



**SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
AISLADOS DE MASTITIS BOVINA**

FCV (UNL)

MAESTRANDO
M.V. Norma Russi

Para optar por el grado de:

***MAGISTER SCIENTIAE* en CIENCIAS VETERINARIAS**

Mención Salud Animal

Lugar y fecha
Esperanza, 14 de mayo de 2008

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Maestría en Ciencias Veterinarias

Mención Salud Animal

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

AISLADOS DE MASTITIS BOVINA

MAESTRANDO

M.V. Norma Russi

Director

Dr. Luis F. Calvinho

Codirector

Dr. Carlos Bantar

Jurado

Dra. Liliana Odierno

M.Sc. Eduardo Picco

Dr. Eduardo Baroni

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Luis Calvino, por su enorme dedicación, generosidad y compañerismo, por sus precisas orientaciones y estímulo permanente para el aprendizaje.

A mi co-director, Dr. Carlos Bantar, porque por su apoyo técnico fue posible realizar este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Salud Pública (FCV-UNL) por poner a mi disposición la infraestructura y los elementos de su laboratorio para realizar gran parte de mi tesis.

A mis compañeros de la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales, ya que por su apoyo y reemplazo pude cursar la maestría: MV Sandra Pepino, MV Fernanda Cétola.

A mi querida amiga y compañera de estudio de Maestría, M.Sc. Onelia Lavaroni.

Al Dr. Nicolás Litterio por su asistencia técnica durante la realización de trabajos experimentales.

Al MV Armando Delgado, por facilitarme material bibliográfico.

ABREVIATURAS

AST	Subcomité de test de susceptibilidad antimicrobiana
AUC	Área bajo la curva
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIM ₅₀	Concentración inhibitoria mínima del 50% de las cepas
CIM ₉₀	Concentración inhibitoria mínima del 90% de las cepas
CI	Aclaramiento corporal
C _{max}	Concentración máxima observada
cMLS	Fenotipo de resistencia constitutiva a macrólidos, lincosaminas y streptograminas
DNA	Acido desoxirribonucleico
F	Fracción biodisponible
I	Intermedia
iMLS	Fenotipo de resistencia inducida a macrólidos, lincosaminas y streptograminas
IIM	Infección intramamaria
MRS	<i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistente
MRT	Tiempo medio de residencia
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBP 2a	Proteína de unión a penicilina 2a
PSA	Prueba de susceptibilidad a los antibióticos
R	Resistente
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
S	Sensible

SCCmec	Cassette cromosómico stafilocócico mec
SCN	Staphylococcus coagulasa negativos
UFC	Unidades formadoras de colonias
VAST	Subcomité de test de susceptibilidad a antimicrobianos de veterinaria
Vd	Volumen de distribución
Tmax	Tiempo al cual se alcanza la concentración máxima
T $\frac{1}{2}$ α	Semivida de distribución
T $\frac{1}{2}$ β	Semivida de eliminación aparente medida en la fase terminal
WHONET	Programa nacional e internacional de vigilancia de resistencia a antimicrobianos dependiente de la OMS

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 General	4
1.1.2 Específicos	5
2. Revisión bibliográfica	6
2.1 Terapia antibiótica de mastitis bovina	6
2.2 Resistencia a antibióticos	8
2.3 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	13
2.4 Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad	15
2.5 Estudios de susceptibilidad a antibióticos realizados en Argentina	18
2.6 Características de la eritromicina	19
2.7 Farmacocinética de la eritromicina	19
 CAPITULO I :	 21
 SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADOS DE MASTITIS BOVINA	 21
3. Materiales y métodos	21
3.1 Aislamientos bacterianos	21
3.2 Antimicrobianos	22
3.3 Prueba de difusión en agar	22
3.3.1 Preparación de placas e inóculo	22
3.3.2 Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados	 23
3.4 Prueba de concentración inhibitoria mínima por epsilómetro PDM	24
3.4.1 Preparación de placas e inóculo	24
3.4.2 Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados	 25
3.5 Prueba de susceptibilidad por el método de dilución en agar	26
3.5.1 Preparación de placas e inóculo	26
3.5.2 Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados	 27
3.6 Resistencia a penicilina	28
3.7 Detección de cepas resistentes a oxacilina	29
 4. Resultados	 31
 5. Discusión	 33
 6. Conclusiones	 40

CAPITULO II:	41
EVALUACION DE LOS CRITERIOS DE INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE DIFUSION EN AGAR PARA ERITROMICINA FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADOS DE MASTITIS BOVINA EN ARGENTINA	41
7. Materiales y métodos	41
7.1 Aislamientos bacterianos	41
7.2 Antimicrobianos y pruebas de susceptibilidad	41
7.3 Caracterización de los fenotipos de resistencia a eritromicina	42
7.4 Estudios cinéticos de eritromicina en leche y plasma	43
7.4.1 Animales experimentales	43
7.4.2 Administración de eritromicina y toma de muestra	43
7.4.3 Procedimientos analíticos	43
7.4.4 Análisis farmacocinéticos	44
7.5 Puntos de corte	44
8. Resultados	45
8.1 Susceptibilidad a eritromicina	45
8.2 Fenotipos de resistencia a eritromicina	45
8.3 Estimación de los puntos de corte	45
8.4 Concentración de eritromicina en sangre y leche	52
8.5 Estimación de puntos de corte	55
9. Discusión	58
10. Conclusiones	65
11. Referencias bibliográficas	66

RESUMEN

Se determinó la susceptibilidad *in vitro* frente a antimicrobianos de 95 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en la cuenca lechera central de Argentina utilizando el método de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y el método de difusión en agar. Las CIM₅₀ de penicilina, oxacilina, gentamicina, eritromicina, enrofloxacin y florfenicol fueron de 0,06, 0,25, 0,19, 0,125, 0,19 y 4 µg/ml, respectivamente, mientras que las CIM₉₀ fueron de 4, 0,25, 0,38, 0,25, 0,38 y 8 µg/ml, respectivamente. El mayor porcentaje de resistencia se observó frente a penicilina con un alto número de cepas productoras de beta-lactamasa, lo cual coincide con hallazgos previos en nuestro país, no detectándose cepas oxacilina resistente. Además, se evaluaron los puntos de corte actualmente utilizados en las pruebas de difusión en agar para la eritromicina para clasificar a cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en nuestro país. Se estimaron los puntos de corte para el método de difusión en agar utilizando los puntos de corte de CIM indicados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) sobre 192 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en Argentina, utilizando análisis de regresión lineal y método de “error rate-bounded”. Los puntos de corte establecidos en el presente estudio permitieron categorizar a los aislamientos en susceptibles, intermedios y resistentes, no detectándose errores mayores y arrojando una menor cantidad de errores menores que con los criterios de interpretación del NCCLS. Asimismo, a partir de estudios cinéticos de disposición de eritromicina en leche luego de la administración intramuscular, se establecieron puntos de corte de CIM para este antimicrobiano, no detectándose errores mayores y arrojando un número de errores similar al anterior. Estos resultados justifican

la revisión de los puntos de corte del método de difusión en agar para eritromicina frente a *S. aureus* aislados de mastitis.

Palabras clave: susceptibilidad antibiótica, *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina

SUMMARY

The *in vitro* activity of selected antimicrobial agents against 95 *Staphylococcus aureus* strains causing both clinical and subclinical bovine mastitis belonging to 61 dairy farms from the Central dairy area of Argentina was assessed using both minimal inhibitory concentration (MIC) and agar diffusion method. MIC₅₀ and MIC₉₀ were as follows: penicillin, 0.05 and 4 µg/ml; oxacillin, 0.25 and 0.25 µg/ml; gentamicin, 0.25 and 0.5 µg/ml; erythromycin 0.125 and 0.25 µg/ml; enrofloxacin 0.25 and 0.5 µg/ml, and florfenicol 4 and 8 µg/ml. No resistant isolates to oxacillin, enrofloxacin and florfenicol were detected by the agar diffusion method, while 48.4, 2.1 and 2.1% were resistant to penicillin, gentamicin and erythromycin, respectively. Beta-lactamase activity was detected in 89% of penicillin-resistant strains. In addition, interpretative breakpoints used in agar diffusion tests for erythromycin were evaluated using *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. Breakpoints for agar diffusion were estimated using minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) for 192 *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina on the basis of the linear regression analysis and error rate bounding. Breakpoints established in the present study allowed classification of isolates in susceptible, intermediate and resistant categories, finding no major errors and less minor errors than those detected using NCCLS interpretative criteria. MIC breakpoints were established based on kinetic studies following intramuscular administration of erythromycin. Using these MIC breakpoints, agar diffusion interpretative breakpoints were estimated obtaining lack of major errors and an acceptable percentage of minor errors. These results underscore the importance of

revising interpretative criteria for agar diffusion method used for erythromycin against *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina.

Key words: antibiotic susceptibility, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis

1. INTRODUCCION

La mastitis bovina es una de las limitantes más importantes de la producción lechera en todo el mundo (DeGraves and Fetrow, 1993). El control de la salud mamaria se basa en prácticas de higiene durante el ordeño y terapia antibiótica para el tratamiento de casos clínicos y subclínicos. En general, los casos clínicos se tratan durante la lactancia, mientras que las infecciones intramamarias (IIM) subclínicas son preferentemente tratadas durante el período de vaca seca. Los índices de curación bacteriológica, entendiendo por esta, la ausencia del organismo causante en la secreción mamaria tres o cuatro semanas luego del tratamiento, son altos frente a las distintas especies del género *Streptococcus*, mientras que frente a *Staphylococcus aureus* y organismos coliformes son mucho menores (Francis, 1989). La pobre respuesta a la terapia antibiótica frente a *S. aureus* se debe a factores tales como incorrecta dosificación, limitantes farmacocinéticas, latencia bacteriana, desarrollo de formas L, acción deletérea del antibiótico sobre los neutrófilos, reinfecciones y resistencia a los antibióticos (Anderson, 1986; Sandholm, 1991).

La terapia antibiótica tiene por objeto eliminar al agente infeccioso mediante la administración de una cantidad óptima de droga activa que supere y mantenga por un tiempo adecuado una concentración capaz de inhibir al organismo actuante en el sitio de la infección. Esto implica que, si se desea establecer un esquema terapéutico sobre una base racional, se deben conocer tanto la susceptibilidad a los antibióticos de los organismos causales, como los niveles esperados de antibiótico en el sitio de infección luego de su administración (Ziv, 1992).

Los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos pueden variar no solamente de acuerdo con la región geográfica, sino también de un rodeo a otro (Hinckley *et al.*, 1985). El conocimiento de estos patrones es de utilidad tanto en

estudios epidemiológicos, como para la selección de agentes antimicrobianos (Salmon *et al.*, 1998; De Oliveira *et al.*, 2000). En la práctica, la selección de las drogas antibióticas para el tratamiento de mastitis se realiza sobre la base de observaciones empíricas y por resultados de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos (PSA). Las pruebas en uso actualmente para determinar la susceptibilidad *in vitro* de los organismos patógenos de mastitis a los antimicrobianos son los métodos de difusión en agar y de dilución en caldo o agar (concentración inhibitoria mínima -CIM-) (National Committee for Clinical Laboratory Standards -NCCLS-, 2002). El método de difusión en agar o antibiograma, que se usa rutinariamente, expresa los patrones de susceptibilidad en términos cualitativos. Los resultados obtenidos a través de la lectura de los diámetros de inhibición, indican áreas de sensibilidad, de respuesta intermedia y de resistencia del organismo al antibiótico. Este método se correlaciona con el método cuantitativo, ya que los puntos de corte de los diámetros de inhibición corresponden a CIM dentro de los rangos de susceptibilidad y resistencia ajustadas de acuerdo con las concentraciones de antibióticos esperadas en suero tras su administración por vía parenteral (Baron and Finegold, 1990). Estos métodos son reproducibles y cuentan con controles de calidad rigurosos (NCCLS, 2002).

