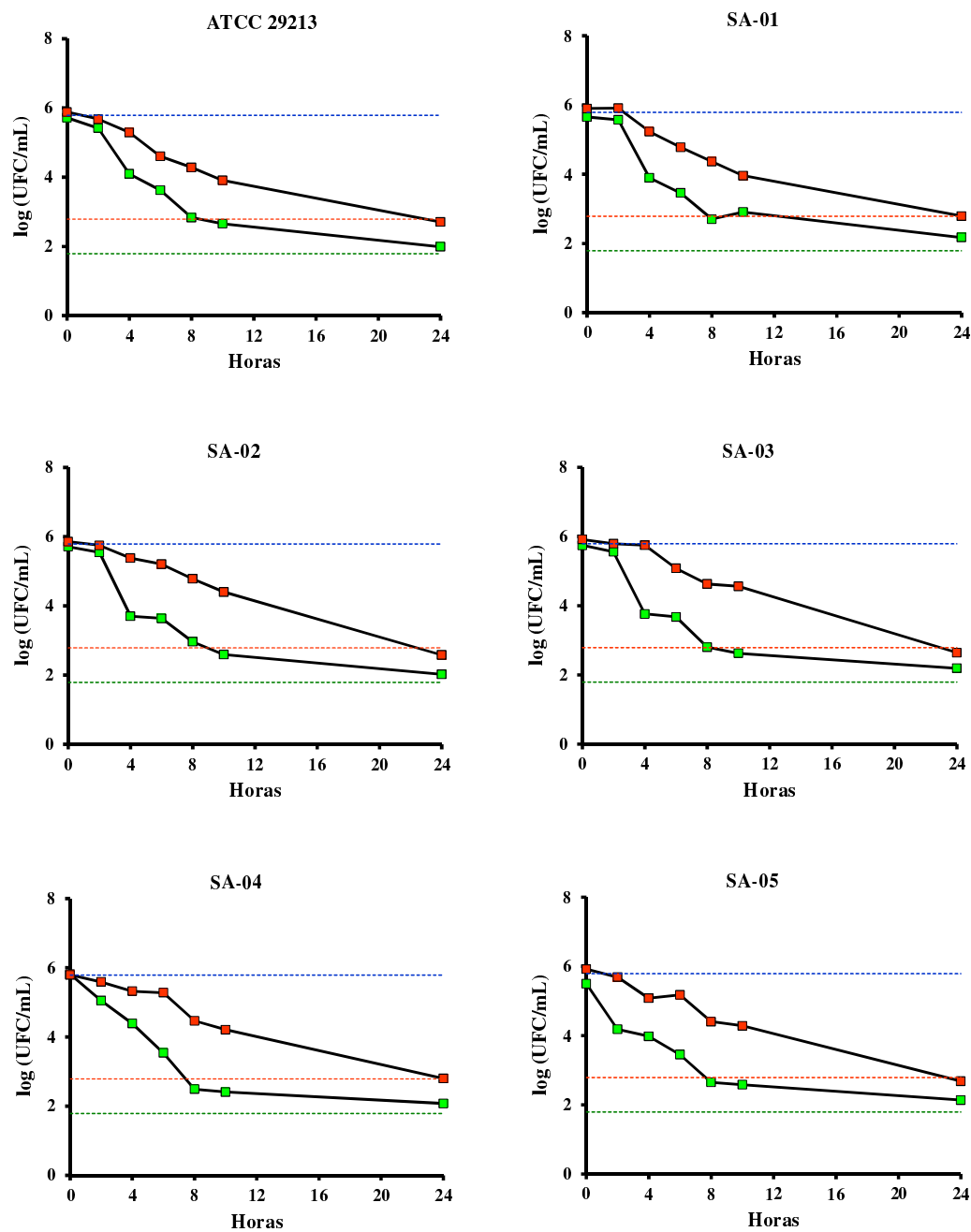


Figura 23. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 1 x CIM durante 24 horas en CMH y CMH:SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en \log_{10} UFC/mL. Símbolos: ■ crecimiento en CMH; ■ crecimiento en CMH:SBA. La línea punteada horizontal azul corresponde al \log_{10} del conteo de bacterias viables inicial, en tanto que las líneas roja y verde corresponden a una reducción de 3 y 4 \log_{10} respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial respectivamente.

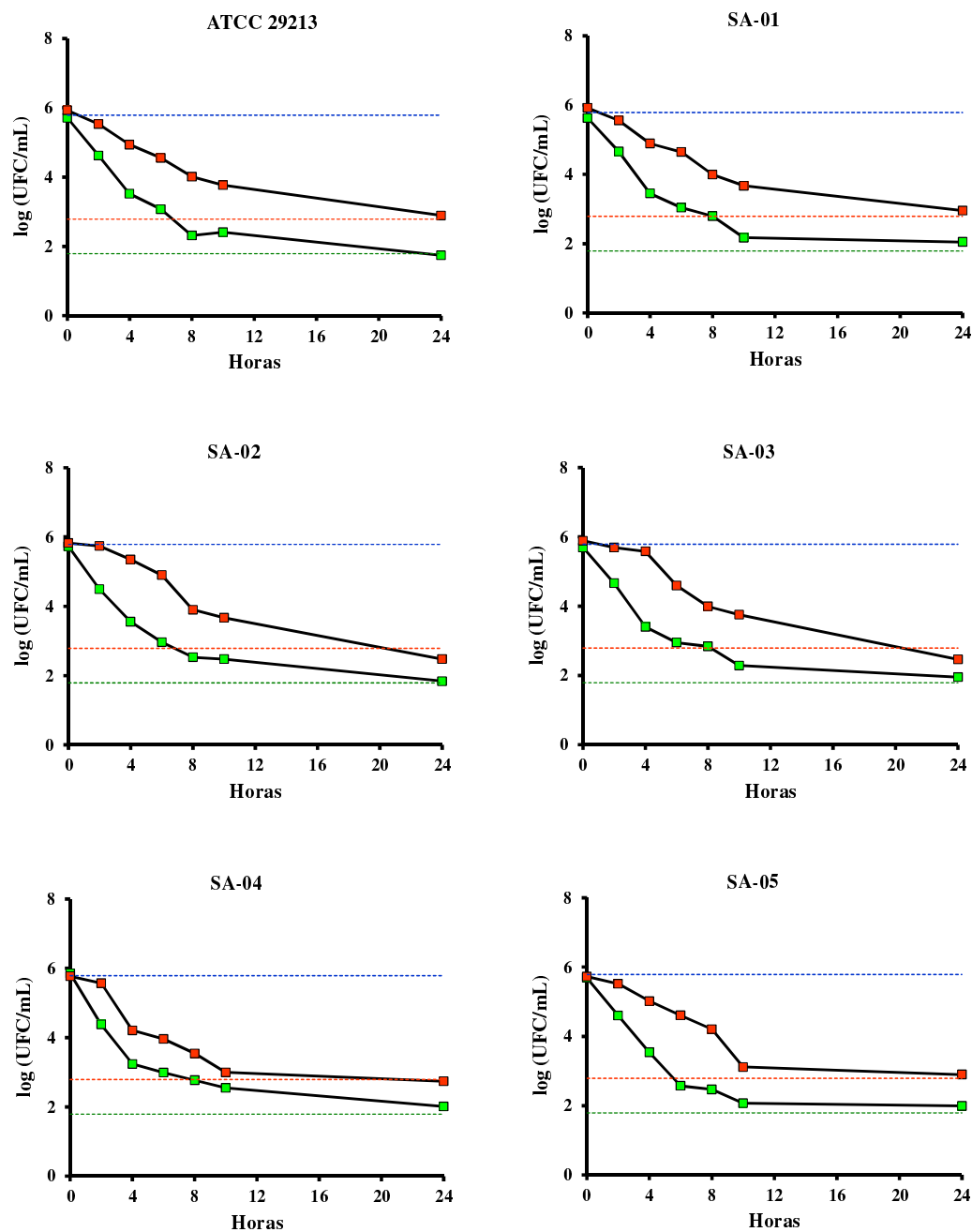


Figura 24. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 2 x CIM durante 24 horas en CMH y CMH:SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en \log_{10} UFC/mL. Símbolos: ■ crecimiento en CMH; ■ crecimiento en CMH:SBA. La línea punteada horizontal azul corresponde al \log_{10} del conteo de bacterias viables inicial, en tanto que las líneas roja y verde corresponden a una reducción de 3 y 4 \log_{10} respecto del \log_{10} del conteo bacteriano inicial respectivamente.