Los criterios de interpretación de estas pruebas en Medicina Veterinaria han sido cuestionados ya que están basados en datos de organismos patógenos y características farmacocinéticas obtenidas en seres humanos. Idealmente, los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad deben desarrollarse para el uso de cada droga antimicrobiana, frente a un agente patógeno específico y en un hospedador determinado. Para esto es necesario conocer la siguiente información: **1)** datos sobre la CIM de un

antibiótico determinado frente a una colección de organismos patógenos, **2)** datos sobre las características farmacocinéticas del antimicrobiano en el hospedador (el límite de susceptibilidad deberá estar por debajo de las concentraciones de droga que se alcancen en el tejido o fluido) y **3)** datos clínicos acerca de la eficacia de curación de las drogas demostrando que las cepas definidas como susceptibles deben haber respondido clínicamente a la terapia antibiótica (Watts and Yancey, 1994). Solamente para algunos antibióticos de uso corriente en terapéutica de IIM; como la pirlimicina, penicilina más novobiocina (Thornsberry *et al.*, 1993, 1997) y ceftiofur (Portis *et al.*, 2005), se cuenta con criterios de interpretación basados en los principios mencionados. Para otros antimicrobianos, los criterios de interpretación están basados sobre datos de CIM frente a organismos patógenos humanos y características farmacocinéticas de drogas en seres humanos.

En nuestro país, varios autores han informado acerca de la susceptibilidad *in vitro* de *S. aureus* aislados a partir de mastitis subclínicas y clínicas, expresada en términos cualitativos (Calvinho *et al.*, 1991a; b; Frigerio *et al.*, 1995; Rivero *et al.*, 1984; Rossetti, 1993; Tessi *et al.*, 1979; Weidmann *et al.*, 1988). La información expresada en términos cuantitativos generada en Argentina es escasa (Wainmaier, 1984; Gentilini *et al.*, 2000). Es necesario, por lo tanto, generar información de tipo cuantitativo sobre susceptibilidad de *S. aureus* de IIM frente a los antimicrobianos de uso más frecuente en nuestro país. Paralelamente, contando con esta información y conociendo las concentraciones en leche de antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis, será posible revisar los criterios de interpretación de las pruebas de

susceptibilidad y fijar las bases para estudios de correlación entre susceptibilidad *in vitro* y eficacia *in vivo*.

La eritromicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos, recomendado para el tratamiento de mastitis bovina causadas por cocos Gram positivos por alcanzar altas concentraciones en leche tras la administración parenteral o intramamaria (Ziv, 1980, 1992; Bajwa *et al.*, 2007). Este antibiótico es utilizado frecuentemente como representante del grupo de los macrólidos en las evaluaciones de susceptibilidad de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina (Watts and Salmon, 1997; De Oliveira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Giannechini *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2005). Basado en estos antecedentes, se establece la hipótesis de que los criterios de interpretación actuales de los tests de difusión en agar establecidos con patógenos humanos y datos de farmacocinética en humanos, no permiten una adecuada clasificación de los *Staphylococcus aureus* aislados de IIM bovinas en nuestro país.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Generales:

- 1) Determinar la susceptibilidad a antibióticos de *S. aureus* aislados de mastitis bovinas clínicas y subclínicas.

- 2) Evaluar los puntos de corte actualmente utilizados en las pruebas de difusión en agar para la eritromicina en cepas de *S. aureus* aisladas de IIM en nuestro país, según los criterios establecidos por la NCCLS, y estimar si se ajustan a las concentraciones esperadas en leche luego de la administración intramuscular de esta droga.

1.1.2. Específicos:

- 1) Determinar la susceptibilidad *in vitro* por métodos cuanti y cualitativos de *S. aureus* aislados de infecciones intramamarias frente a antibióticos seleccionados por su uso frecuente en mastitis bovina.

- 2) Detectar la producción de beta-lactamasa en aquellas cepas que mostraran resistencia a la penicilina.

- 3) Determinar los puntos de corte iniciales de la CIM para la eritromicina sobre la base de datos farmacocinéticos en leche.

- 4) Aplicar los puntos de corte definidos en el ítem 3 en la interpretación de pruebas de cualitativas de susceptibilidad *in vitro*.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Terapia antibiótica en mastitis bovina

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria causada generalmente por agentes microbianos. Esta enfermedad es uno de los limitantes más importantes de la producción lechera en todo el mundo. Se estima que debido a menor producción de leche, mayores costos por reemplazo de animales, costos de antibióticos, leche descartada debido a tratamientos antibióticos, costos por servicios veterinarios y trabajo extra, la capacidad productiva anual disminuye entre el 10 y 11% (De Graves and Fetrow, 1993; Bramley *et al.*, 1996).

La mastitis es una enfermedad multicausal, habiéndose identificado más de 80 agentes etiológicos, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Watts, 1988). La condición multietiológica de la mastitis bovina y la ubicuidad de algunos microorganismos en el ambiente dificultan su erradicación. Sin embargo, se cuenta con diversas medidas de manejo de la salud mamaria que, utilizadas en forma conjunta pueden contribuir a su control.

Los métodos actuales de control de mastitis fueron desarrollados hacia fines de la década del 60 y están basados en la prevención de las nuevas IIM (disminución de la incidencia), y la disminución de la duración de las IIM presentes en el rodeo (disminución de la prevalencia) (Booth, 1975). Los programas de control consisten en medidas de higiene durante la rutina del ordeño, incluyendo la desinfección de pezones, terapia antibiótica y descarte de animales con IIM crónicas. La terapia antibiótica es uno de los pilares de los programas de control, utilizándose para el tratamiento tanto de casos clínicos

como subclínicos. En general, los casos clínicos se tratan durante la lactancia, mientras que las mastitis subclínicas son preferentemente tratadas durante el período seco.

Dentro de los organismos aislados frecuentemente de IIM, *Staphylococcus aureus* es causante de mastitis contagiosa en el ganado lechero que se manifiesta de forma clínica o subclínica. Los cuadros clínicos pueden variar desde una forma peraguda hasta una leve, en la que no se observan signos generales de inflamación, sino solamente alteraciones locales (Anderson, 1983, Fox and Gray, 1993). La forma más común de mastitis por *S. aureus* es crónica, relativamente leve, caracterizada por ocasionales reapariciones de formas agudas o subagudas, comúnmente al parto, las cuales revierten a una forma subclínica a medida que avanza la lactancia y la glándula retoma su potencial productivo (Schalm *et al.*, 1971).

Los porcentajes de curación bacteriológica luego de terapia antibiótica, entendidos como la ausencia en leche del organismo causante, son altos frente a estreptococos, mientras que frente a *S. aureus* son de alrededor del 60% a las tres o cuatro semanas después del tratamiento (Sandholm, 1991). Las razones de la pobre respuesta a la terapia antibiótica frente a *S. aureus* se deben a factores tales como incorrecta dosificación, limitantes farmacocinéticas, latencia bacteriana, desarrollo de formas L, acción deletérea del antibiótico sobre los neutrófilos, reinfecciones, así como resistencia a los antibióticos (Anderson, 1986; Sandholm, 1991).

2.2. Resistencia a antibióticos

La información genética que controla la resistencia bacteriana hacia los agentes antimicrobianos se halla codificada en el DNA cromosómico y extracromosómico (plásmidos). La resistencia a antibióticos es un fenómeno que se adquiere por transferencia horizontal de los determinantes de resistencia de una célula donante, a menudo de otra especie, mediante transformación, transducción y/o conjugación, aunque también se puede transmitir mediante transposones (Joklik *et al.*, 1994). Además, también se puede con menor frecuencia por mutación.

Existen diversos mecanismos bioquímicos por los que se expresa la resistencia a ciertos antimicrobianos. Estos son:

- **Disminución de la permeabilidad celular:** se genera por cambios en receptores específicos y/o pérdida de la capacidad de transporte activo para una determinada droga. También se pueden producir cambios estructurales en la membrana celular que influyen en la permeabilidad en forma no específica, como la modificación estructural de las porinas y otras proteínas de membrana. (Joklik *et al.*, 1994)

- **Inactivación enzimática de la droga:** este tipo de resistencia se debe a ciertas enzimas que producen cambios conformacionales en las drogas. Estas enzimas pueden ser constitutivas o inducibles, como las penicilinasas o betalactamasas, y la mayor parte de su actividad es extracelular en las bacterias Gram positivas (Joklik *et al.*, 1994). Es el caso del gen *blaZ* (portado por un plásmido) que codifica para la síntesis de betalactamasa en *Staphylococcus*, responsable de la degradación del anillo betalactámico de las penicilinas (Brakstad & Maeland, 1997). También pueden ser

degradados por enzimas los antibióticos aminoglucósidos y el cloramfenicol (Joklik *et al.*, 1994).

- **Modificación del sitio blanco donde actúa la droga:** este tipo de resistencia se genera por mutaciones cromosómicas, o por la acción de genes presentes en plásmidos que producen cambios en enzimas o sitios activos involucrados en reacciones metabólicas esenciales para la célula. Estos cambios disminuyen o bloquean la afinidad del antimicrobiano por el sitio blanco, como ocurre con la resistencia de *S. aureus* a meticilina codificada por el gen cromosómico adquirido “*mecA*”. La meticilino-resistencia está asociada fenotípicamente con la presencia de una transpeptidasa adicional PBP_{2a} (Proteína de Unión a Penicilina), ausente en cepas de *Staphylococcus* susceptibles (Joklik *et al.*, 1994).

La pared de las bacterias está formada en su mayor parte por una macromolécula constituida por residuos alternados de los aminoazúcares, N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico, unidos por enlaces β 1-4. El grupo carboxilo del ácido láctico de cada residuo de N-acetil-D-murámico se une al grupo amino del aminoácido terminal de un tetrapéptido. El tercer aminoácido del tetrapéptido, L-lisina, se une mediante un pentapéptido de D-glicina al cuarto aminoácido (D-alanina) del tetrapéptido de la cadena de aminoazúcares lateral adyacente, con liberación del 5 residuo de D-alanina. Esta unión ocurre en la última etapa de la síntesis de la pared celular, se denomina transpeptidación indirecta y contribuye a la formación de una matriz densa. Es precisamente esta última etapa de la

síntesis del peptidoglicano la que es inhibida por los antibióticos beta-lactámicos (Hardman *et al.*, 1996).

La conformación estereoscópica de la penicilina es muy semejante a la del pentapéptido inicial unido al ácido N-acetilmurámico. La transpeptidasa probablemente es acilada por la penicilina, es decir, al parecer se forma la enzima peniciloil, con ruptura de la ligadura –CO-N- del anillo betalactámico (Hardman *et al.*, 1996). Altos niveles de resistencia a meticilina y otros antibióticos beta lactámicos se adquieren y expresan a través del gen *mecA*. La PBP_{2a} es una proteína que pertenece a un grupo de enzimas biosintéticas involucradas en el ensamblaje de los componentes del peptidoglicano de la pared bacteriana. El gen *mecA* es transportado con otros componentes genéticos en un extenso elemento genético llamado cassette cromosómico estafilocócico *mec* (staphylococcal chromosomal cassette) (SCC*mec*) que está integrado dentro del cromosoma MRSA, cerca del origen de replicación. Se cree que SCC*mec* ha sido adquirido por transferencia horizontal a partir de especies de *Staphylococcus*, posiblemente patógenos animales, como *S. sciuri* (Lambert , 2005). No obstante, el donador original de *mecA* de *Staphylococcus* es desconocido, pero este gen no ha sido identificado fuera de este género. *Staphylococcus sciuri*, tiene una PBP intrínseca que comparte un 87,8 % de aminoácidos homólogos con la PBP_{2a}, y esto sugiere que éste es el precursor más probable en homología con *S. aureus*.(Enright, 2003).