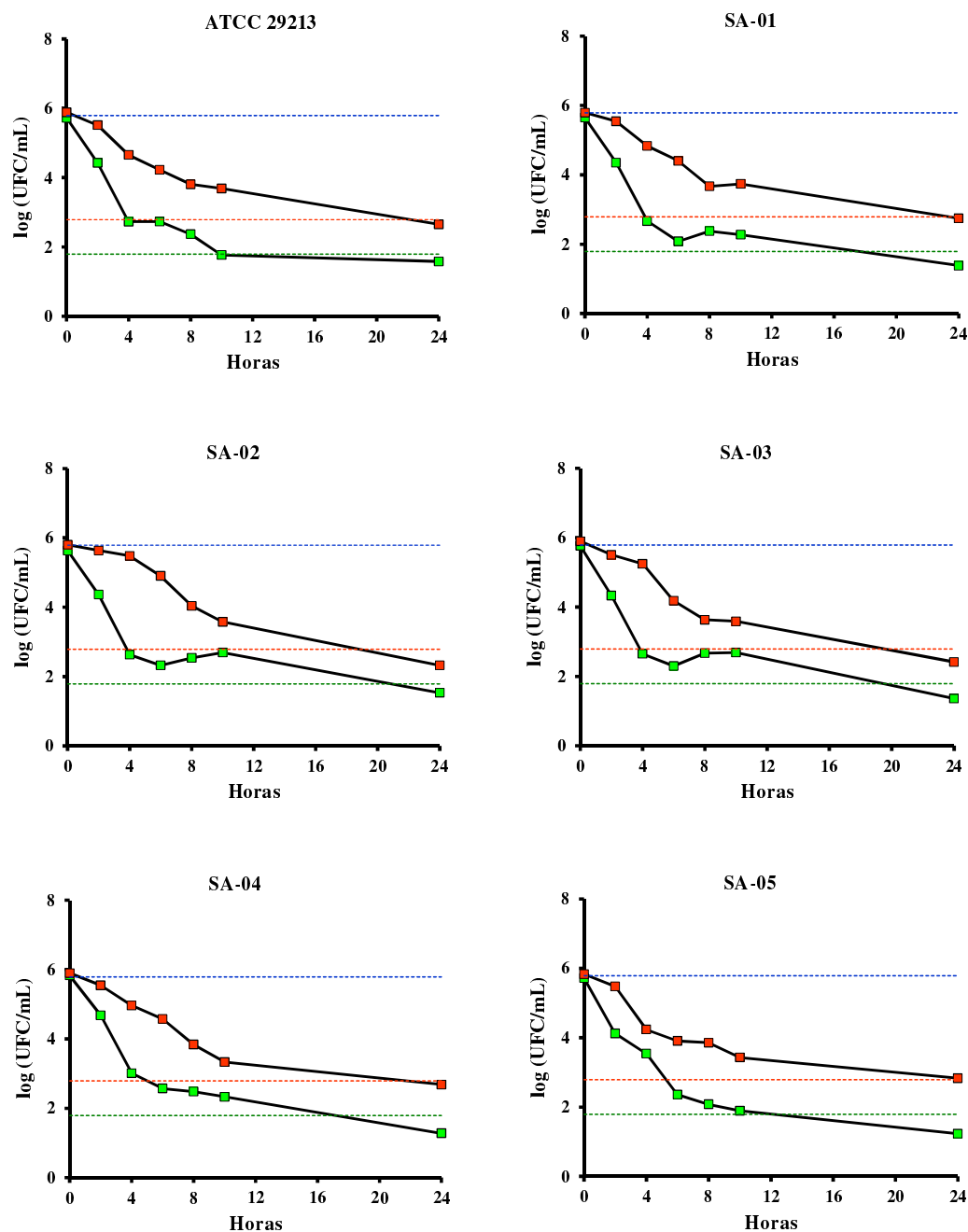


Figura 25. Evolución temporal de la masa bacteriana de seis cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 4 x CIM durante 24 horas en CMH y CMH:SBA. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en log₁₀ UFC/mL. Símbolos: ■ crecimiento en CMH; ■ crecimiento en CMH:SBA. La línea punteada horizontal azul corresponde al log₁₀ del conteo de bacterias viables inicial, en tanto que las líneas roja y verde corresponden a una reducción de 3 y 4 log₁₀ respecto del log₁₀ del conteo bacteriano inicial respectivamente.

IV.4.- Determinación de efectos de persistencia

La evolución temporal de la población bacteriana de las seis cepas de *S. aureus* luego de haber sido expuestas a concentraciones suprainhedorias de cefquinoma (4 x CIM) durante dos horas (EPA), así como la evolución luego de ser expuestas a concentraciones suprainhedorias (4 x CIM) durante dos horas y reexpuestas a concentraciones subinhedorias (0,25 x CIM) durante ocho horas (EPA sub-CIM) se encuentran representadas gráficamente en la figura 26. Los valores estimados de EPA y EPA sub-CIM se presentan resumidos en la tabla 16.

Tabla 16. Efecto posantibiótico (EPA) y efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM) de cefquinoma sobre seis cepas de *S. aureus*.

Parametro	ATCC	SA-01	SA-02	SA-03	SA-04	SA-05	Media	DE	CV%
EPA (hs)	0,87	0,82	-0,10	0,19	0,40	0,78	0,49*	0,39	79,68
EPA sub-CIM (hs)	3,89	3,98	2,93	3,03	3,11	4,03	3,50*	0,52	14,95

Los resultados obtenidos, muestran que el EPA de cefquinoma sobre las cepas de *S. aureus* fue de corta duración ($0,49 \pm 0,39$ horas). Por el contrario, el EPA sub-CIM inducido por la reexposición de las bacterias a una concentración equivalente a 0,25 x CIM presentó valores de $3,50 \pm 0,52$ horas, los que fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los obtenidos en el EPA.

Un hallazgo importante observado en el ensayo de EPA sub-CIM, es que en los inóculos que fueron reexpuestos a concentraciones subinhedorias (0,25 x CIM), el recuento de bacterias viables continuó decreciendo durante un período de 1 a 2 horas luego de realizada la dilución del antibiótico, lo cual indica que la actividad antibacteriana no fue completamente suprimida durante el ensayo de EPA sub-CIM.

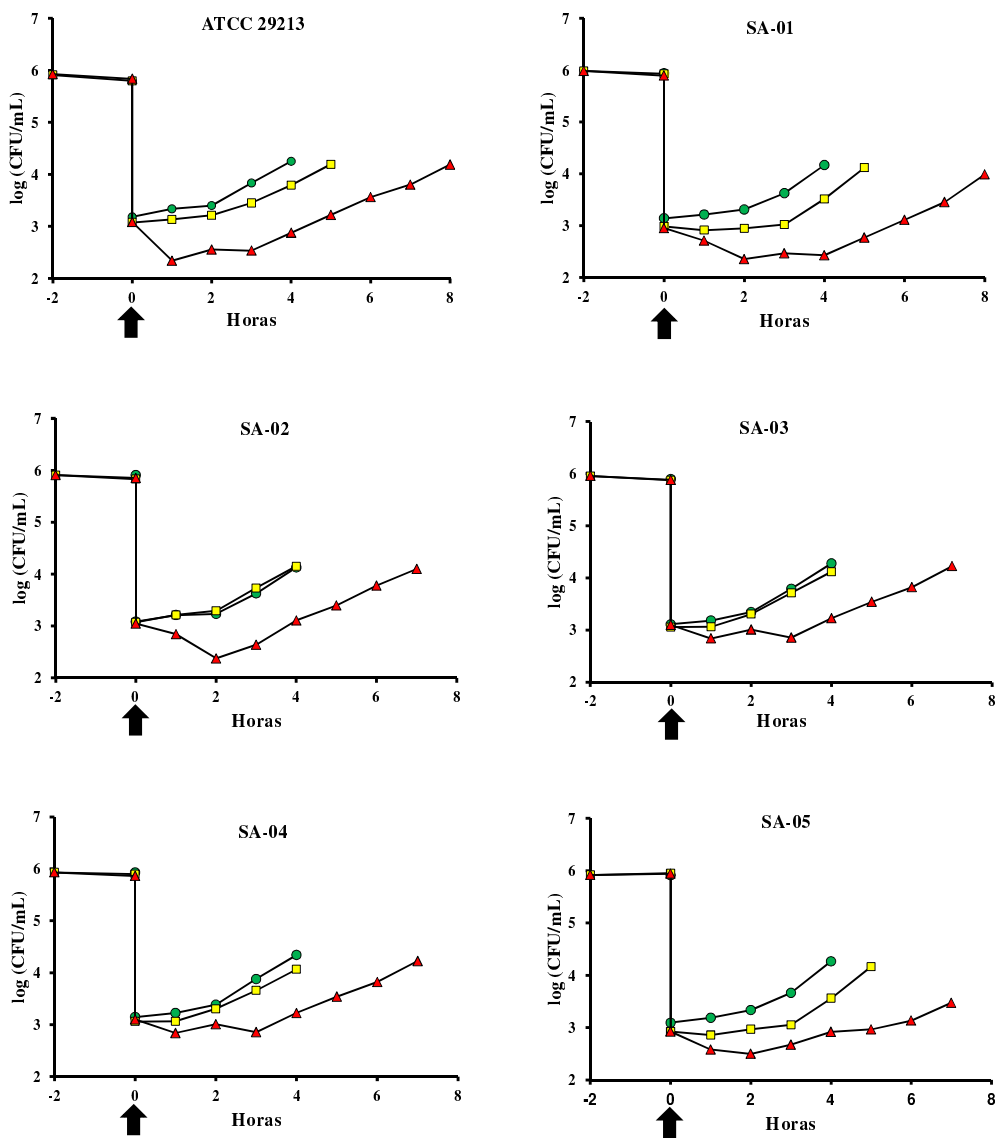


Figura 26. Evolución de la masa bacteriana de *S. aureus* en ensayos de EPA y EPA sub-CIM. En el ensayo de EPA los inóculos se expusieron a concentraciones suprainhibitorias de cefquinoma (4 x CIM) durante 2 horas y posteriormente se eliminó al antibiótico del medio de cultivo. En el ensayo de EPA sub-CIM, los inóculos se expusieron a concentraciones suprainhibitorias (4 x CIM) y seguidamente éstas se redujeron a concentraciones subinhibitorias (0,25 x CIM) mediante dilución. En cada gráfico, la flecha negra indica el tiempo en el que se realizó la dilución del antibiótico. Los valores se hallan expresados como \log_{10} UFC/mL. Símbolos: ● control; ■ EPA; ▲ EPA sub-CIM.

Discusión

V.- DISCUSION

V.1.- Concentración Inhibitoria Mínima

Los valores de CIM de cefquinoma estimados para las 30 cepas de *S. aureus* meticilino sensibles, aisladas de secreciones lácteas de vacas en producción afectadas por mastitis, se hallaron dentro de un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,512 y 1,024 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores son similares a los registrados en ensayos realizados con cepas de *S. aureus* aisladas en el continente europeo, donde Limbert y colaboradores (1991) reportaron que la CIM₅₀ era de 0,781 $\mu\text{g/mL}$, y la CIM₉₀ de 1,563 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que Schmid y Thomas en el año 2002 indicaron que la CIM₅₀ fluctuaba entre 0,25 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ y la CIM₉₀ de 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Nuestro grupo de trabajo también determinó hace algunos años la sensibilidad a la cefquinoma de 120 cepas de *S. aureus* meticilino sensibles aisladas de casos de mastitis clínica o subclínica que afectaban a vacas en producción (Russi y col., 2008). Las muestras pertenecían a la colección de microorganismos del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, EE Rafaela) y se habían obtenido de 39 establecimientos de la cuenca lechera central argentina durante los años 2001 a 2006. La determinación de la CIM se efectuó por el método de dilución en placa y los resultados determinaron que la concentración de cefquinoma que causó inhibición del desarrollo en el 50% de las cepas estudiadas era de 0,4 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que la CIM₉₀ era de 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

En trabajos desarrollados en el año 1992 por Chin y colaboradores, donde se caracterizó la actividad de cefquinoma frente a varios microorganismos, se reportó que la concentración que inhibía el desarrollo del 90% de las cepas de *S. aureus* meticilino sensibles era de 2 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que para las meticilino resistentes ascendía a 8 $\mu\text{g/mL}$.

En un estudio donde se evaluó la susceptibilidad de 169 cepas de *S. aureus*, de las cuales 98 eran *mecA* negativas y las restantes positivas, se determinó que la CIM variaba de 0,25 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para las negativas, y de entre 1 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas *mecA* positivas. El ensayo se realizó mediante la técnica de microdilución en placa, y del total de bacterias utilizadas, 145 fueron de origen humano, en tanto que las otras 24

procedieron de aislamientos de porcinos, siendo 21 de ellas *mecA* positivas (Aarestrup y Skov, 2010).

Respecto a la CIM de la cepa de referencia, es preciso señalar que el valor que nosotros encontramos es coincidente al reportado por algunos investigadores (Thomas y col.; 2006; Xiong y col.; 2016), pero ligeramente superior a lo que se informa en otros trabajos, referenciando una CIM de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (Ahmad y col., 2014; Wang y col., 2014). Posiblemente estas diferencias en los valores radiquen en que el cálculo de la CIM se efectúa utilizando diluciones dobles de antimicrobiano, dejando entre diluciones una zona de incertidumbre. Por otra parte, también se debe considerar el método empleado para realizar la determinación, ya que se acepta que los valores de CIM obtenidos mediante el método de microdilución pueden ser una dilución menor a los que se obtienen por el método de macrodilución (García Rodríguez y col., 2000).

Cabe señalar que otras de las cepas de referencia de *S. aureus* es la *Newbould* 305, la cual tiene la particularidad de haber sido aislada a partir de un caso de mastitis, y de acuerdo a la literatura, la CIM de cefquinoma frente a esta bacteria también es 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Yu y col., 2016).

Los resultados obtenidos en las curvas de muerte bacteriana muestran que *S. aureus* enfrentado a cefquinoma presenta una cinética de muerte dependiente del tiempo de contacto de la bacteria con el antibiótico.

La actividad de la cefquinoma fue bacteriostática o levemente bactericida a 0,5 x CIM, en tanto que 24 horas de exposición de una concentración de cefquinoma equivalente a 1 x CIM redujo la carga bacteriana inicial en un $91,0 \pm 16,5\%$. La mayor eficacia de cefquinoma se manifestó a concentraciones de 2 x CIM y 4 x CIM, las cuales luego de 24 horas de contacto lograron una reducción del 99,9% sobre el número inicial de bacterias viables. Todo esto permite inferir que probablemente no se podría lograr un incremento mayor de eficacia de cefquinoma con concentraciones superiores a 4 x CIM. Finalmente, como se mencionara, los resultados muestran la importancia que tiene el tiempo de exposición de las bacterias a cefquinoma para garantizar su eficacia.

Estos resultados son coincidentes con los reportados por Yu y colaboradores (2016), quienes indican que los perfiles de las curvas de muerte bacteriana presentan baja correlación con la concentración de cefquinoma a la que es expuesta el microorganismo, ya que la velocidad de muerte no se modificó con el aumento de la concentración de esta.

Es importante señalar que estos mismos autores, empleando un modelo de mastitis murino, reportaron que a medida que la dosis intramamaria aumentaba, los recuentos bacterianos en el tejido de la glándula disminuían después de las 24 horas, lo que sugiere que *in vivo* se presenta una actividad dependiente de la dosis. Estos investigadores concluyen que el porcentaje del intervalo de tiempo entre dosis durante el cual la concentración de cefquinoma se mantiene por encima de la CIM ($t > CIM$) y la relación AUC_{0-24}/CIM son los principales índices predictores de eficacia antibacteriana de cefquinoma después de su administración intramamaria, y postulan que para conseguir una acción bacteriostática, el $t > CIM$ debe ser al menos de 7,59% y la relación AUC_{0-24}/CIM de al menos 6,91 horas, en tanto que para conseguir una reducción de 1,8 \log_{10} en la carga bacteriana, los valores de estos indicadores se incrementan a 35,98% y 137,43 horas, respectivamente, destacando que los mismos son factibles de alcanzarse en los regímenes de dosificación clínica.

Luego de la aplicación de cefquinoma en bovinos mediante pomos intramamarios, el fármaco fue detectado durante 108 horas en la leche proveniente tanto de los cuartos sanos como de los afectados por mastitis, lo que, en un esquema de ordeños con intervalos de 12 horas, representa un total de nueve ordeños. Teniendo en cuenta el perfil de las concentraciones lácteas, el tiempo durante el cual las mismas superaron la CIM (0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue de 54 ± 34 horas y 42 ± 18 horas en cuartos sanos y mastíticos respectivamente (Zonca y col., 2011). Estos mismos autores indican que teniendo en cuenta que los reportes de CIM para 229 cepas de *S. aureus* aisladas en Europa y América del norte entre los años 1990 y 2002 se halla dentro de un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el tiempo en que las concentraciones superan la CIM es de 44 a 46 horas. Dado que los valores de CIM que encontramos están dentro de estos rangos, dichas consideraciones podrían ser extrapoladas a nuestros resultados.

Por otra parte, en un modelo *in vitro* en el cual se emplearon glándulas mamarias bovinas perfundidas para evaluar la distribución tisular de cefquinoma simulando una aplicación intramuscular, se encontró que las concentraciones en el tejido mamario a las 4 y 6 horas posteriores a la administración oscilaban entre 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/g}$. Teniendo en cuenta que la cefquinoma se distribuye principalmente en el líquido extracelular, y dado que en el citado ensayo las muestras empleadas para determinar las concentraciones tisulares del antimicrobiano provenían mayoritariamente de líquido intracelular, se garantizaría que las bacterias con capacidad de localizarse intracelularmente como *S. aureus* estén expuestos a concentraciones iguales a los valores de CIM obtenidos en nuestro ensayo, mientras que las que estén situadas a nivel extracelular en realidad estarían expuestas a concentraciones superiores a las determinadas en este estudio (Ehinger y col., 2006).

V.2.- Efecto del pH sobre la actividad de cefquinoma

Cuando evaluamos el crecimiento bacteriano de *S. aureus* a diferentes valores de pH, esto es 7,4, 6,5 y 5,5 a fin de posteriormente determinar si la actividad antibacteriana de cefquinoma se modificaba en función del pH del medio, no se encontraron diferencias en la magnitud del desarrollo bacteriano.

Es conocida la capacidad del *S. aureus* para poder desarrollarse en ambientes con pH ligeramente ácidos, tal el caso de vagina, tracto urinario, piel, e incluso dentro de los fagolisosomas, donde el pH llega a valores comprendidos entre 5 a 5,5 (Valero y col., 2009). No obstante, esta capacidad de adaptación, el pH óptimo para el desarrollo de este microorganismo se encuentra entre valores de pH de entre 6,0 y 7,0 (ICMSF, 1996).

Si bien dentro del rango de valores de pH utilizados en este estudio no encontramos diferencias en el crecimiento bacteriano, es importante señalar que no sólo el valor de pH del medio puede condicionar la capacidad de desarrollo de estos microorganismos, sino que también influye el ácido utilizado para modificarlo, así por ejemplo a igual valor de pH, el desarrollo del *S. aureus* es menor cuando se ajusta con ácido acético que cuando se emplea ácido clorhídrico (Sutherland y col., 1994).

Estudios previos han demostrado que la tasa de muerte bacteriana generada por un antibiótico puede variar dependiendo del pH. Así, Lamp y colaboradores (1992) demostraron que la actividad de un lipopéptido como daptomicina, fue afectada por cambios en el pH. A medida que el pH aumentaba, la actividad de daptomicina frente a *S. aureus* también se incrementaba. Sin embargo, cabe señalar que estos ensayos se llevaron a cabo sólo durante 6 horas, por lo que se desconoce si estas diferencias se habrían mantenido después de 24 h de exposición. En el caso de vancomicina, se encontró que esta presentaba mayor efectividad frente a *S. aureus* cuando el pH del medio de cultivo se ajustaba a un valor de 8,0 en lugar de 6,4. Por su parte, en el caso de oritavancina el cambio en el pH no afectó la tasa de muerte (Mercier y col., 2002).

En el caso de macrólidos, clindamicina y gentamicina se encontró que la actividad antibacteriana de estos disminuía al descender el pH (Baudoux y col., 2007). Similares resultados se reportaron para las fluoroquinolonas norfloxacin, ciprofloxacina y moxifloxacina (Zeiler, 1985). En el caso de oxacilina, un betalactámico, la disminución del pH del medio determinó que la CIM frente a *S. aureus* se redujera 8 veces (Baudoux y col., 2007).