La expresión de la PBP_{2a}, también está regulada por proteínas codificadas por un plásmido portador de los genes *blaR1-blaI* sistema inductor-represor y el correspondiente sistema genómico *mecRI-mecI*. Los productos de *blaR1-blaI* son

importantes para la regulación de la producción de beta lactamasas y expresión de *mecA* (Brakstad & Maeland, 1997). La expresión fenotípica de la meticilino-resistencia está influenciada, además, por un número adicional de factores, como los productos codificados por el gen *fem* cromosómico, los cuales son importantes para la síntesis de precursores moleculares normales del peptidoglicano. También, las propias enzimas autolíticas del microorganismo son importantes en la expresión de la meticilino-resistencia, así como otros mecanismos no dependientes del gen *mec* (bacterias meticilino-resistentes “borderline”), tales como: hiperproducción de beta-lactamasa; producción de meticilinasas; modificación de la estructura normal de las PBPs o aparición de variantes de “colonias pequeñas de *S. aureus*” (Brakstad & Maeland, 1997).

Históricamente, las cepas de *Staphylococcus* resistentes a los antibióticos betalactámicos estables a las penicilinasas, han sido referidos como MRSA (*S. aureus* meticilina-resistente) o MRS (*Staphylococcus spp.* meticilina-resistente). Las siglas se siguen utilizando aunque la meticilina ya no sea la droga de elección para la determinación de la sensibilidad o para el tratamiento. El término meticilina-resistente u oxacilina-resistente es indistinto (Famiglietti *et al.*, 2004) La resistencia a meticilina se detecta con los discos de oxacilina (1 ug) y cefoxitina (30 ug) (Boutiva-Ben Boubaker *et al.*, 2004). La utilización de ambos discos aumenta la sensibilidad y especificidad en la detección de la resistencia mediada por el gen *mecA* (Famiglietti *et al.*, 2004). Este método está avalado por varios estudios y se considera más adecuado que la prueba de difusión basada únicamente en el empleo del disco de oxacilina (Swenson *et al.*, 2005; Cauwelier *et al.*, 2004; Urbaskova *et al.*, 2004).

4- Otros mecanismos de resistencia: los antibióticos macrólidos inhiben la síntesis proteica bacteriana al actuar sobre la fracción 50S de los ribosomas, resultando en el bloqueo de la translación del ARN-t-aa por interferencia estérica (Joklik *et al.*, 1994). *Staphylococcus aureus* presenta tres mecanismos de resistencia conocidos a macrólidos, lincosaminas y streptogramina B (MLS) que son:

a) Modificación del sitio blanco del antibiótico (ribosomas) . Se debe a la producción de una enzima, llamada metilasa (mediada por genes *ermB* y *ermC*), que produce la dimetilación de un residuo adenina específico, con el consiguiente cambio conformacional del residuo 23S de la subunidad 50S rRNA, y por consiguiente reduce su afinidad por la eritromicina. Los ribosomas modificados presentan resistencia cruzada entre macrólidos, lincosaminas y streptograminas B. Este tipo de resistencia MLS puede ser constitutiva o inducible (Denis *et al.*, 2002).

b) Sistema de eflujo: este mecanismo es menos común. La bomba de eflujo activo es codificada por los genes *msrA* y *msrB* (Denis *et al.*, 2002). Este fenotipo indica únicamente resistencia a los compuestos de 14 átomos de carbono, incluida la eritromicina, y estreptograminas B solamente.

c) Inactivación enzimática : el mecanismo se basa en la enzima acetiltransferasa que inactiva streptogramina A codificada por el gen *vatB* (Denis *et al.*, 2002).

La resistencia bacteriana a aminoglucósidos también se debe en parte a alteración del sitio blanco del antibiótico por mutación en la molécula de RNA 16S y de las proteínas de la subunidad 30S, con pérdida de la afinidad de la droga por ese sitio (Joklik *et al.*, 1994).

Las quinolonas actúan como inhibidoras de la función del DNA, bloqueando de forma selectiva y reversible la replicación del DNA, inhibiendo la subunidad A de la DNA girasa. Mutaciones en la subunidad A de la DNA girasa han sido implicadas en resistencia de *S. aureus* a estas drogas (Joklik *et al.*, 1994).

2.3. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos fueron desarrolladas con el objeto de brindar información que pueda ser utilizada para la selección de la terapia antimicrobiana. Estas pruebas deben proveer resultados reproducibles que manifiesten una fuerte correlación con la eficacia del antibiótico *in vivo*. Estos datos están bien definidos en Medicina humana y poco en Medicina veterinaria (Watts and Yancey, 1994). La mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario usan los procedimientos de prueba recomendados por el NCCLS, realizando tanto las técnicas de difusión en agar con discos de antibióticos como las de dilución en agar o caldo, ya que están bien documentadas, ofrecen una alta reproducibilidad y rigurosos controles de calidad (NCCLS, 2002).

En el caso específico del tratamiento antibiótico de mastitis bovina, la interacción de la leche con el agente antimicrobiano ha llevado a cuestionar la validez de los métodos de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Se ha observado que los valores de CIM y concentración bactericida mínima obtenidos en leche son generalmente superiores a aquellos obtenidos en el caldo de cultivo en que se realizan estas pruebas (Ali-Vehmas *et al.*, 1997; Louhi *et al.*, 1992; Owens and Watts, 1987; Sandholm *et al.*, 1991; Ziv, 1969), mostrando una menor actividad antibacteriana de la

droga en leche. Esto indica que los medios de cultivo utilizados en las pruebas estandarizadas no reflejarían el comportamiento del antibiótico en la leche. Sin embargo, dadas las variaciones que presenta la leche respecto de su contenido en proteínas, grasa y cationes, es difícil estandarizar pruebas que utilicen leche como medio de cultivo para reemplazar a las pruebas usadas actualmente (Watts and Yancey, 1994).

El éxito terapéutico depende de la sensibilidad del agente patógeno y de la capacidad del principio activo de lograr y mantener concentraciones útiles en el interior de la glándula. Estas concentraciones deben ser superiores a la CIM de la droga para permitir la eliminación del agente junto con la participación de los mecanismos defensivos naturales de la mama. La aplicación de antibióticos para el tratamiento de mastitis, ya sea por vía intramamaria o parenteral, tendrá por lo tanto como propósito lograr concentraciones significativas en el sitio de infección (Errecalde *et al.*, 1999; Ziv, 1992).

La recuperación del estado de salud luego del tratamiento se define usualmente como una respuesta clínica favorable con la erradicación del patógeno del sitio de infección. Se considera aceptable que la correlación entre los datos de susceptibilidad *in vitro* y el resultado de la terapia antibiótica *in vivo* sea mayor del 85%. Las pruebas *in vitro* permiten pronosticar el resultado terapéutico de IIM causadas por *Staphylococcus* spp. recientemente adquiridas, pero su utilidad es dudosa para pronosticar la eficacia de tratamiento en IIM crónicas causadas por *S. aureus* (Owens *et al.*, 1997).

2.4. Criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad

A partir de la información de la CIM de una colección de cepas y los datos del comportamiento farmacocinético del antibiótico es posible la selección de un punto de corte inicial de CIM. El parámetro final para seleccionar los criterios de interpretación *in vitro* debe estar basado en la respuesta clínica con la dosis aprobada (Watts and Yancey, 1994). El método de difusión en agar clasifica a las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes siguiendo las recomendaciones de la NCCLS. La mayoría de los criterios de interpretación, sin embargo, están basados en datos de la CIM de cada patógeno y datos farmacocinéticos de las drogas obtenidos en seres humanos. En la mayoría de los casos, los puntos de corte para definir susceptibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano están basados en las concentraciones de droga alcanzadas en sangre luego de la administración de la dosis usual por vía intravenosa u oral en un paciente promedio (Thornsberry *et al.*, 1993). En consecuencia, es necesario generar información, tanto de CIM obtenidos a partir de distintas bacterias de importancia veterinaria, como de concentraciones alcanzadas en fluidos animales para el desarrollo de nuevos criterios interpretativos para la categorización de los patógenos veterinarios (Watts and Yancey, 1994b).

Hasta el presente, se han desarrollado criterios interpretativos para la pirlimicina, una combinación de penicilina+novobiocina y ceftiofur, a partir de los datos de susceptibilidad de patógenos de mastitis y datos farmacocinéticos obtenidos a partir de infusión directa de estos agentes antimicrobianos en la glándula mamaria bovina (Thornsberry *et al.*, 1993, 1997; Portis *et al.*, 2005). Sin embargo, para la mayoría de los antimicrobianos, de uso frecuente o potencial en mastitis bovina, no existen criterios

de interpretación obtenidos en las condiciones mencionadas. Los criterios actualmente recomendados por el NCCLS para antimicrobianos como ampicilina, cefalotina, cloxacilina, eritromicina, penicilina y tetraciclina están basados en criterios de interpretación desarrollados en seres humanos (NCCLS, 2002).

La información necesaria para la interpretación de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* en algunos casos puede ser provista por el laboratorio fabricante del agente antibacteriano. Alternativamente, el NCCLS utiliza procesos formales de consenso con el objeto de desarrollar métodos para la estandarización de los test de susceptibilidad *in vitro* y su interpretación. Dentro de la NCCLS funcionan el Subcomité de Test de Susceptibilidad Antimicrobiana (AST) y el Subcomité de Test de Susceptibilidad Antimicrobiana Veterinaria (VAST). El AST fue formado en 1968 y ha estandarizado los métodos de prueba y su interpretación hasta diciembre de 1994. Consecuentemente, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico bacteriológico, incluyendo aquellos de medicina veterinaria, utilizaron los métodos y los criterios interpretativos generados por el AST. Considerando la carencia de procedimientos de prueba estandarizados y criterios de interpretación para los resultados de las pruebas de susceptibilidad realizadas con organismos patógenos veterinarios, el NCCLS aprobó la formación del VAST en 1992. Consecuentemente, usando los documentos generados por el AST, el VAST generó una propuesta de estándar en diciembre de 1994, que fue aprobado a fines de 1999. En los documentos publicados por el VAST se detallan métodos estandarizados para las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos mediante difusión y dilución para bacterias aisladas de animales, así como el desarrollo de criterios de

interpretación de las pruebas (NCCLS, document M31-A2 2002; NCCLS document M37-A, 1999).

Uno de los problemas de las pruebas de susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos, es relacionar la CIM de los aislamientos (técnica cuantitativa) con los diámetros de inhibición con disco (técnica cualitativa). El NCCLS (1999) en su documento M37–A propone un esquema de clasificación en base a análisis de regresión lineal y al método de “error rate-bounded” (Metzler and DeHaan, 1974) para relacionar CIM y diámetros de inhibición (definidos como Z) de los distintos aislamientos evaluados frente a un antimicrobiano. Los puntos de corte de Z que derivan de la CIM deben ser aquellos que den el menor número de resultados falsos susceptibles y falsos resistentes, con un mínimo número de otras clasificaciones incorrectas. Estos puntos de corte serán luego utilizados para predecir la susceptibilidad del organismo basada en la clasificación de CIM del antibiótico (NCCLS, 1999; MacGowan and Wise, 2001). De esta forma, un falso susceptible por el test de difusión en agar puede determinar un tratamiento antibiótico erróneo y es por lo tanto considerado como un error serio, definiéndose como “very major error”. La tolerancia para este tipo de errores es baja, inferior al 1,5% según el NCCLS (1999) e inferior a 1% según MacGowan and Wise (2001). La falsa clasificación como resistente se considera menos seria y se define como “error mayor” (major error) y presenta una tolerancia con una tasa superior de error inferior a 3,0 % según el NCCLS (1999) e inferior a 5,0 % según MacGowan and Wise (2001). Cuando una de las pruebas resulta intermedia y la otra susceptible o resistente, es definido como un “error menor” (minor error), el cual tiene una mayor tasa de tolerancia (Metzler and DeHaan, 1974).