Se ha comprobado que la exposición de *S. aureus* a un pH ligeramente ácido modifica la expresión de aproximadamente unos 400 genes (Weinrick y col., 2004), lo cual podría determinar que la bacteria disminuya su sensibilidad a los antimicrobianos, tal como acontece cuando el microorganismo es expuesto a un shock térmico o cuando forma biofilms (Donlan y Costerton, 2002). Sin embargo, la principal razón determinante de la disminución de la actividad de los antibióticos a causa de variaciones en los valores de pH del medio sería que esta situación, modificaría tanto la accesibilidad como así también la unión del antimicrobiano al sitio blanco. En ese contexto el pH ácido perjudicaría el ingreso de bases débiles al interior bacteriano, tal el caso de los macrólidos como resultado de una mayor ionización de estos (Dalhoff y col., 2005). Otro caso sería el de gentamicina, debido a que la disminución del pH reduce el gradiente electroquímico de protones transmembrana, y por ende la fuerza impulsora necesaria para la captación de aminoglucósidos dependiente de un sistema de transporte (Eisenberg y col., 1984).

El hecho de que en nuestro ensayo no encontráramos diferencias tanto en la CIM como en el perfil de las curvas de evolución de la masa bacteriana en función del pH del medio, estaría relacionada fundamentalmente con la característica zwitteriónica de cefquinoma. La influencia del pH del medio sobre este tipo de moléculas quedó claramente evidenciada en un ensayo en el cual se comparó la actividad de dos fluoroquinolonas; delafloxacina y moxifloxacina, las cuales difieren en sus propiedades ácido-base, a saber, la primera es un compuesto débilmente ácido, en tanto que la segunda es zwitteriónica. Los resultados obtenidos en ese estudio indicaron que delafloxacina era muy activa contra todas las cepas de *S. aureus* bajo estudio, incluidas las resistentes a moxifloxacina. Estos autores concluyen que el pH ácido aumentó notablemente la captación intracelular de delafloxacina, ya que a pH ácido, el 50% de ésta se encuentra bajo la forma no ionizada, mientras que sólo el 11% de la moxifloxacina está presente como zwitterión, lo cual favorece la captación de delafloxacina. Una vez dentro de las bacterias, donde el pH es neutro, delafloxacina es desprotonada y por ende menos difusible que moxifloxacina, quien permanecerá principalmente como zwitteriónica (Lemaire y col., 2011).

V.3.- Efecto del suero bovino sobre la actividad de cefquinoma

Ante el ingreso de patógenos infecciosos a la circulación general, tales como virus y bacterias, los anticuerpos naturales (AcN), el complemento y los linfocitos T tempranos, son cruciales para potenciar la inmunogenicidad y el control eficiente de los patógenos infecciosos evitando la infección de órganos vitales (Baumgarth y col., 2000).

No obstante, los ensayos *in vitro* utilizados para evaluar la eficacia de los antibióticos, como son la determinación de la CIM, el EPA y la construcción de curvas de muerte, entre otros, no permiten valorar el impacto de estos factores de respuesta inmune sobre la actividad del antibiótico, de manera que la eficacia resultante equivale a la que se observaría en un paciente inmunosuprimido (Levison y Levison, 2009).

Una alternativa para estudiar el impacto de la actividad de los factores de respuesta inmune de base humoral sobre un inóculo bacteriano es modificar el modelo *in vitro*, incorporando al medio de cultivo suero de un individuo adulto (SBA) que se asume

proveniente de un animal inmunocompetente, a fin de adicionar factores de respuesta inmune adaptativa e innata y evaluar el efecto de éstos en la sobrevivencia bacteriana.

El sistema inmune del ternero al nacer es considerado como inmaduro y es incapaz de responder con eficiencia frente a la invasión por parte de microorganismos patógenos (Roy, 1980), lo cual hace que éste tenga dificultad para controlar las bacteriemias (Levy, 2007) y sea más susceptible de padecer enfermedades infecciosas (Rajaraman y col., 1997). Se acepta que el ternero al nacer es hipogamaglobulinémico (Roy, 1980), ya que la estructura sindesmocorial de la placenta del bovino, impide el pasaje de inmunoglobulinas desde la circulación materna hasta la circulación fetal (Senger, 1997).

Estos enunciados se corroboran con los resultados obtenidos en nuestro ensayo, en donde se puede apreciar la casi ausente fracción de inmunoglobulinas en la corrida electroforética del STsC, en el que la concentración de gammaglobulinas fue de 0,16 g% respecto de una concentración de 2,16 g% presentes en el suero bovinos adultos. También los niveles séricos de las fracciones proteicas del complemento están disminuidos en los recién nacidos y constituyen un 12 a un 60% de los niveles presentes en los animales adultos (Levy, 2007).

En nuestro ensayo se evaluó la actividad bactericida intrínseca del suero bovino expresándola como porcentaje de reducción de la masa bacteriana viable y se encontró que el desarrollo de esta cepa en el suero de ternero sin calostro era significativamente superior al registrado en el medio de cultivo convencional, en tanto que en caldo Mueller Hinton (CMH) suplementado con suero de animales adultos (CMH:SBA) el desarrollo bacteriano fue menor. Este mayor desarrollo bacteriano en CMH:STsC aporta información para comprender cómo la circulación general de un ternero que no ha calostrado puede constituir un medio de cultivo ideal para este microorganismo, que es uno de los responsables de las infecciones al periparto (Besser y Gay, 1994).

Por otra parte, la actividad bactericida del suero ha sido reportada por nuestro grupo de trabajo en distintas especies animales; así, no sólo se observó en el suero de bovino sobre cepas de *S. aureus* y *E. coli* y (Giacomino y col., 2011), sino también en el

suero de canino sobre cultivos de *E. coli* (Giacomino y col., 2012) y en el suero de yacaré (*Caiman latirostris*) sobre cepas de *E. coli* (Siroski y col., 2015).

Esta actividad bactericida intrínseca del suero podría ser explicada por el accionar conjunto de los AcN y el complemento como primera línea de defensa inespecífica ante el ingreso de microorganismos a la circulación general.

Los AcN son anticuerpos polirreactivos, producidos sin una estimulación antigénica previa y que están dirigidos hacia antígenos propios y hacia estructuras microbianas comunes como los patrones moleculares asociados a patógenos (Avrameas, 1991). Los AcN actúan en la etapa de reconocimiento inicial y opsonización de los patógenos que ingresan a la circulación general, contribuyendo a la eliminación de estos por una acción combinada con el complemento, dando lugar a la formación del complejo de ataque de membrana, o favoreciendo la fagocitosis (Hangartner y col., 2006; Ehrenstein y Notley, 2010).

El sistema del complemento está conformado por varias proteínas plasmáticas, que al activarse producen la destrucción de los microorganismos y desencadenan el proceso de inflamación. Ya sea que el complemento se active por la vía alternativa o la vía de las lectinas, se produce la síntesis de la fracción C3b iniciando una cascada de activación de fracciones proteicas séricas que culminan con el ensamble del complejo de ataque de membrana sobre la superficie de los patógenos invasores, dando lugar a la formación de poros que a causa del desbalance electrolítico provocan la lisis de las bacterias o las partículas virales (Tosi, 2005). De esta manera, el complemento es un componente importante de la respuesta inmune innata que es autosuficiente para defender al organismo de patógenos invasores sin necesidad de la participación de los componentes del sistema inmune adaptativo.

Es de destacar que el porcentaje de bacterias viables de *S. aureus* en presencia de SBA fue significativamente mayor al que se encontrara cuando cepas de *E. coli* fueron expuestas a SBA (Giacomino y col., 2012). La menor susceptibilidad de esta bacteria a la actividad bactericida intrínseca del suero bovino podría ser explicada por la capacidad

de poseer la misma para evadir la respuesta inmune innata mediante la excreción al medio de diversas fracciones proteicas. Entre las proteínas de evasión secretadas se halla la proteína estafilocócica inhibidora del complemento (SCIM), que bloquea todas las vías de activación del mismo; la clásica, la alternativa y la vía de las lectinas (Roijakkers, y col., 2005). Asimismo, debe destacarse que esta bacteria también secreta péptidos que bloquean la acción de los péptidos endógenos con actividad bactericida como las alfa-defensinas (Jin y col., 2004).

Cabe aclarar que en este estudio solamente hemos evaluado la actividad bacteriolítica intrínseca del SBA y que debemos asumir que la participación fagocítica y bactericida de los polimorfonucleares neutrófilos, facilitada por la actividad opsonizante del complemento y de los anticuerpos específicos sobre *S. aureus*, contribuirían a incrementar la eliminación bacteriana.

Al momento de evaluar el efecto de la incorporación de SBA al caldo de cultivo sobre la CIM de cefquinoma frente a las cepas de *S. aureus*, encontramos que la misma se reducía en un 50%. Del mismo modo, al estudiar este efecto mediante curvas de crecimiento bacteriano, encontramos que los valores de eficacia total de cefquinoma en CMH:SBA observados en cada una de las concentraciones fijas fueron mayores a los valores de eficacia total observados en CMH. Es importante destacar que no se observó incremento en la eficacia antibacteriana al aumentar la concentración de cefquinoma a valores superiores a la CIM.

El efecto del suero, ya sea humano o de otras especies animales, potenciando el accionar de los antimicrobianos en modelos *in vitro* ha sido descrito para varios fármacos frente a diversos microorganismos (Pruul y Reynolds, 1972; Marca y col., 1973; Dutcher y col. 1978; Pruul y McDonald, 1992). No obstante, la incorporación de suero al caldo de cultivo no siempre potencia la actividad del antimicrobiano, ya que cuando el fármaco presenta un alto grado de unión a proteínas plasmáticas, la actividad del mismo en los ensayos *in vitro* se ve disminuida, ya que solamente la fracción libre está disponible para ejercer su efecto (Zeitlinger y col., 2011).