2.5. Estudios de susceptibilidad a antibióticos realizados en Argentina

En nuestro país se realizaron varios estudios de susceptibilidad a antimicrobianos de *S. aureus* aislados de mastitis bovina por el método de difusión en agar. En la tabla 1 se incluyen aquellos estudios en los cuales se consignaron datos sobre número de tambos y/o número de aislamientos incluidos.

En trabajos de susceptibilidad antibiótica realizados en la cuenca lechera santafesina, se encontró baja sensibilidad de *S. aureus* a cloramfenicol, tetraciclinas y muy baja a penicilina (Weidmann *et al.*, 1988), difiriendo de lo observado en años previos (Tessi *et al.*, 1979). Otras investigaciones, encontraron un alto porcentaje de cepas provenientes de mastitis clínicas resistentes a estreptomicina y alta susceptibilidad a penicilina, cloramfenicol y tetraciclinas (Calvinho *et al.*, 1991a); mientras que en otros estudios, incluyendo cepas de casos subclínicos y clínicos, la sensibilidad a penicilina resultó muy baja (Calvinho *et al.*, 1991b; Calvinho *et al.*, 2002).

Tabla 1. Porcentaje de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina resistentes a antimicrobianos seleccionados en estudios realizados en Argentina.

Autores	Núm. Tambos	Núm. Cepas	% aislamientos resistentes							
			Pen	Oxa	Cef	Eri	Stm	Cmp	Tet	TMS
1	40	52	20	-	-	8	16	8	8	8
2	-	62	45,9	-	13,1	-	-	4	28	23,6
3	25	104	67,86	-	29,14	-	-	42,86	50	-
4	21	33	14,81	-	-	-	29,62	6,89	8,33	-
5	38	79	77,5	-	-	-	-	14,9	2,3	-
6	8	10	23	0	7,7	-	23,1	-	-	15,4
7	9	20	25	0	0	0	10	0	5	0
8	-	206	40,3	0	0	11,6	-	0	-	-
9	39	101	47,6	0	-	2	-	-	-	-

Referencias: (1) Tessi *et al.*, (1979), Cuenca lechera Santa Fe; (2) Rivero *et al.*, (1984), Cuenca Abasto Bs. As.; (3) Weidmann *et al.*, (1988), Sta. Fe (Dto. Las Colonias); (4) Calvinho *et al.*, (1991a), Santa Fe (Dtos. Las Colonias y Castellanos); (5) Calvinho *et al.*, (1991b), Santa Fe (Dtos. Las Colonias y Castellanos); (6) Rule *et al.*, (1992), centro Bs. As.; (7) Rossetti, C.A. (1993), Cuenca Abasto de Bs. As.; (8) Gentilini *et al.*, (2000), Provincias de Bs As, Santa Fe, Entre Ríos y Mendoza; (9) Calvinho *et al.*, (2002), Cuenca lechera Central.

Pen: penicilina; Oxa: oxacilina; Cef: cefalosporinas de primera generación; Eri: eritromicina; Stm: estreptomicina, Cmp: cloramfenicol; Tet: tetraciclina; TMS: trimetoprima y sulfametoxazol.

En estudios realizados con cepas provenientes de la cuenca de abasto de Buenos Aires, se encontró alta sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* frente a cloramfenicol y cefalosporinas de primera generación y baja sensibilidad a penicilina y tetraciclinas (Rivero *et al.*, 1984). Un trabajo posterior llevado a cabo en la misma cuenca mostró que un 25% de cepas de *S. aureus* provenientes de muestras de mastitis subclínicas presentaba resistencia a penicilina (Rossetti, 1993). No se detectaron cepas resistentes a oxacilina (Rule *et al.*, 1992; Rossetti, C., 1993; Gentilini *et al.*, 2000; Calvino *et al.*, 2002).

2.6. Características de la eritromicina

Es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, producido por el actinomiceto *Streptomyces erythreus*. Esta familia de antibióticos incluye compuestos con anillo lactónico de 14, 15 o 16 átomos de carbono al que se unen, mediante enlaces glucosídicos, uno o varios azúcares neutros o básicos. La eritromicina tiene la propiedad de ser una base débil, poco soluble en agua, con un pKa (constante de disociación) de 8,8 y un elevado peso molecular (700 Da) (Mensa *et al.*, 2003). Este antibiótico puede ser bactericida o bacteriostático, según el microorganismo y la concentración de la droga. La actividad bactericida es máxima contra un pequeño número de microorganismos de división rápida (Hardman *et al.*, 1996)

2.7. Farmacocinética de la eritromicina

Se diferencia de otros antibióticos porque sus moléculas no ionizadas son altamente liposolubles, atravesando las barreras biológicas fácilmente por difusión pasiva y probablemente por la existencia de un transporte activo dependiente del calcio para alcanzar idénticas concentraciones en ambos lados de la membrana (Mensa *et al.*,

2003). La concentración en el citoplasma celular es varias veces superior a la sérica, acumulándose la mayor parte del antibiótico en los fagolisosomas (Mensa *et al.*, 2003). Se distribuye a través del cuerpo en la mayoría de los fluidos, células y tejidos, incluyendo próstata, pulmón, glándula mamaria, macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, aunque con escaso acceso al líquido cefalorraquídeo (< 10% de la sérica).

La penetración de este fármaco a los tejidos de difícil acceso es debida a su gran liposolubilidad, de tal manera que la concentración que alcanza en ellos está influenciada por su unión a proteínas plasmáticas (25% a 50%), y por la velocidad con que disminuye su concentración en plasma (Baggot, 1986). Se excreta primariamente sin modificaciones por la bilis, aunque en parte es metabolizada en hígado por vía de la N-dimetilación, transformándose en un metabolito inactivo. Sólo del 2% al 5% es excretada por orina sin modificación de su estructura molecular. La vida media de la eritromicina es de 200 minutos en vacas (Bagott, 1986).

CAPÍTULO I
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE *S. AUREUS* AISLADOS DE
MASTITIS BOVINA.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Aislamientos bacterianos

Fueron evaluados 95 cepas de *S. aureus* obtenidos de casos de mastitis clínicas (n=25) y subclínicas (n=70) de vacas pertenecientes a 61 establecimientos lecheros ubicados en distintas cuencas de Argentina. De cada establecimiento se tomaron desde un aislamiento hasta un máximo de tres. Sesenta y seis aislamientos provenían de 42 establecimientos ubicados en la provincia de Santa Fe, 17 aislamientos de 12 establecimientos ubicados en la provincia de Córdoba, 10 aislamientos de seis establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires y dos de un establecimiento ubicado en la provincia de Entre Ríos. Las muestras de secreción mamaria fueron obtenidas en forma aséptica de acuerdo con metodología estándar (Hogan et al., 1999).

A partir de cada muestra fueron sembrados 0,01 ml en agar base Columbia (Laboratorio Britania, Buenos Aires) suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada, incubándose por 24 a 48 hs a 35° C en aerobiosis. Los aislamientos fueron diferenciados del género *Streptococcus* sobre la base de morfología colonial, tipo de hemólisis y prueba de catalasa, y del género *Micrococcus* sobre la base de la prueba de oxidación/fermentación de la glucosa (Carter et al., 1995). Las cepas caracterizadas como pertenecientes al género *Staphylococcus* fueron identificadas como especie *aureus* por pruebas convencionales (Hogan et al., 1999). Como control para la prueba de coagulasa se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould 305). Luego de la

identificación, los aislamientos fueron conservados a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (Laboratorio Britania, Buenos Aires) adicionado con glicerol al 10% hasta la realización de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

3.2. Antimicrobianos

Los discos de antimicrobianos utilizados en las pruebas de difusión en agar fueron almacenados a -20°C y llevados a temperatura ambiente una hora antes de su uso para evitar la condensación. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: penicilina (10 U); oxacilina (1 μg); eritromicina (15 μg); gentamicina (10 μg) (Laboratorio Britania, Buenos Aires), enrofloxacin (5 μg) (Neo-SensitabsTM, Rosco, Dinamarca), florfenicol (30 μg) (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland, EE.UU.). Para determinar la CIM por el método del epsilómetro (E-Test) (AB Biodisk, Dalvågen, Solna, Suecia) se utilizaron los mismos antimicrobianos, excepto para florfenicol, en cuyo caso se realizó la prueba de dilución en agar por no hallarse comercialmente disponible E-Test para este antibiótico.

3.3. Prueba de difusión en agar

3.3.1. Preparación de placas e inóculo

Se realizó de acuerdo con las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Se utilizó agar Mueller-Hinton (Laboratorio Britania, Buenos Aires) como medio de prueba distribuido en placas de Petri de 90 mm de diámetro hasta un nivel de 4 mm de profundidad. Las placas fueron preparadas y conservadas a 8°C hasta su utilización dentro del mismo día o hasta 5 días desde la preparación. El pH fue regulado a 7,2-7,4 a temperatura ambiente y la

esterilidad de cada lote fue controlada incubando una placa 24 hs a 35°C. La humedad excesiva en la superficie del medio antes de su uso fue eliminada por previa incubación a 35°C durante 10 a 30 minutos. El estándar de turbidez del inóculo fue ajustado al 0,5 de la escala Mc Farland que corresponde a una suspensión de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Los aislamientos fueron descongelados a temperatura ambiente, tomándose una ansada del caldo que fue inoculada por agotamiento en superficie en agar sangre ovina al 5%, incubándose a 35°C por 18 a 24 h para observación de desarrollo y control de pureza. A partir de este cultivo, se inocularon 2 a 3 colonias en caldo tripteína soya (Laboratorio Britania, Buenos Aires), el cual fue incubado a 35°C por 3 a 5 h., hasta lograr ajuste de turbidez compatible con el estándar 0,5 de Mc Farland. Inmediatamente después de ajustado el inóculo se sembraron las placas de agar Mueller-Hinton con un hisopo estéril, presionando el mismo contra las paredes del tubo con el fin de escurrir el exceso de medio. Sobre la superficie seca del agar se desplazó el hisopo en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Se esperaron 5 minutos antes de aplicar los discos con antibióticos para absorber el exceso de humedad.

3.3.2. Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados

Se colocaron los discos seleccionados sobre la superficie del agar inoculada, con pinza de disección estéril aplicando una ligera presión, a una distancia no menor de 24 mm desde un centro a otro de cada disco aplicando no más de 5 discos por placa. La oxacilina se evaluó por separado. Las placas se incubaron invertidas a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos en atmósfera ambiental. Después de 18 hs de incubación las placas fueron examinadas y se midieron los diámetros de las

zonas de inhibición, excepto para los discos de oxacilina, que fueron medidos a las 24 hs de incubación. En la lectura se tuvieron en cuenta las áreas que no mostraron desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas detectadas en el borde de la zona. Se tuvieron en cuenta las zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo confluyente. Los tamaños de las zonas de inhibición para penicilina, oxacilina, gentamicina y eritromicina fueron interpretados según estándares de la NCCLS para patógenos veterinarios (NCCLS, 2002); mientras que para florfenicol se utilizó el criterio de interpretación brindado por el laboratorio Schering Plough (comunicación personal) y para enrofloxacin el criterio indicado por el laboratorio productor de los discos (Rosco, Dinamarca). La cepa de referencia utilizada para control de calidad del ensayo (rangos para susceptibilidad en mm para test del disco) fue *S. aureus* ATCC 25923.