En algunos de los casos, el suero ha mostrado un efecto paradójico en cuanto a su actividad antibacteriana. Así, la actividad de la anfotericina B contra *C. albicans* ATCC 24433 se potenció cuando pequeñas cantidades de suero se incorporaron al medio de cultivo, mientras que se atenuó a concentraciones más altas de suero (Richie y col., 2012). Este mismo efecto también fue observado para el accionar del antibiótico MU1140 contra *S. aureus*, con el máximo efecto bactericida en una concentración sérica del 25% (Ghobrial y col., 2010). Estos autores señalan que incluso el efecto de la incorporación del suero varía en función del microorganismo, así, la actividad del MU1140 en presencia de suero disminuyó frente a *S. pneumoniae*, pero se incrementó contra *S. aureus*.

En conclusión, nuestro estudio permitió destacar el importante papel que juega la respuesta inmune de base humoral innata en la defensa de un organismo viviente en la eliminación de cepas de *S. aureus* causantes de mastitis, a la vez que potencia el accionar de la cefquinoma sobre las mismas.

V.4.- Determinación de efectos de persistencia

Los resultados obtenidos en las curvas de muerte bacteriana muestran que cefquinoma presenta sobre *S. aureus* un comportamiento farmacodinámico que se corresponde con el de un antibiótico cuya actividad es dependiente del tiempo de contacto con las bacterias sensibles. También permiten inferir que probablemente no se podría lograr un incremento de eficacia de cefquinoma con concentraciones mayores a 4 veces la CIM. No obstante, es importante poder valorar lo que sucede cuando este microorganismo se enfrenta a concentraciones subinhibitorias.

En este caso, el EPA de cefquinoma fue demasiado corto ($0,50 \pm 0,70$ horas), como para considerar que este efecto de persistencia pudiese llegar a tener impacto en el diseño de un esquema terapéutico dirigido a tratar una infección provocada por *S. aureus*. Similares resultados fueron reportados por Ahmad y colaboradores (2015), quienes observaron que el EPA oscilaba entre 0,1 y 0,6 horas, dependiendo de la concentración y el tiempo de contacto usado en el ensayo.

Sin embargo, en la evaluación de estos resultados debe considerarse que un ensayo *in vitro* de EPA, constituye un procedimiento de laboratorio en el cual un inóculo bacteriano es expuesto a elevadas concentraciones de un antibiótico durante un período breve de tiempo, para posteriormente remover el mismo del medio de cultivo, constituyendo esto una situación que nunca se produce como tal en un organismo viviente, en donde las concentraciones de un antibiótico no desaparecen de un momento a otro, sino que fluctúan a causa de los procesos farmacocinéticos (Toutain y col., 2002).

En vista de lo mencionado, el modelo *in vitro* empleado para determinar el EPA sub-CIM, en donde las bacterias luego de ser expuestas a concentraciones suprainhedorias de antibiótico (>CIM) durante un corto período de tiempo (1 a 2 horas), son seguidamente expuestas a concentraciones subinhedorias (<CIM), constituye un modelo semidinámico que simula el decaimiento de las concentraciones del antibiótico en el sitio de localización del patógeno en función del tiempo, imitando así lo que ocurre en un organismo viviente (Mueller y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la actividad de las concentraciones subinhedorias de cefquinoma sobre las cepas de *S. aureus* que habían sido previamente expuestas a concentraciones suprainhedorias, lograron retrasar el inicio de la fase de crecimiento bacteriano por un período de $3,55 \pm 0,60$ horas, el cual fue significativamente mayor ($p < 0,05$) al valor observado en el ensayo de EPA.

La actividad de cefquinoma demostrada en el ensayo de EPA sub-CIM debe ser interpretada en función del impacto que esta actividad persistente tendría en un escenario *in vivo*. La mayoría de las veces la actividad de un antibiótico observada *in vivo* es mayor a la registrada *in vitro*, y eso es así porque en los ensayos de laboratorio no se tiene en cuenta el papel que juega la respuesta inmune del individuo, la cual es indispensable para el éxito de la terapéutica antibiótica, por lo que debe considerarse a los antibióticos como una terapia adyuvante de las defensas naturales del individuo (Blondeau, 2009).

Desde hace mucho tiempo se ha observado que las bacterias en fase post antibiótica son más sensibles a la fagocitosis y muerte por la acción de leucocitos, y a este

fenómeno se lo denominó; efecto post antibiótico estimulador de leucocitos (PALE) (Mc Donald y col., 1981; Pruul y col., 1981), y en un individuo que está recibiendo un tratamiento antibiótico, el PALE se adiciona al EPA sub-CIM prolongando la actividad del antibiótico aún en presencia de muy bajas concentraciones de éste.

En este sentido, muchos autores han reconocido que el EPA sub-CIM es un parámetro farmacodinámico que puede llegar a tener gran impacto sobre el diseño de regímenes terapéuticos (Cars y Odenholt-Tornqvist, 1993; Lim y Yun, 2001, Odenholt, 2001; Onufrak y col., 2016), ya que en un tratamiento antibiótico, las concentraciones subinhibitorias siempre están presentes, ya sea durante la fase de eliminación terminal (dosis única) o entre dos administraciones (tratamiento a intervalos regulares), y el EPA sub-CIM probablemente refleje de manera más próxima la actividad *in vivo* de un antibiótico de lo que lo haría el EPA.

El significado clínico del EPA sub-CIM reside entonces en considerar que el retraso en el crecimiento bacteriano actúa a manera de “buffer” cuando durante la fase de eliminación la concentración del antibiótico cae a niveles subinhibitorios, al tiempo que durante esta etapa las bacterias parecen ser más susceptibles a la actividad antibacteriana de los factores de respuesta inmune del organismo.

No obstante, la persistencia de la actividad de concentraciones subinhibitorias de cefquinoma sobre *S. aureus* observada en este ensayo, son necesarios más estudios para obtener información que permita incorporar el EPA sub-CIM como parámetro PK/PD en el diseño de los regímenes terapéuticos de este antibiótico.

Conclusiones

VI - CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado y a la luz de los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La CIM de cefquinoma para las cepas de *S. aureus* aisladas de secreciones lácteas de vacas en producción afectadas por mastitis se halló dentro del intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,512 y 1,024 µg/mL.
- El pH del medio de cultivo, en los valores evaluados, 5,5, 6,5 y 7,4, no modificó la CIM de cefquinoma frente a estas cepas de *S. aureus*.
- La magnitud del desarrollo bacteriano valorado a través de las curvas de crecimiento fue similar en los tres valores de pH ensayados.
- La cinética de muerte bacteriana de las cepas de *S. aureus* enfrentadas a cefquinoma fue dependiente del tiempo de contacto entre la bacteria y el antibiótico.
- El desarrollo de *S. aureus* en presencia de suero de bovinos adultos fue menor al observado en medio de cultivo convencional, poniendo en evidencia la actividad bactericida intrínseca del suero.
- La actividad antibacteriana *in vitro* de cefquinoma fue potenciada por los factores de respuesta inmune presentes en el suero de los bovinos adultos, determinando una disminución del 50% en el valor de la CIM.
- La persistencia de actividad antibacteriana de concentraciones sub-inhedorias de cefquinoma frente a las cepas de *S. aureus* bajo estudio fue de corta duración, con un EPA de $0,49 \pm 0,39$ horas. Por su parte el EPA sub-CIM inducido por la reexposición de las bacterias a una concentración equivalente a $0,25 \times$ CIM presentó valores de $3,50 \pm 0,52$ horas.
- El presente estudio constituye un aporte de información acerca de la actividad antibacteriana de cefquinoma sobre cepas de *S. aureus* que puede ser utilizada para una mejor comprensión de la interacción de la tríada antibiótico-bacteria-organismo, a fin de mejorar el diseño de los regímenes posológicos adaptándolos a las características del organismo causante de la infección.

Bibliografía

Aarestrup F, Skov R. 2010. Evaluation of ceftiofur and cefquinome for phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* using disk diffusion testing and MIC-determinations. *Vet Microbiol*, 140: 176-179.

Ahmad I, Hao H, Huang L, Sanders P, Wang X, Chen D, Tao Y, Xie S, Xiuhua K, Li J, Dan W, Yuan Z. 2015. Integration of PK/PD for dose optimization of Cefquinome against *Staphylococcus aureus* causing septicemia in cattle. *Front Microbiol*, 6: (588) 1-10.

AliAbadi F, Landoni M, Lees P. 2003. Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 626-635.

AliAbadi F, Lees P. 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. *Res Vet Sci*, 74: 247-259.

Altemeier W. 1948. Penicillin therapy with prolonged interval dosage schedules. *Ann Surg*, 128: 708-713.

Amiridis G, Fthenakis G, Dafopoulos J, Papanikolaou T, Mavrogianni V. 2003. Use of cefquinome for prevention and treatment of bovine endometritis. *J Vet Pharmacol Ther*, 26 (5): 387-390.

Andersson D, Hughes D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 12(7): 465-478

Anuforum O, Wallace GR, Piddock LV. 2014. The immune response and antibacterial therapy. *Med Microbiol Immunol*, 204(2):151-159.

Asín-Prieto E1, Rodríguez-Gascón A1, Isla A. 2015. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother*, 21(5): 319-329.

Avrameas S. 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothiseauton'. *Immunol Today*, 12: 154-159.

Baquero F, Negri MC. 1997. Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. *J Chemother*, 9: Suppl 3, 29-37.

Baudoux P, Bles N, Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2007. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J Antimicrob Chemother*, 59 (2): 246-253.

Baumgarth N, Herman O, Jager G, Brown L, Herzenberg L, Chen J. 2000. B-1 and B-2 cell - derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med*, 192: 271-280.

Besser, T; Gay, C. 1994. The Importance of Colostrum to the Health of the Neonatal Calf. *Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice*, 10 (1): 107-117

Blondeau, J. 2009. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet Dermatol*, 20: 383-296.

Böttner A, Schmid P, Humke R. 1995. *In vitro* efficacy of cefquinome (INN) and other antiinfective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and the United Kingdom. *Zentralbl Veterinarmed B*, 42 (6): 377-383.

Bradley A, Breen J, Payne B, Green M. 2011. A comparison of broad-spectrum and narrow-spectrum dry cow therapy used alone and in combination with a teat sealant. *J Dairy Sci*, 94 (2): 692-704.

Canut Blasco A, Aguilar Alfaro L, Cobo Reinoso J, Giménez Mestreb MJ, Rodríguez-Gascón A. 2015. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología:

herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33: 48-57.

Caprile KA. 1988. The cephalosporin antimicrobial agents: a comprehensive review. *J Vet Pharmacol Ther*, 11 (1):1-32.

Cars O, Odenholt-Tornqvist I. 1993. The post-antibiotic sub-MIC effect *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother*; 31 Suppl D:159-166.

Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup F, Guardabassi L. 2008. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (10): 3612-3616.

Cerca N, Martins S, Sillankorva S, Jefferson K, Pier G, Oliveira R, Azeredo J. 2005. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 71 (12): 8677-8682.

Cervantes C, Brown M, Gronwall R, Merritt K. 1993. Pharmacokinetics and concentrations of ceftiofur sodium in body fluids and endometrium after repeated intramuscular injections in mares. *Am J Vet Res*, 54 (4): 573-575.

Chin N, Gu J, Fang W, Neu HC. 1992. *In vitro* activity of cefquinome, a new cephalosporin, compared with other cephalosporin antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 15 (4): 331-337.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agent. Approved guideline M26-A.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10.

Craig WA. 1995. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 22: 89-96.

Craig WA. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis*, 26: 1-12.

Craig WA. 2014. Introduction to Pharmacodynamics. In: Vinks A, Derendorf H, Mouton J, eds. *Fundamentals of antimicrobial pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Springer. New York. 3-22.

Craig WA, Andes D. 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr Infect Dis J*, 15 (3): 255-259.

Craig WA, Gudmundsson S. 1996. The postantibiotic effect. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co. 296-329.

Dalhoff A, Schubert S, Ullmann U. 2005. Effect of pH on the *in vitro* activity of and propensity for emergence of resistance to fluoroquinolones, macrolides, and a ketolide. *Infection*, 33 Suppl 2: 36-43.

Deshpande L, Pfaller MA, Jones RN. 2000. *In vitro* activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum beta-lactamase producing strains. *Int J Antimicrob Agents*, 15 (4): 271-275.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15 (2): 167-193.

Dowling P, Kruth S. 2006. Antimicrobial therapy of Selected Organ System. In: Giguère, S; Prescott, J; Baggot, J; Walker, R; Dowling, P. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 4th ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. pp 357 - 379.

Drusano GL. 1990. Human pharmacodynamics of b-lactams, aminoglycosides and their combination. *Scand J Infect Dis Suppl*, 74: 235-248.

Dutcher BS, Reynard AM, Beck ME, Cunningham RK. 1978 Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob Agents Chemother*, 13(5): 820-826.

Eagle H, Mussleman AD. 1944. The spirocheticidal action of penicillin *in vitro* and its temperature coefficient. *J Exp Med*, 80: 493-505.

Eagle H, Musselman AD. 1948 The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med*, 88 (1): 99-131.

Eagle H, Fleischman R, Levy M. 1953. Continuous vs. discontinuous therapy with penicillin. The effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. *N Engl J Med*, 248: 481-488.

Ehinger AM, Schmidt H, Kietzmann M. 2006. Tissue distribution of cefquinome after intramammary and "systemic" administration in the isolated perfused bovine udder. *Vet J*, 172 (1): 147-153.

Ehrenstein MR, Notley CA. 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*, 10: 778-786.

Eisenberg ES, Mandel LJ, Kaback HR, Miller MH. 1984. Quantitative association between electrical potential across the cytoplasmic membrane and early gentamicin uptake and killing in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 157: 863-867.

El-Gendy A, Tohamy M, Abeer M, Radi. 2009. Pharmacokinetic profile and some pharmacodynamic aspects of cefquinome in chickens. *Beni-Suef Vet Med J*, 19 (2): 33-37.

- EMA. 1999. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Cefquinome. Summary Report. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011877.pdf
- Errecalde C, Prieto G, Puelles I, Lüders C, García Ovando H. 2001. Disposición plasmática de cefquinome en caprinos por administración intramuscular. *InVet*, 3 (1-2): 89-94.
- Errecalde C, Prieto G, Puelles I, Lüders C, García Ovando H. 2002. Farmacocinética de cefquinome en terneros por aplicación intramuscular. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 15 (3): 281-285.
- Fantin B, Ebert S, Leggett J, Vogelmann B, Craig WA. 1991. Factors affecting duration of *in-vivo* postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*, 27 (6): 829-836.
- Fung-Tomc JC. 1997. Fourth-generation cephalosporins. *Clin Microbiol Newsl*, 19 (17): 129-136.
- Fung-Tomc JC, Gradelski E, Huczko E, Dougherty TJ, Kessler RE, Bonner DP. 1996. Differences in the resistant variants of *Enterobacter cloacae* selected by extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 1289-1293.
- Ganière JP, Mangion C, Péridy M. 2004. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Méd Vét*, 155 (8-9): 411-416.
- Ganière JP, Medaille C, Mangion C. 2005. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52 (1): 25-31.

García Rodríguez J; Cantón R, García Sánchez J, Gómez-Lus M, Martínez Martínez L, Rodríguez Avial C, Vila J. 2000. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En Juan J. Picazo Editor: Procedimientos en Microbiología Clínica; SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1º Ed. España. 1-38.

Gardner AD. 1940. Morphological effects of penicillin on bacteria. *Nature*, 146: 837-838.

Ghobrial O, Derendorf H, Hillman JD. 2010. Human serum binding and its effect on the pharmacodynamics of the lantibiotic MU1140. *Eur J Pharm Sci*, 41: 658-664.

Giacomino N, Cerra M, Stiefel S, Gumiy D, Notaro U, Buffa E, Baroni E, Formentini E. 2011. Actividad bactericida intrínseca de suero bovino sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista FAVE. Sección Ciencias Veterinarias*, 10: 45-57.

Giacomino N, Cerra M, Gumiy D, Stiefel S, Notaro U, Baroni E, Formentini E. 2012. Pharmacokinetic - pharmacodynamic modeling of antibacterial activity of cephalexin on *Escherichia coli* in presence of canine serum. *Rev Med Vet*, 163: 431-440

Gjini E, Brito P. 2016. Integrating antimicrobial therapy with host immunity to fight drug-resistant infections: Classical vs. adaptive treatment. *PLoS Comput Biol* 12(4): e1004857.

Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF. 1989. *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 33 (3): 277-282.

Guérin-Faubleé V, Tardy F, Bouveron C, Carret G. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Int J Antimicrob Agents*, 19 (3): 219-226.

Guérin-Faublée V, Carret G, Houffschmitt P. 2003. *In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *Vet Rec*, 152 (15): 466-471.

Guimarães JL, Brito M, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, Mendonça JF, Souza GN. 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Prev Vet Med*, 142: 46-50.

Gunderson BW, Ross GH, Ibrahim KH, Rotschafer JC. 2001. What do we really know about antibiotic pharmacodynamics?. *Pharmacotherapy*, 21.302S-318S.

Hangartner L, Zinkernagel RM, Hengartner H. 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol*, 6: 231-243.

Hinckley LS, Post JE, De Cloux J. 1985. Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. *JAVMA*, 187: 709-711.

Hoffman A, Stepensky D. 1999. Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 16 (6): 571-639.

Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J*, 59 (1): 16-23.

Hornish RE, Kotarski SF. 2002. Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem*, 2 (7): 717-731.

Hossain MK, Paul S, Hossain M, Islam M, Alam M. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin J Vet Sci & Anim Husband*, 4 (1): 1-12.

Hyatt JM, McKinnon PS, Zimmer GS, Schentag JJ. 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet*, 28 (2): 143-160.

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. In: *Microorganismos de los alimentos*, Cap. 17 (pp. 349-387). Ed. Acribia, Zaragoza. España.
- Jacoby G, Muñoz-Price L. 2005. The new beta-lactamases. *N Engl J Med*, 352 (4): 380-391.
- Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*, 172 (2): 1169-1176.
- Kalman D, Barriere SL. 1990. Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Tex Heart Inst J*, 17 (3): 203-215.
- Katsuda K, Hoshino K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O. 2013. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Vet Microbiol*, 167 (3-4): 737-741.
- Kawamura-Sato K, Inuma Y, Hasegawa T, Horii T, Yamashino T, Ohta M. 2000. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (10): 2869-2872.
- Kerry DW, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. 1976. Paradoxical effect of mecillinam on *Providencia stuartii*. *J Antimicrob Chemother*, 2: 386-388.
- Knudsen J, Fursted K, Raber S, Espersen F, Frimodt-Møller N. 2000. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 1247-1254.
- Kollef MH. 2009. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Resusc*, 11 (4): 282-286.

Lamp KC, Rybak MJ, Bailey EM, Kaatz GW. 1992. *In vitro* pharmacodynamic effects of concentration, pH, and growth phase on serum bactericidal activities of daptomycin and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 36 (12): 2709-2714.