3.4. Prueba de concentración inhibitoria mínima por Epsilómetro PDM

3.4.1. Preparación de placas e inóculo

Esta técnica cuantitativa se utilizó para determinar la CIM, expresada en $\mu\text{g/ml}$ de agentes antimicrobianos. En las tiras reactivas de E-test (AB Biodisk, Dalvågen, Solna, Suecia) los antimicrobianos se encuentran adsorbidos a tiras plásticas no porosas de 5 x 50 mm con un gradiente exponencial continuo del antibiótico a evaluar en una cara de la misma, y de una escala de lectura en la otra. El gradiente obtenido cubre las concentraciones adecuadas para realizar la CIM del antibiótico probado (de 0,002 a 32 $\mu\text{g/ml}$; de 0,016 a 256 $\mu\text{g/ml}$ ó 0,064 a 1024 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo del antibiótico). Estos valores pueden ser más precisos que CIM convencionales basados en dobles diluciones en serie discontinuas. Las tiras fueron almacenadas a -80°C . Como medio de prueba se

utilizó agar Mueller-Hinton con un espesor de $4 \pm 0,5$ mm (NCCLS, 2002). El inóculo se preparó siguiendo las normas de NCCLS (2002) para CIM. Se homogeneizaron colonias individuales a partir de placas de agar sangre ovino al 5% de 18 a 24 hs de incubación como fuera descripto anteriormente, ajustándose al estándar de turbidez 0,5 Mc Farland.

3.4.2. Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados

Para la inoculación de las placas se siguieron las recomendaciones de NCCLS (2002); utilizando un hisopo como fuera descripto para la prueba de difusión en agar. Luego de la inoculación, se dejó secar la superficie del agar durante 10 a 15 minutos. Las tiras de E-test se retiraron del congelador de 30 a 60 minutos previo a la inoculación, manteniéndose a temperatura ambiente. Se aplicaron las tiras con pinzas, tomando la precaución que la concentración máxima se hallara lo más cerca posible del borde de la placa. Las mismas fueron incubadas inmediatamente a 35°C, en atmósfera aerobia por 16 a 18 h, y hasta 24 h para oxacilina. Las placas se observaron después del período de incubación recomendado y se consideraron sólo cuando el crecimiento fuera suficientemente visible y la elipse de inhibición claramente observable. El valor de CIM se tomó en el punto de intersección entre el extremo de la elipse de inhibición y la cinta de E-test. Debido a que E-test comprende un gradiente continuo, se pueden obtener valores de CIM entre diluciones de doble entrada. Estos valores fueron redondeados hacia la siguiente dilución mayor de doble entrada. El punto final se leyó como inhibición completa de total crecimiento. Para control de calidad fue utilizado *S. aureus* ATCC 29213.

3.5. Prueba de susceptibilidad por el método de dilución en agar

3.5.1. Preparación de placas e inóculo

Para esta prueba el antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contiene una concentración diferente de antibiótico. El inóculo de las distintas cepas del microorganismo se puede aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador, que transfiere 25 inóculos a la vez por placa. Se obtuvo florfenicol (Laboratorios Over) con una potencia de ensayo 99,47 %. La solución madre o stock se preparó teniendo en cuenta el dato de potencia aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volúmen (ml)} \times \text{Concentración (g/ml)}}{\text{Potencia de ensayo (g/mg)}}$$

Se preparó una solución stock de 514,73 mg en 10 ml, utilizando como solvente acetonitrilo (Sintorgan, Buenos Aires). Pequeños volúmenes de la solución madre (1,5 ml) se envasaron en tubos tapa a rosca estériles y se almacenaron a -80°C al abrigo de la luz hasta su uso, siendo descartados los restos de volúmenes sobrantes. Para determinar el número de concentraciones a evaluar se tuvieron en cuenta estudios previos realizados con *S. aureus* obtenidos de animales (Yoshimura *et al.*, 2002). Se eligió un rango de concentraciones que incluyeran el rango de CIM de al menos una cepa patrón de control de calidad. Consecuentemente se utilizaron 5 diluciones en base dos de 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$.

Como medio de prueba se utilizó agar Mueller-Hinton. Luego de esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos, se dejó enfriar en baño María a 48-50°C antes de agregar en forma aséptica la solución de florfenicol y finalmente se vertió el medio adicionado con antibiótico en las placas correspondientes a razón de 9 partes del agar fundido, con 1 parte de cada dilución de antibiótico. El pH del medio se determinó para cada partida permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidificara alrededor del bulbo del electrodo del peachímetro. Las placas se prepararon de modo de alcanzar una profundidad de agar de 4 mm y se almacenaron entre 4–8°C por un período de hasta 5 días. Antes de realizar las inoculaciones, las placas fueron equilibradas a temperatura ambiente o hasta la desaparición de humedad de su superficie en estufa a 35°C. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 29213 cada vez que se realizó el test, para determinar el potencial deterioro de los antimicrobianos. Se prepararon placas sin antimicrobianos como control.

El inóculo se preparó tocando la parte superior de 2 a 3 colonias del mismo tipo en agar sangre ovina al 5% y transfiriéndolas a un tubo que contenía 5 ml de caldo tripteína soya. Esta solución se incubó a 35°C hasta presentar turbidez, y se ajustó al patrón de turbidez 0,5 de Mc Farland. Los cultivos ajustados a este estándar fueron diluidos 1:10 en caldo tripteína soya para obtener la concentración deseada de inóculo de 10^7 UFC/ml.

3.5.2. Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados

Se utilizó un multi inoculador, el cual depositó aproximadamente 1 µl de cada aislamiento a examinar sobre la superficie del agar. El inóculo final en el agar fue de

aproximadamente 10^4 UFC en un área de diámetro de 5 mm. La superficie del agar a inocular se secó colocando las placas en estufa con las tapas semiabiertas. A partir de los tubos de cada cepa con la suspensión bacteriana ajustada (10^7 UFC/ml) se colocó una alícuota de cada suspensión dentro de cada pocillo correspondiente en el bloque sembrador del multi inoculador. Se inoculó primero una placa control (sin antibióticos) y luego se repitió la operación con las placas conteniendo las diferentes concentraciones de antimicrobiano, comenzando por la menor concentración. Al finalizar, se inoculó una segunda placa control para asegurarse la ausencia de contaminación o de traspaso de antimicrobianos durante el proceso. Las placas inoculadas, se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos del inóculo fuera absorbida por el agar. Luego se invirtieron las mismas y se incubaron a 35°C por 16 a 20 h. Para determinar los puntos finales, las placas se observaron sobre una superficie oscura. Se registró la CIM como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento. No se consideraron colonias individuales o la zona borrosa causada por el inóculo. Se consideraron los puntos de corte de CIM sugeridos por la NCCLS (2002).

3.6. Resistencia a penicilina

Sobre aquellos aislamientos que se mostraron resistentes a la penicilina se determinó producción de beta-lactamasa de acuerdo con el método de la cefalosporina cromogénica (DrySlide Nitrocefín, Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.). La cefalosporina cromogénica, nitrocefín, se ha encontrado efectiva para detectar todas las beta-lactamasas conocidas, incluyendo las penicilinasas estafilocócicas. Previamente a la realización del test de beta-lactamasa, se indujo la producción de la enzima por

crecimiento de las cepas en agar sangre ovina al 5% con un disco de 1 µg de oxacilina (Laboratorio Britania) tomando para la prueba ulterior el crecimiento cercano al disco o al límite de la zona de inhibición (Thornsberry, 1985). El disco utilizado está impregnado con la cefalosporina cromogénica nitrocefín, que exhibe un cambio de color muy rápido de amarillo a rojo cuando la amida unida al anillo beta-lactámico es hidrolizada por una beta-lactamasa. Cuando una bacteria produce esta enzima en cantidades significativas, el disco amarillo se torna rojo en el área donde el microorganismo es aplicado. No se reconoce que Nitrocefín reaccione con otras enzimas. Los discos de nitrocefín fueron conservados a -80°C hasta su uso. Para realizar la prueba los discos fueron retirados del congelador y permanecieron a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Luego fueron humedecidos con una gota de agua destilada estéril. Con un ansa estéril se tomó material de la colonia a evaluar y se colocó sobre el disco, que fue controlado para observar cambios de color. Una reacción positiva fue indicada por cambio de color de amarillo a rojo en el área donde se aplicó el cultivo. Un resultado negativo fue indicado por ausencia de cambio de color en el disco. Cada grupo de aislamientos fue evaluado junto con *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo.

3.7. Detección de cepas resistentes a Oxacilina (*Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes –SAMR-)

Los aislamientos en los que se observaron halos de inhibición cercanos al diámetro considerado resistente (“borderline”) para la oxacilina fueron posteriormente evaluados por la prueba de difusión en agar utilizando discos de 1 µg de oxacilina y 30 µg de cefoxitina (Laboratorio Britania) (Boutiva-Ben Boubaker *et al.*, 2004), luego de incubar por 24 hs entre 30 a 35°C. Se interpretaron como sensibles a oxacilina los

aislamientos que presentaron halo de inhibición frente a oxacilina ≥ 13 y halo de inhibición frente a cefoxitina ≥ 20 mm. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 25923.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos con las cepas control se encontraron dentro de los rangos esperados frente a todos los antimicrobianos evaluados. Los rangos de CIM de cada uno de los agentes antimicrobianos evaluados, la CIM requerida para inhibir el 50% (CIM₅₀) y el 90% (CIM₉₀) de los aislamientos evaluados se presentan en la tabla 1.

Tabla 2. Susceptibilidad *in-vitro* de 95 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina frente a seis agentes antimicrobianos seleccionados.

Antimicrobiano	Concentración inhibitoria mínima (CIM) (µg/ml)		Rango	Punto de corte	Test de difusión en agar ***
	50 ¹	90 ²			% Resistentes
Penicilina *	0,06	4	0,016-8	≥0,25	48,4
Oxacilina*	0,25	0,25	0,047-0,75	≥4	0
Gentamicina*	0,19	0,38	0,032-1,5	≥16	2,10
Eritromicina*	0,125	0,25	0,064 - 8	≥8	2,10
Florfenicol **	4	8	4-8	≥8	0
Enrofloxacin*	0,19	0,38	0,094-0,75	≥2	0

Referencias: ¹Concentración menor que inhibió el 50% de los aislamientos evaluados. ² Concentración menor que inhibió el 90% de los aislamientos evaluados. * CIM determinada por el método del epsilómetro. **CIM realizada por el método de dilución en agar .

*** Los discos de antibióticos utilizados fueron penicilina (10 U), oxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), florfenicol (30 µg) y enrofloxacin (5 µg)

De acuerdo con los criterios de interpretación usados en este estudio no se detectaron cepas resistentes a oxacilina, enrofloxacin y florfenicol por el test de difusión en agar. Un 52,6% de las cepas fue resistente a un solo antibiótico y el 1,05% de las cepas fueron simultáneamente resistentes a dos antibióticos (penicilina y eritromicina). No se hallaron cepas multirresistentes. El porcentaje total de cepas resistentes a penicilina, gentamicina y eritromicina se muestra en la tabla 1. De los 46 aislamientos resistentes a penicilina, un 89,1 % produjeron la enzima beta-lactamasa. La

mayoría de las cepas positivas, desarrollaron color dentro de los 5 minutos, pero algunas tardaron hasta 1 hora en desarrollar una reacción positiva.

Se detectaron 7 aislamientos considerados en el límite de detección (“borderline”) de resistencia a oxacilina (Nicola *et al.*, 2000; Soloaga *et al.*, 2004), que resultaron todos sensibles al ser evaluadas con discos de cefoxitina (30µg) para predecir resistencia a oxacilina mediada por el gen *mec A* (Boutiva-Ben Boubaker *et al.*, 2004). En la tabla 2 se muestran los resultados de difusión en agar con discos de oxacilina y cefoxitina, así como la CIM de oxacilina frente a esas cepas. Considerando los valores de CIM para oxacilina, las siete cepas de *S. aureus* resultaron sensibles. Sólo una de las siete cepas no presentó producción de beta lactamasa.