Larsson AJ, Walker KJ, Raddatz JK, Rotschafer JC. 1996. The concentration-independent effect of monoexponential and biexponential decay in vancomycin concentrations on the killing of *Staphylococcus aureus* under aerobic and anaerobic conditions. *J Antimicrob Chemother*, 38: 589-597.

Lemaire S, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, Glupczynski Y, Van Bambeke F, Tulkens PM. 2011. Activity of moxifloxacin against intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with clindamycin, linezolid and co-trimoxazole and attempt at defining an intracellular susceptibility breakpoint. *J Antimicrob Chemother*, 66 (3): 596-607.

Levison ME, Levison JH. 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am*, 23 (4): 791-815.

Levy, O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanism and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*, 7: 379-390

Li RC. 2000. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*, 13 (4): 229-235.

Li XB, Wu WX, Su D, Wang ZJ, Jiang HY, Shen JZ. 2008. Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy piglets. *J Vet Pharmacol Ther*, 31 (6):523-527.

Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, Chai X, Wu Y, Cai J, Cheng G. 2017. Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. *Front Pharmacol*, 8: 364. doi: 10.3389/fphar.2017.00364

- Lim J, Yun H. 2001. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of erythromycin, roxithromycin, tilmicosin, and tylosin on *Pasteurella multocida*. *Int J Antimicrob Agents*, 17 (6): 471-476.
- Limbert M, Isert D, Klesel N, Markus A, Seeger K, Seibert G, Schrunner E. 1991. Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (1): 14-19.
- Lohr B, Brunner B, Hellmann K. 2004. Survey about the use of Cobactan®-Suspension 2.5% in animals with relevance for the veterinary practice: cattle. *Tierärztliche Umschau*, 59 (6): 352-355.
- Lorian V, Waluschka A. 1972. Blood cultures showing aberrant forms of bacteria. *Am J Pathol*, 57: 406-409.
- Lorian V, Atkinson B. 1975. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am J Clin Pathol*, 64: 678-688.
- Lorian V, Siletti RP, Biondo FX, De Freitas CC. 1979. Paradoxical effect of aminoglycoside antibiotics on the growth of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother*, 5: 613-616.
- Lu GF, Yang HF, Li YJ, Jiang CM. 2007. Pharmacokinetics of cefquinome sulfate suspension in pigs. *Journal of Yangzhou University*, 28: 18-20.
- Luscombe DK, Nicholls PJ. 1988. Processes of drug handling by the body. In *Introduction to the Principles of Drug Design*, 2nd edn. Ed. Smith, H.J. pp. 24-313. Butterworth (Publishers Ltd), London.
- Marca G, Veronese M, Petrescu D. 1973. Enhancement of the bacteriostatic and bactericidal activities of chloramphenicol and thiamphenicol by normal serum *in vitro*. *Chemotherapy*, 18 (2): 91-98.

- McDonald PJ, Wetherall BL, Pruul H. 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev Infect Dis*, 3 (1): 38-44.
- McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs usecrad in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*, (6): 503-514.
- Mediavilla A, García-Lobo J.M. 2014. Antibióticos β -lactámicos. En *Farmacología Humana*. 6° Ed. Florez J. Ed. Elsevier Masson. Barcelona.
- Mella S, Zemelman C, Bello H, Dominguez M, Gonzalez G, Zemelman R. 2001. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev Chil Infect*, 18 (1): 7-19.
- Melnikow E, Schoenfeld C, Spehr V, Warrass R, Gunkel N, Duszenko M, Selzer P, Ullrich H. 2008. A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. *Vet Microbiol*, 131 (3-4): 277-292.
- Mercier RC, Stumpo C, Rybak MJ. 2002. Effect of growth phase and pH on the *in vitro* activity of a new glycopeptide, oritavancin (LY333328), against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother*, 50 (1): 19-24.
- Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, Mobashery S. 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 103 (12): 4404-4409.
- Mehta D, Sharma A. (2016). Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Mol Pharmacol*, 1: 1-6.
- Middleton J, Chemel H. 1978. Aberrant forms of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum and in cerebrospinal fluid causing infection in compromised patients. *J Clin Pathol*, 31: 351-354.

Moore RD, Lietman PS, Smith CR. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J. Infect Dis*, 155: 93-99.

Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (2):369-377.

Nau R, Sörgel F, Eiffert H. 2010. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 23 (4): 858-883.

Nedbalcova K, Nechvatalova K, Pokludova L, Bures J, Kucerova Z, Koutecka L, Hera A. 2014. Resistance to selected beta-lactam antibiotics. *Vet Microbiol*, 171 (3-4): 328-336.

Nicolau DP. 2003. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profiling. *J Infect Chemother*, 9 (4): 292-296.

Nicolau DP, Onyeji CO, Zhong M, Tessier PR, Banevicius MA, Nightingale CH. 2000. Pharmacodynamic assessment of cefprozil against *Streptococcus pneumoniae*: implications for breakpoint determinations. *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (5): 1291-1295.

Nightingale CH. 1999. Determining outcomes in respiratory tract infections: pathogen, patient and antibiotic properties. *Infect Med*, 16, 37-41.

Odenholt I. 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents*, 17 (1): 1-8.

Odenholt-Tornqvist I. 1993. Studies on the postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. *J Antimicrob Chemother*, 31: 881-892.

Odenholt I, Holm SE, Cars O. 1989. Effects of benzylpenicillin on group A β -hemolytic streptococci during the postantibiotic phase *in vitro*. J Antimicrob Chemother, 24: 147-156.

Odenholt I, Holm SE, Cars O. 1990. Effects of supra- and sub-MIC benzylpenicillin concentrations on group A β -hemolytic streptococci during the postantibiotic phase *in vivo*. J Antimicrob Chemother, 26: 193-201.

Odenholt-Tornqvist I, Löwdin E, Cars O. 1991. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 35: 1834-1839.

Odenholt-Tornqvist I, Löwdin E, Cars O. 1992. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. Antimicrob Agents Chemother, 36 (9): 1852-1858.

Ogola H, Shitandi A, Nanua J. 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. J Vet Sci, 8 (3): 237-242.

OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Pruebas para comprobar la esterilidad y la ausencia de contaminación de los productos biológicos. Capítulo 1.1.9. (pp. 1-11). En: Manual de la OIE sobre animales terrestres.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2018. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Mayo2018.pdf

Onufrak N, Forrest A, Gonzalez D. 2016. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of anti-infective dosing. Clinical Therapeutics, 38(9) 1930-1947.

Otto MP, Martin E, Badiou C, Lebrun S, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Dumitrescu, O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 68: 1524-1532.

- Palanivel KM, Selvasubramanian S, Nedunchellian S. 2005. Treatment of clinical mastitis with cefquinome. *Indian Vet J*, 82 (12): 1313-1314.
- Papich M., 2016. Cefquinome sulphate. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. 4th Edition. Elsevier. North Carolina. pp. 133-135.
- Parlevliet J, Lynn J, Paccamonti D. 2006. The use of cefquinome in equine semen extender. *Anim Reprod Sci*, 94: 121-124.
- Pruul H, McDonald PJ. 1992. Potentiation of azithromycin activity against *Escherichia coli* by human serum ultrafiltrate. *J Antimicrob Chemother*, 30 (4): 497-507.
- Pruul H, Reynolds BL. 1972. Interaction of complement and polymyxin with gram-negative bacteria. *Infect Immun*, 6 (5):709-717.
- Pruul H, Wetherall BL, McDonald PJ. 1981. Enhanced susceptibility of *Escherichia coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after *in vitro* incubation with chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother*, 19 (6): 945-951.
- Rajaraman, V, Nonneck BJ, Horst RL. 1997. Effect of replacement of native fat in colostrum and milk with coconut oil on fat soluble vitamins in serum and immune functions in calves. *J Dairy Sci*, 80: 2380-2390.
- Rammelkamf CH, Keefer CS. 1943 Penicillin: its antibacterial effect in whole blood and serum for hemolytic streptococci and *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 22: 649-657.
- Rasmussen F. 1959. Mammary excretion of benzylpenicillin, erythromycin and penethamate hydroiodide. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 16, 194-200.

Rasmussen F. 1971. Excretion of drugs by milk. In: Brodie, B.B., Gillette, R.J. (Eds.), Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 28/1. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 390-402.

Richie DL, Ghannoum M, Isham N, Thompson K, Ryder NS. 2012. Nonspecific effect of Mycograb on amphotericin B MIC. Antimicrob Agents Chemother, 56, 3963-3964.

Rohdich N, Zschiesche E, Heckerroth A, Wilhelm C.; Leendertse, I.; Thomas, E. 2009. Treatment of septicaemia and severe bacterial infections in foals with a new cefquinome formulation: a field study. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 116 (9): 316-320.

Roijackers S, van Kessel J, van Strijp K. 2005. Staphylococcal innate immune evasion. Trends in Microb, 13 (12): 596-560.

Roosendaal R, Bakker-Woudenberg IAJM, van den Berghevan Raffé M, Michel MF. 1986. Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in normal and leucopenic rats. Antimicrob Agents Chemother, 30: 403-408.

Roy JH. 1980. Factors affecting susceptibility of calves to disease. J. Dairy Sci, 63: 650-664.

Russi N, Calvinho L, Díaz PU, Picco EJ. 2008. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cefquinoma frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de secreciones de bovinos de la cuenca lechera central argentina afectados por mastitis. Jornadas de divulgación técnico-científicas 2008. Casilda.

San Martín BN, Bataglia J, Hernández P, Quiroz A, Cañon H. 1998. Absorption and excretion of cefquinome in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in freshwater at 10 degrees C. Zentralbl Veterinarmed A, 45 (10): 615-623.

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*. Antimicrob Agents Chemother, 46 (9): 3013-3019.

Schentag JJ. 1989. Clinical significance of antibiotic tissue penetration. Clin Pharmacokinet, 16 Suppl 1:25-31.

Schentag JJ. 2000. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. Clin Infect Dis, 31 Suppl 2:S40-44.

Schmid P, Thomas V. 2002. Cefquinome-eight year's antimicrobial susceptibility surveillance in cattle. Proceedings of the 22nd World Buiatrics Congress Vol. 147 Hannover: 456-464.

Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? Drug Resist Updat, 16 (1-2): 22-45.

Sellyei B, Varga Z, Szentesi-Samu K, Kaszanyitzky E, Magyar T. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. Acta Vet Hung, 57 (3): 357-367.

Senger PL. 1997. In Pathways to pregnancy and parturition. 1st ed. Current Conceptions, Inc., Pullman, WA, 236-238.

Shah P M, Troche G, Stille W. 1979. Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime. J Antimicrob Chemother, 5: 419-422.

Shan Q, Wang J. 2016. Activity of cefquinome against extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in neutropenic mouse thigh model. J Vet Pharmacol Therap, 40 (4): 392-397.

Sheldon IM, Bushnell M, Montgomery J, Rycroft AN. 2004. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet Rec*, 155 (13): 383-387.

Sidhu PK, Landoni MF, Aliabadi FS, Lees P. 2010. PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Res Vet Sci*, 88: 134-141.

Siroski P, Russi N, Ortega HH, Formentini E. 2015. *In vitro* evaluation of synergistic activity between ciprofloxacin and broad snouted caiman serum against *Escherichia coli*. *Res Vet Sci*, 98: 98-105.

Soriano F. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts for an interpretative reading of the antibiogram]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 20 (8): 407-411.

Stannarius C, Bürgi E, Regula G, Zychowska MA, Zweifel C, Stephan R. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 151 (3): 119-125.

Stille W, Uffelmann H. 1973. Paradoxical bactericidal effect of penicillins on enterococci (Eagle effect). *Dtsch Med Wochenschr*, 98 (12): 611-613.

Strausbaugh LJ, Sande MA. 1978. Factors influencing the therapy of experimental *Proteus mirabilis* meningitis in rabbits. *J Infect Dis*, 137, 251-260.

Sutherland JP, Bayliss AJ, Roberts TA. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int J Food Microbiol*, 21 (3): 217-236.

Tateda K, Hirakata Y, Furuya N, Ohno A, Yamaguchi K. 1993. Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37 (4): 675-680.

Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Kobayashi T, Miyazaki S, Yamaguchi K. 2000. Potential of macrolide antibiotics to inhibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress response. J. Infect. Chemother, 6 (1): 1-7.

Täuber MG, Zak O, Scheld WM, Hengstler B, Sande MA. 1984. The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits. J Infect Dis, 149 (4): 575-583.

Tenover FC. 2006. Mechanisms of Antimicrobial resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine, 119 (6A): S3-S10.

Thomas E, Thomas V, Wilhelm C. 2006. Antibacterial activity of cefquinome against equine bacterial pathogens. Vet Microbiol, 115 (1-3): 140-147.

Tillett WS, Cambier MJ, McCormack JE. 1944. The Treatment of Lobar Pneumonia and Pneumococcal Empyema with Penicillin. Bull N Y Acad Med, 20 (3): 142-178.

Tohamy MA. 2011. Age-related intramuscular pharmacokinetics of cefquinome in sheep. Small Rumin Res, 99 (1): 72-76.

Tosi, M. 2005. Innate immune responses to infection. J Allergy Clin Immunol. 116: 241-249.

Toutain PL, del Castillo J, Bousquet-Mélou A. 2002. The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res Vet Sci, 73 (2): 105-114.

Toutain PL, Lees P. 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther, 27: (6): 467-477.

Toutain PL, Potter T, Pelligand L, Lacroix M, Illambas J, Lees, P. 2016. Standard PK/PD concepts can be applied to determine a dosage regimen for a macrolide: the case of tulathromycin in the calf. J Vet Pharmacol Ther, 40 (1), 16-27.

- Tulkens PM. 1990. Intracellular pharmacokinetics and localization of antibiotics as predictors of their efficacy against intraphagocytic infections. *Scand J Infect Dis Suppl*, 74: 209-217.
- Tuomanen E. 1986. Newly made enzymes determine ongoing cell wall synthesis inhibitors. *J Bacteriol*, 176: 535-543.
- Turnidge JD. 1998. The pharmacodynamics of b-lactams. *Clin Infect Dis*, 27: 10-22.
- Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Prinarakis E, Gazouli M, Katrahoura A, Giakkoupi P, Paniara O, and Legakis NJ. 1998. Sporadic emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and ceftiofime in Greek hospitals. *J. Clin Microbiol*, 36 (1): 266-268.
- Uney K, Altan F, Elmas M. 2011. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for determination of cefquinome concentrations in sheep plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (2): 854-859.
- Uney K, Altan F, Altan S, Erol H, Arican M, Elmas, M. 2016. Plasma and synovial fluid pharmacokinetics of cefquinome following the administration of multiple doses in horses. *J Vet Pharmacol Therap*, 40 (3): 239-247.
- Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G. 2009. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol*, 133 (1-2): 186-194.
- Veiga RP, Paiva JA. 2018. Pharmacokinetics–pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of betalactam antibiotics in critically ill patients. *Critical Care*, 22: 2-33.
- Venkatachalam D, Dumka VK, Ranjan, B. 2017. Pharmacokinetics of a single intramuscular injection of cefquinome in buffalo calves. *J Vet Pharmacol Therap*, 41 (1): 155-158.

Verklin RM, Mandell GL. 1977. Alteration of effectiveness of antibiotics by anaerobiosis. *J Lab Clin Med*, 89: 65-71.

Vidya KC, Mallya PS, Rao PS. 2005. Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian J Med Microbiol*, 23 (2): 102-105.

Visser M. 2018. Translating Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data into Practice. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(2), 169-182.

Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis*, 158 (4): 831-847.

Wallmann J, Schröter K, Wieler LH, Kroker R. 2003. National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *Int J Antimicrob Agents*, 22 (4): 420-428.

Wang J, Shan Q, Ding H, Liang C, Zeng Z. 2014. Pharmacodynamics of cefquinome in a neutropenic mouse thigh model of *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 3008-3012.

Wang L, Zhang Y. 2009. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. *Braz J Microbiol*, 40 (4): 980-987.

Weinrick B, Dunman PM, McAleese F, Murphy E, Projan SJ, Fang Y, Novick RP. 2004. Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 186 (24): 8407-8423.

Winther L, Baptiste KE, Friis C. 2011. Antimicrobial disposition in pulmonary epithelial lining fluid of horses, part III. cefquinome. *J Vet Pharmacol Ther*, 34 (5): 482-486.

- Wisselink HJ, Veldman KT, Van den Eede C, Salmon SA, Mevius DJ. 2006. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Vet Microbiol*, 113 (1-2): 73-82.
- Xie W, Zhang X, Wang T, Du S. 2013. Pharmacokinetic analysis of cefquinome in healthy chickens. *Br Poult Sci*, 54 (1): 81-86.
- Xiong M, Wu X, Ye X, Zhang L, Zeng S, Huang Z, Wu Y, Sun J, Ding H. 2016. Relationship between cefquinome PK/PD parameters and emergence of resistance of *Staphylococcus aureus* in rabbit tissue-cage infection model. *Front Microbiol*, 7: 874.
- Yoneyama HL, Katsumata R. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70 (5):1060-1075.
- Yourassowsky E, Vanderlinden MP, Schoutens E. 1976. A rapid, simple method for demonstrating synergy of amikacin and penicillin against various microorganisms. *J Infect Dis*, 134S: 275-279.
- Yu Y, Zhou YF, Li X, Chen MR, Qiao GL, Sun J, Liao XP, Liu YH. 2016. Dose assessment of cefquinome by pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in mouse model of *Staphylococcus aureus* mastitis. *Front Microbiol*, 7:1595.
- Yuan L, Sun J, Wang R, Sun L, Zhu L, Luo X, Fang B, Liu Y. 2011. Pharmacokinetics and bioavailability of cefquinome in healthy ducks. *Am J Vet Res*, 72 (1): 122-126.
- Zak O, Kradolfer F. 1979. Effects of subminimal inhibitory concentrations in experimental infections. *Rev Infect Dis*, 5: 862-879.
- Zeiler HJ. 1985. Influence of pH and human urine on the antibacterial activity of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. *Drugs Exp Clin Res*, 11 (5): 335-338.

Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW, Cars O, Craig W, Andes D, Theuretzbacher U. 2011. Protein binding: do we ever learn? *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3067-3074.

Zhang S, Dai W, Lu Z, Lei Z, Yang B, He B, Zhou H, Cao, J. 2017. Preparation and evaluation of cefquinome-loaded gelatin microspheres and the pharmacokinetics in pigs. *J Vet Pharmacol Therap*, 41(1): 117-124.

Ziesch M, Krömker V. 2016. Factors influencing bacteriological cure after antibiotic therapy of clinical mastitis. *Milchwissenschaft*. 69: 7-14.

Ziv G, Rasmussen F. 1975. Distribution of labelled antibiotics in different components of milk following intramammary and intramuscular administration. *J Dairy Sci*, 58, 1637-1644.

Ziv G, Sulman FG. 1975. Absorption of antibiotics by the bovine udder. *J Dairy Sci*, 58 (11): 1637-1644.

Zonca A, Gallo M, Locatelli C, Carli S, Moroni P, Villa R, Cagnardi P. 2011. Cefquinome sulfate behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. *J Dairy Sci*, 94 (7): 3455-3461.