Tabla 3. Diámetros de inhibición frente a oxacilina y cefoxitina de 7 aislamientos de *S. aureus* considerados en el límite de interpretación en la prueba de difusión en agar frente a oxacilina.

Diámetro de inhibición en mm			
Cepas <i>S. aureus</i>	Oxacilina 1 µg¹	Cefoxitina 30 µg²	CIM Oxacilina³ µg/ml
134	17	25	0,25
168	15	24	0,50
218	17	25	0,25
318	16	25	0,38
329	17	26	0,38
264	16	27	0,25
261	14	25	0,75

Referencias: ¹Sensibilidad a oxacilina: > 13 mm. ²Sensibilidad a cefoxitina: >20 mm. ³Sensible <2, resistente >4.

5. DISCUSION

La mayoría de los estudios sobre susceptibilidad a antimicrobianos de organismos causantes de mastitis bovina en Argentina fueron realizados por el método cualitativo de difusión en agar (Tessi *et al.*, 1979; Rivero *et al.*, 1984; Weidmann *et al.*, 1988; Calvino *et al.*, 1991a,b; 2002, Rule *et al.*, 1992). Estos estudios comprendieron un número variable de aislamientos provenientes de leche de cuartos mamarios individuales o compuesta de los cuatro cuartos de vacas de rodeos lecheros ubicados en la cuenca central de Santa Fe (Tessi *et al.*, 1979; Weidmann *et al.*, 1988; Calvino *et al.*, 1991a,b, 2002), y cuencas de Buenos Aires (Rivero *et al.*, 1984; Rule *et al.*, 1992). Si bien en estas investigaciones se precisa el número de establecimientos lecheros incluidos y el número de cepas de *S. aureus*, no se indica el número de aislamientos por tambo, lo cual dificulta las comparaciones. En el presente estudio se tomaron entre uno a tres aislamientos por establecimiento lechero, incluyéndose aislamientos de cuatro provincias.

En este estudio los resultados de diámetros de inhibición y CIM se interpretaron de acuerdo con criterios para patógenos veterinarios establecidos por el NCCLS (2002). Dentro de estos criterios, sólo unos pocos se han desarrollado específicamente para patógenos de mastitis bovina (Thornsberry *et al.*, 1993; 1997; Portis *et al.*, 2005); mientras que el resto han sido extrapolados de otros microorganismos, lo cual dificulta la evaluación de los datos de susceptibilidad obtenidos.

A nivel mundial y nacional, varios estudios recientes han examinado durante la última década la susceptibilidad de *S. aureus* aislados de mastitis bovina por métodos cuantitativos frente a antibióticos seleccionados (Watts and Salmon, 1997; Gentilini *et*

al., 2000; De Oliveira *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Giannechini *et al.*, 2002). En este estudio se evaluó la susceptibilidad de aislamientos de *S. aureus* frente a antimicrobianos seleccionados por su uso frecuente o su potencial utilidad en el tratamiento de mastitis bovina en Argentina. Dentro de estos se incluyeron dos antimicrobianos beta lactámicos, penicilina y oxacilina. El primero es el representante más antiguo de este grupo y puede ser afectado por la producción de beta lactamasa por *S. aureus*. El segundo es un análogo de la cloxacilina, cuyo uso es recomendado para detectar estafilococos resistentes a la meticilina debido a su mayor estabilidad en condiciones de almacenamiento y sensibilidad superior con relación a otras penicilinas estables a la penicilinasa (Barry and Jones, 1987; NCCLS, 1994).

Los valores de CIM₅₀ de penicilina hallados en este estudio fueron inferiores, mientras que los de CIM₉₀ fueron superiores a los informados por Gentilini *et al.* (2000) para aislamientos obtenidos de distintas cuencas lecheras de Argentina. En el presente estudio se hallaron cepas con CIM de hasta 8 µg/ml; mientras que Gentilini *et al.* (2000) hallaron cepas con CIM de hasta 192 µg/ml. Si bien las diferencias podrían deberse a la distinta procedencia de los aislamientos, sería necesario realizar estudios sistemáticos con números de cepas semejantes por establecimiento y por región a los efectos de establecer comparaciones válidas. Esta información sería de gran valor considerando que en nuestro país existen pocas restricciones al uso de antibióticos en el ganado bovino.

Los valores de CIM₉₀ de penicilina encontrados en este estudio fueron superiores a los informados en un estudio colaborativo que incluyó 11 países (De Oliveira *et al.*, 2000) (0,5 µg/ml), así como a lo observado por San Martín *et al.* (2002) para cepas aisladas de rodeos lecheros en Chile (1µg/ml) y por Yoshimura *et al.* (2002)

en Japón (0,78 µg/ml). Por el contrario, los valores de CIM₉₀ hallados en este estudio fueron inferiores al observado por Giannechini *et al.* (2002) en Uruguay (>8 µg/ml).

En este estudio, de las cepas (41) productoras de beta lactamasa, sólo dos cepas presentaron una CIM de 0,19 µg/ml, y serían consideradas como sensibles de acuerdo con el criterio de interpretación utilizado (NCCLS, 2002); mientras que las demás cepas presentaron alta CIM con un rango entre 0,25 y 8 µg/ml. Si bien la CIM de las dos cepas mencionadas no estuvo muy alejada del punto de corte indicativo de resistencia ($\geq 0,25$ µg/ml) (NCCLS, 2002), en estudios recientes se observó que cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina productoras de beta lactamasa tenían CIM de 0,03 a 0,06 µg/ml. De esta manera, los autores sugieren que el punto de corte indicado por la NCCLS podría ser demasiado alto para detectar resistencia a la penicilina, sobretodo en cepas con CIM cercanas al límite de detección (Haveri *et al.*, 2005). En todos los casos, la producción de la enzima beta lactamasa es un indicador útil para detectar resistencia a penicilina (Owens and Watts, 1988; Watts and Salmon, 1997), obteniéndose una mayor producción luego de la inducción con penicilina u oxacilina (De Oliveira, *et al.*, 2000). Esta enzima, es considerada el mecanismo más frecuente de resistencia a penicilina (Prescott, 1999).

De acuerdo con los criterios de interpretación del método de difusión en agar empleados, un 48,4% de los aislamientos fueron considerados resistentes a la penicilina en este estudio, mientras que Gentilini *et al.* (2000) en Argentina y Giannechini *et al.* (2002) en Uruguay hallaron un 40,3% y 47,6% de aislamientos resistentes, respectivamente. Por el contrario, en países del norte de Europa como Noruega, se han informado valores de resistencia a penicilina de 4,2% en casos clínicos y 18% en subclínicos (Hofshagen *et al.*, 1999), mientras que en Suecia se detectó un 6% de

resistencia (Franklin, 1998). No obstante, en Finlandia se han hallado recientemente porcentajes elevados de resistencia de *S. aureus* a penicilina (52,1%) (Pitkala *et al.*, 2001).

La oxacilina es un tipo de penicilina resistente a la beta lactamasa, la cual es utilizada por su confiabilidad para detectar cepas SAMR (NCCLS, 2002). En este estudio no se detectaron cepas resistentes a oxacilina (Boutiva-Ben Boubaker *et al.*, 2004), lo cual coincide con resultados previos obtenidos sobre aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina, tanto en nuestro país (Rossetti, 1993; Acuña *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Calvinho *et al.*, 2002), como en otros países (Watts *et al.*, 1995; Salmon *et al.*, 1998; Giannechini *et al.*, 2002; San Martín *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2005). Las pruebas de difusión en agar con discos de oxacilina pueden presentar dificultades en la lectura para discriminar entre aislamientos sensibles y resistentes (Barry and Jones, 1987; NCCLS 2002). En consecuencia, se ha recomendado la prueba de difusión en agar con cefoxitina, un potente inductor del sistema regulatorio *mecA* (McKinney *et al.*, 2001). Esta prueba presenta una mejor correlación que la realizada utilizando oxacilina para predecir la resistencia a este antibiótico mediada por el gen *mecA* en *Staphylococcus* (Boutiva-Ben Boubaker *et al.*, 2004; Skow *et al.*, 2003). Esta prueba predice la presencia del gen *mecA* en *S. aureus* con alto grado de sensibilidad y especificidad comparado con la detección de este gen por PCR (Swenson *et al.*, 2005). Por ello, en el presente estudio se evaluaron los aislamientos de *S. aureus* que por su comportamiento en el test de difusión en agar frente a oxacilina podían considerarse como “borderline”. Estas cepas, evaluadas por la prueba de difusión en agar con cefoxitina, resultaron todas sensibles a este antibiótico, confirmando la falta de resistencia a metilicilina. De esta manera los resultados muestran que hasta el presente no

ha emergido resistencia a la meticilina como problema en los rodeos lecheros evaluados. No obstante, tanto el porcentaje (3,2%) de resistencia a oxacilina hallados en 123 cepas de SCN aislados de mastitis bovina (Gentilini *et al.*, 2002) como la propiedad de estos organismos de ser reservorios del gen *mecA* en la naturaleza, indica la necesidad de realizar vigilancia epidemiológica permanente sobre la sensibilidad antibiótica para *S. aureus* para detectar precozmente eventuales cambios. En seres humanos, los SAMR han emergido en las últimas cuatro décadas causando infecciones tanto nosocomiales como de la comunidad. De acuerdo con los datos del Programa WHONET, la prevalencia de SAMR en Argentina oscila entre 40-50% (Soloaga *et al.*, 2004).

Los macrólidos son agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica al unirse a la unidad ribosomal 50S en la célula bacteriana (Prescott, 1999). Dentro de este grupo, la eritromicina, la espiramicina y la tilosina son usados frecuentemente en nuestro país para el tratamiento de mastitis bovina (Calvinho *et al.*, 1988; Tarabla *et al.*, 2000; Litterio *et al.*, 2007) debido a que alcanzan altas concentraciones en leche luego de su administración parenteral (Ziv, 1980). En este estudio se utilizó la eritromicina como representante de los macrólidos, mostrando alta actividad contra los aislamientos evaluados, hallándose una CIM₉₀ ligeramente inferior a la informada en estudios realizados tanto en nuestro país (Gentilini *et al.*, 2000), como en otros países de América latina (Giannechini *et al.*, 2002) y del hemisferio norte (Watts and Salmon, 1997; De Oliveira *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2005).

En el presente estudio se utilizó a la gentamicina como representante del grupo de los aminoglucósidos. El valor de CIM₉₀ hallado fue inferior a los informados para cepas de *S. aureus* aisladas de distintas cuencas lecheras de Argentina (Gentilini *et al.*, 2000), como así también de Chile (San Martín *et al.*, 2000) y Uruguay (Giannechini *et al.*, 2002); mientras que fue semejante a lo hallado por Yoshimura *et al.*, (2002) para cepas de esta especie de microorganismo aisladas en distintas zonas de Japón.

El florfenicol es un análogo monofluorado del cloranfenicol y del tianfenicol, cuyo uso está permitido en animales de consumo. Posee un amplio espectro que incluye numerosos patógenos, siendo más activo que el tianfenicol frente a algunos microorganismos, como *S. aureus*. Es usualmente utilizado por la vía parenteral para el tratamiento de infecciones en bovinos (Varma *et al.*, 1991). Estudios farmacocinéticos demostraron que tras la administración intramamaria de este antimicrobiano se obtienen concentraciones adecuadas tanto en suero como en leche y por lo tanto fue propuesto su uso para la terapia de mastitis bovina (Soback *et al.*, 1995). Sin embargo, existen escasos informes acerca de su eficacia (Wilson *et al.*, 1996). En nuestro país no existen preparados comerciales intramamarios que contengan este antimicrobiano. La CIM₉₀ observada en el presente estudio fue semejante a la CIM hallada en un estudio previo realizado sobre 25 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en nuestro país (4 a 8 µg/ml) (Otero *et al.*, 1999). Sin embargo, fue superior a la hallada por San Martín *et al.*, (2002) y Yoshimura *et al.*, (2002) para cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en Chile y Japón, respectivamente. De acuerdo con el criterio de interpretación del test de difusión en agar utilizado no se detectaron aislamientos resistentes a este antibiótico, sin embargo el valor de la CIM₉₀ hallado en este estudio fue coincidente con el punto de

corte tentativo para ser considerado resistente de acuerdo con NCCLS para organismos Gram negativos causantes de enfermedad respiratoria en bovinos (NCCLS, 2002). El uso de este punto de corte fue cuestionado en investigaciones recientes, debido a los valores de CIM iguales o superiores a 16 µg/ml detectados en cepas de *S. aureus* obtenidas de animales, portadoras de los genes *cfr* o *fxA* que codifican para resistencia a florfenicol. En consecuencia, los resultados obtenidos permiten sugerir acerca de la importancia de reconsiderar el punto de corte para *S. aureus* (Kehrenberg and Schwarz, 2006).

La actividad antibacteriana de las fluoroquinolonas se basa en la inhibición selectiva de la síntesis de ADN bacteriano al actuar sobre la ADN girasa (Prescott, 1999). La enrofloxacin está aprobada en Argentina para el tratamiento de varias enfermedades infecciosas de los bovinos causadas por organismos Gram positivos y negativos, aunque no está específicamente indicada para el tratamiento de mastitis bovina. Sin embargo, es utilizada en varios países escandinavos debido al mantenimiento de altas concentraciones en leche, a pesar de que existe poca información acerca de su eficacia (Pyörälä and Pyörälä, 1998). En el presente estudio, el valor de CIM₉₀ hallado (0,38 µg/ml) fue semejante a lo informado en estudios recientes realizados en Chile, Uruguay y Japón (San Martín *et al.*, 2002; Giannechini *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002), mientras que resultó superior al informado para varios países de Europa y Estados Unidos (0,125 µg/ml) (De Oliveira *et al.*, 2000). En particular, las cepas con mayores CIM frente a este antimicrobiano fueron halladas en Noruega (64 µg/ml) (De Oliveira *et al.*, 2000) y Chile (8 µg/ml) (San Martín *et al.*, 2002). Estas diferencias podrían deberse a una eventual mayor difusión del uso de este antimicrobiano en estos países para el tratamiento de mastitis.

6. CONCLUSION

En este estudio no se evidenció tendencia a un aumento de la resistencia de *S. aureus* frente a los antibióticos seleccionados. El mayor porcentaje de resistencia se observó frente a penicilina con un alto porcentaje de cepas productoras de beta-lactamasa como principal mecanismo de resistencia, no se detectaron cepas oxacilina resistente. Sería necesario revisar el punto de corte de CIM para cepas de *S. aureus* de origen bovino frente a penicilina y florfenicol.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA ERITROMICINA FRENTE A CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS DE MASTITIS BOVINA EN ARGENTINA.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Aislamientos bacterianos

Fueron evaluados 192 aislamientos de *S. aureus* obtenidos de casos de mastitis clínicas (n=50) y subclínicas (n=142) de vacas pertenecientes a 106 establecimientos lecheros ubicados en distintas provincias de Argentina. De cada establecimiento se tomaron desde un aislamiento hasta un máximo de 3. Noventa y ocho aislamientos provenían de 54 establecimientos ubicados en la provincia de Santa Fe, 57 aislamientos de 31 establecimientos ubicados en la provincia de Córdoba, 34 aislamientos de 19 establecimientos ubicados en la provincia de Buenos Aires y 3 de dos establecimientos ubicados en la provincia de Entre Ríos. La obtención de las muestras de secreción mamaria, el procesamiento bacteriológico y el método de conservación de los aislamientos fueron descritos en Materiales y Métodos Capítulo Uno.

7.2. Antimicrobianos y pruebas de susceptibilidad

Se utilizaron discos de eritromicina (15 µg) (Laboratorio Britania, Bs. As., Argentina) que fueron almacenados de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos Capítulo Uno. El método de difusión en agar fue realizado de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos Capítulo Uno. La CIM de eritromicina fue

determinada por el método del epsilómetro (E-Test) (AB Biodisk, Dalvågen, Solna, Suecia) previamente descripto.

7.3. Caracterización de los fenotipos de resistencia a eritromicina

Se detectaron diferentes fenotipos de resistencia a macrólidos mediante la prueba de inducción con dos discos (D-test). Se utilizaron discos de clindamicina (Laboratorio Britania, Buenos Aires) y eritromicina, colocándose el borde del disco de clindamicina (2 µg) a 20 mm del borde del disco de eritromicina (15 µg), con una variación de borde a borde entre 15 y 26 mm para visualizar el posible achatamiento del halo de clindamicina (NCCLS, 2004). Los fenotipos de resistencia más usuales detectados a partir de esta prueba consisten en la demetilación ribosomal inducible (iMLS) y constitutiva (cMLS), y en un mecanismo de bomba de eflujo activo (M) y un mecanismo de resistencia no habitual en *S. aureus*, es el mediado por la actividad de la enzima lincosamida nucleotidiltransferasa, lin A y lin A' (no habitual en *S. aureus*) (Famiglietti *et al.*, 2004).

Tabla 4 Fenotipos de eritromicina por D-Test (NCCLS, 2004)

Difusión con disco		D-test	Fenotipo	Interpretación	
ERI	CLI			ERI	CLI
R	R	–	cMLS	R	R
R	S	+	iMLS	R	R
R	S	–		R	S

7.4. Estudios cinéticos de eritromicina en leche y plasma

Se determinó la concentración de eritromicina en leche y plasma luego de su administración intramuscular.

7.4.1. Animales experimentales: se utilizaron 5 vacas Holstein en lactación clínicamente sanas. Las mismas no habían recibido tratamiento antibiótico por un mes antes del inicio del estudio. Previamente y durante el ensayo, las vacas fueron mantenidas a pastoreo base alfalfa bajo un régimen de dos ordeños diarios con libre acceso al agua de bebida. Los animales fueron pesados 12 horas antes del inicio del estudio a los efectos de determinar la dosificación del antibiótico. El peso promedio de los animales fue de 590 kg.

7.4.2. Administración de eritromicina y toma de muestras: se administró por vía intramuscular 20 mg/kg de peso vivo de una solución comercial de eritromicina al 20% (Laboratorios Burnet, Buenos Aires) en la grupa. Se tomaron muestras de sangre y leche previo al tratamiento (tiempo cero) y luego a los 15, 30, 45 minutos y 1; 1,5; 2; 4; 8; 12; 24; 36 y 48 h posteriores a la administración de la droga. En cada toma se extrajeron por venipunción 10 ml de sangre en tubos heparinizados; las muestras fueron centrifugadas y el plasma obtenido fue congelado a -20°C hasta el momento del análisis. En cada toma se extrajeron 30 ml de leche, siendo las muestras congeladas a -20°C hasta el momento del análisis.

7.4.3. Procedimientos analíticos: la concentración de eritromicina en plasma y leche fue determinada por medio del método microbiológico de difusión en agar utilizando como organismo de prueba *Sarcina lutea* ATCC 9341 (Arret *et al.*, 1971), con un límite de cuantificación de 0,391 µg/ml para plasma y leche. Cada muestra (leche – plasma) fue evaluada por duplicado simultáneamente. Las zonas de inhibición fueron medidas y

comparadas con una curva estándar obtenida a partir de concentraciones conocidas de eritromicina.

7.4.4. Análisis farmacocinéticos: los resultados obtenidos fueron tratados mediante programas específicos de ajuste farmacocinético por métodos lineales, PKSolution (Gibaldi and Perrier 1982) y no lineales, PCNONLIN, (Metzler *et al.*, 1986).

7.5. Puntos de corte

Se utilizó el punto de corte de CIM propuesto por la NCCLS en el documento M31-A2 (Tabla 3) para estimar los puntos de corte de difusión en agar. Las CIM y los diámetros de inhibición para cada aislamiento fueron graficados en un diagrama de dispersión. Se realizó un análisis de regresión lineal fijando los errores de estimación para determinar los puntos de corte de la difusión en agar. Los resultados de los análisis farmacocinéticos fueron utilizados para fijar un punto de corte de CIM sobre la base de la concentración de eritromicina obtenida en leche luego de la administración intramuscular. Para los mismos se consideró el valor de concentración de eritromicina en leche que cubrió un 50-60% del intervalo entre dosis (Vogelman *et al.*, 1988; McKellar *et al.*, 2004).

Tabla 5. Criterios de interpretación para las pruebas de susceptibilidad a eritromicina de acuerdo con la NCCLS M31-A2.

Diámetros de zona de inhibición			Puntos de corte de CIM (µg/mL)		
S	I	R	S	I	R
≥23	14-22	≤13	≤0,5	1-4	≥8

Referencias: S = susceptible, I = intermedio, R = resistente. CMI: concentración inhibitoria mínima.

8. RESULTADOS

8.1. Susceptibilidad a eritromicina

La susceptibilidad a la eritromicina de las 192 cepas analizadas, según los puntos de corte establecidos por la NCCLS, se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Susceptibilidad *in vitro* de 192 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina frente a eritromicina.

Concentración inhibitoria mínima				Difusión en agar		
CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango	Punto de corte	% R	% I	% S
0,25	0,5	0,064 – 8	≥8	3,12	26,56	69,27

Referencias: **R:** resistente; **I:** intermedio; **S:** sensible.

8.2. Fenotipos de resistencia a eritromicina

Dentro de las 192 cepas evaluadas, 6 fueron resistentes a la eritromicina de acuerdo con el método de difusión en agar (NCCLS, 2002). Estas cepas se analizaron por D-test para determinar resistencia inducida (iMLS). Si bien, todas las cepas resultaron sensibles a clindamicina, una de ellas mostró fenotipo iMLS (considerándose resistente a ambos antibióticos); mientras las cinco cepas restantes mostraron el fenotipo cMLS (resistente a ambos antimicrobianos). La CIM de las seis cepas fue de 8 µg/ml.

8.3. Estimación de los puntos de corte

Los valores de CIM y diámetros de inhibición de discos de eritromicina son mostrados en un gráfico de dispersión con su correspondiente línea de regresión lineal (Gráfico 1). El análisis de regresión lineal arrojó un valor de r^2 de 0,755 (valor r^2 ajustado 0,754). Considerando el punto de corte de CIM propuesto por la NCCLS se establecieron los puntos de corte de zonas de interpretación del método de difusión en

agar a los efectos de obtener una mínima cantidad de errores de clasificación. Consecuentemente, los puntos de corte fijados para el método de difusión en agar en este estudio fueron: organismos susceptibles ≥ 17 mm, intermedios 7 a 16 mm y resistentes ≤ 6 mm.

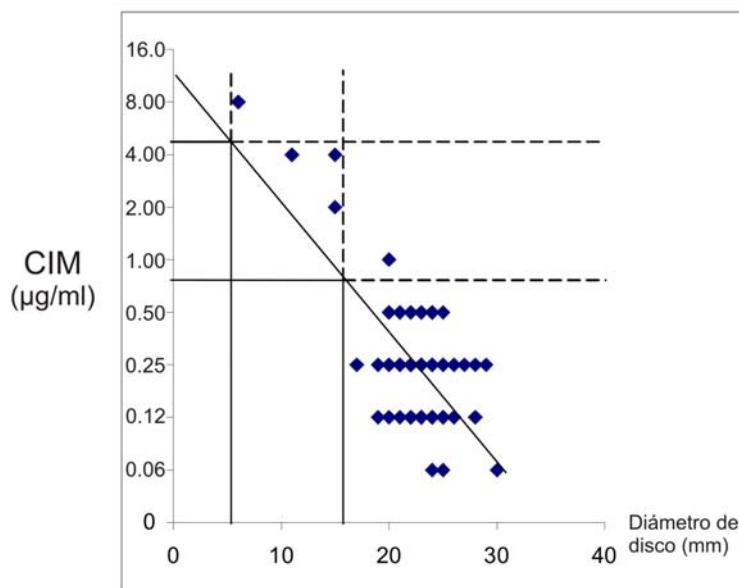


Gráfico 1. Scattergram para CIM y diámetros de inhibición de eritromicina obtenidos con *Staphylococcus aureus* (n= 192) aislados de mastitis bovina. Las líneas horizontales representan los puntos de corte de CIM para las categorías susceptible ($\leq 0,5$ µg/ml), intermedio (1-4 µg/ml) y resistente (≥ 8 µg/ml) propuestos por la NCCLS, y las líneas verticales representan los puntos de corte para las categorías susceptible, intermedio y resistente del test de difusión en agar obtenidos en este estudio.

En la tabla 7 se observan los datos expresados, indicando los errores que surgen al interpretar los diámetros de zona.

CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
R	16			
R	8	6		
I	4		3	
I	2		1	
I	1			2*
S	0,5			23
S	0,25			74
S	0,12			80
S	0,06			3
		R (n=6)	I (n=4)	S (n=182)
		Interpretación diámetros de zona		

Tabla 7. Comparación del diámetro de zona de inhibición y la CIM de 192 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina frente a eritromicina considerando los puntos de corte de CIM propuestos por el NCCLS y diámetros de zona de interpretación de difusión en agar obtenidos en el presente estudio. Distribución de las cepas entre zonas de interpretación S, I y R para el test de difusión en agar y el E-test (CIM). S = susceptible ≥ 17 mm - $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ I = intermedio 7-16 mm - 1-4 $\mu\text{g/ml}$ R = resistente ≤ 6 mm - ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ * error menor.

Con estos puntos de corte se observan sólo dos errores menores. Sin embargo, considerando que un valor de 6 mm implica realizar la lectura sobre el borde del disco, se tomaron los siguientes puntos de corte: para organismos susceptibles ≥ 17 mm, intermedios de 12 a 16 mm y resistentes ≤ 11 mm (Gráfico 2 y Tabla 8).

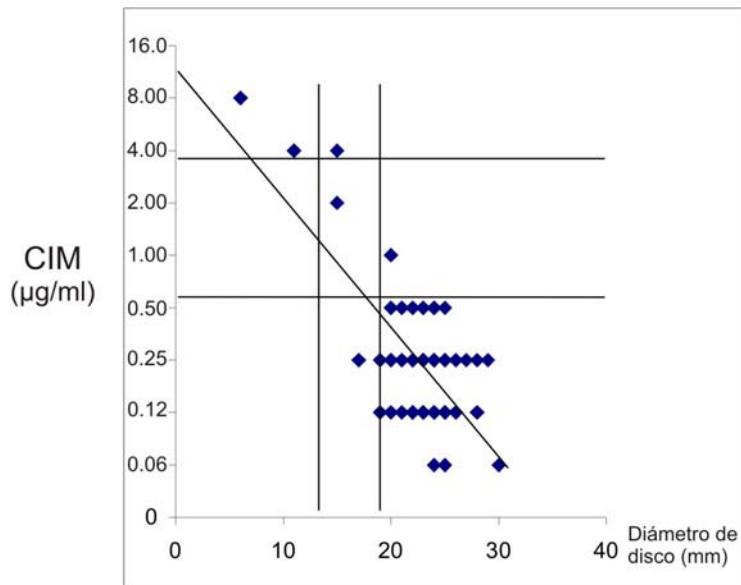


Gráfico 2. Scattergram para CIM y diámetros de inhibición de eritromicina obtenidos con *Staphylococcus aureus* (n= 192) aislados de mastitis bovina. Las líneas horizontales representan los puntos de corte de CIM para las categorías susceptible ($\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$), intermedio (1-4 $\mu\text{g/ml}$) y resistente ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) propuestos por la NCCLS, y las líneas verticales representan los puntos de corte para las categorías susceptible, intermedio y resistente del test de difusión en agar obtenidos en este estudio.

Utilizando los puntos de corte del test de difusión en agar generados en este estudio, ciento ochenta (93,75%) cepas fueron identificadas como susceptibles a eritromicina de acuerdo con el diámetro de inhibición ($\geq 17 \text{ mm}$) y el valor de la CIM ($\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$). Dos (1,04%) cepas clasificadas como susceptibles de acuerdo con el diámetro de inhibición y como intermedias por el valor de CIM, fueron consideradas como error menor. Seis (3,12%) cepas fueron identificadas en ambas pruebas como resistentes. Dos (1,04%) cepas ubicadas en la categoría de resistentes por el diámetro de

inhibición e intermedias por el valor de CIM, fueron reconocidas como errores menores. Por último, dos (1,04%) cepas fueron clasificadas como intermedias por ambas pruebas (Gráfico 2 y Tabla 8). No se observaron errores mayores o “very major”, mientras que se detectaron 4 errores menores (2,08%).

CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
R	16			
R	8	6		
I	4	2*	1	
I	2		1	
I	1			2*
S	0,5			23
S	0,25			74
S	0,12			80
S	0,06			3
		R (n=8)	I (n=2)	S (n=182)
		Interpretación diámetros de zona		

Tabla 8. Comparación del diámetro de zona de inhibición y la CIM de 192 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina frente a eritromicina considerando los puntos de corte de CIM propuestos por el NCCLS y diámetros de zona de interpretación de difusión en agar obtenidos en el presente estudio. Distribución de las cepas entre zonas de interpretación S, I y R para el test de difusión en agar y el E-test (CIM). Distribución de las cepas entre zonas de interpretación S, I y R para difusión en disco y E-test (CIM). S = susceptible ≥ 17 mm - $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. I = intermedio 12-16 mm - 1-4 $\mu\text{g/ml}$. R = resistente ≤ 11 mm - ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. * error menor.

En el gráfico 3 se muestra un diagrama de dispersión realizado con los valores de CIM y diámetros de inhibición obtenidos en el presente estudio utilizando los puntos de corte de CIM y de diámetros de zona de inhibición propuestos por la NCCLS.

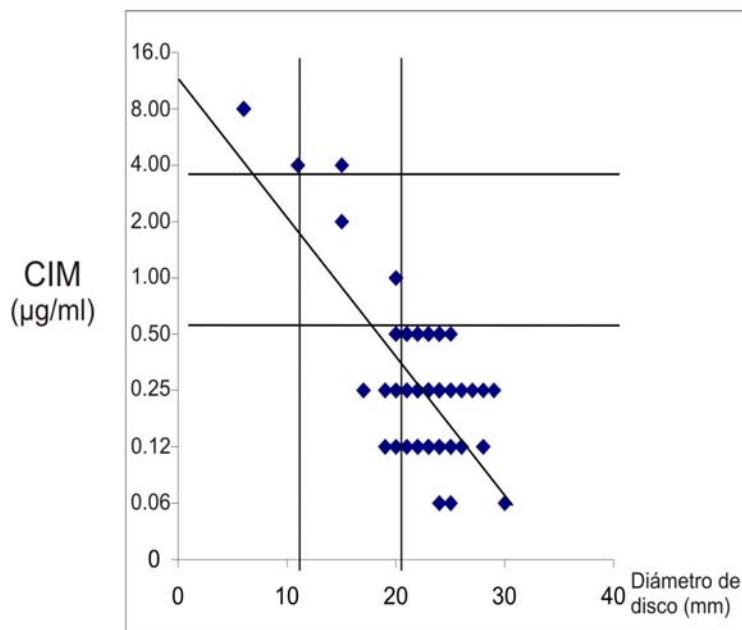


Gráfico 3. Scattergram para CIM y diámetros de inhibición de eritromicina obtenidos con *Staphylococcus aureus* (n= 192) aislados de mastitis bovina. Las líneas horizontales representan los puntos de corte de CIM para las categorías susceptible, intermedio y resistente, y las líneas verticales representan los puntos de corte para las categorías susceptible, intermedio y resistente del test de difusión en agar. Se consideraron los puntos de corte de CIM y diámetros de zona propuestos por NCCLS.

A partir de puntos de corte de CIM y los puntos de corte del test de difusión en agar propuestos por la NCCLS, 134 cepas (69,79%) fueron identificadas como susceptibles a eritromicina. Cuarenta y seis cepas (23,95%) clasificadas como intermedias de acuerdo con el diámetro de inhibición y susceptibles por el valor de CIM, fueron consideradas como errores menores. Seis cepas (3,12%) fueron registradas en ambas pruebas como resistentes. Dos (1,04%) cepas ubicadas en la categoría de

resistentes por el diámetro de inhibición e intermedias por el valor de CIM, fueron consideradas como errores menores y cuatro cepas (2,08%) fueron clasificadas como intermedias por ambas pruebas (Tabla 9). No se observaron errores mayores o “very major”, mientras que se detectaron 48 errores menores (25%).

CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
R	16			
R	8	6		
I	4	2*	1	
I	2		1	
I	1		2	
S	0,5		9*	14
S	0,25		19*	55
S	0,12		18*	62
S	0,06			3
		R (n=8)	I (n=50)	S (n=134)
		Interpretación diámetros de zona		

Tabla 9. Comparación del diámetro de zona de inhibición y la CIM de 192 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina frente a eritromicina considerando los puntos de corte de CIM y diámetros de zona de interpretación de difusión en agar propuestos por la NCCLS. Distribución de las cepas entre zonas de interpretación S, I y R para el test de difusión en agar y el E-test (CIM). Distribución de las cepas entre zonas de interpretación S, I y R para difusión en disco y E-test (CIM). S = susceptible ≥ 23 mm - $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$. I = intermedio 14-22 mm – 1-4 $\mu\text{g/ml}$. R = resistente ≤ 13 mm - ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. * error menor.

8.4. Concentración de eritromicina en sangre y leche

La concentración de eritromicina, así como los parámetros farmacocinéticos en sangre y leche obtenidos luego de la administración intramuscular de eritromicina se observan en las tablas 10, 11, 12, 13 y en la figura 1.

Tabla 10. Concentraciones plasmáticas de eritromicina en vacas a las cuales se les administró eritromicina al 20% (20 mg/kg) durante la lactancia.

TIEMPO		CONCENTRACIÓN PLASMA (ug/ml)					MEDIA
Muestreo	Horas	Anim. 1	Anim. 2	Anim. 3	Anim. 4	Anim. 5	
0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	0,25	4,18	3,43	3,11	2,82	2,38	3,18
2	0,5	-	3,39	3,21	4,15	1,99	6,01
3	0,75	3,95	3,15	4,20	4,97	2,39	3,73
4	1	4,21	3,31	2,70	5,46	2,30	3,60
5	1,5	5,11	3,91	2,25	6,48	2,61	4,07
6	2	3,86	3,66	1,96	5,73	3,12	3,67
7	4	3,94	3,30	3,51	4,86	6,46	4,41
8	8	3,98	2,08	2,94	3,90	6,14	3,81
9	12	2,16	1,24	1,78	2,48	4,43	2,42
10	24	0,47	0,64	0,66	0,63	1,30	0,74
11	36	-	nd	nd	nd	nd	nd
12	48	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla 11. Concentraciones en leche de eritromicina en vacas a las cuales se les administró eritromicina al 20% (20 mg/kg) durante la lactancia.

TIEMPO		CONCENTRACIÓN LECHE (ug/ml)					MEDIA
Muestreo	Horas	Anim. 1	Anim. 2	Anim. 3	Anim. 4	Anim. 5	
0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	0,25	0,40	nd	nd	nd	nd	0,40
2	0,5	0,56	nd	nd	nd	nd	0,56
3	0,75	0,45	nd	nd	0,63	0,49	0,52
4	1	0,52	nd	nd	0,85	0,81	0,73
5	1,5	0,89	0,60	0,52	1,42	0,60	0,80
6	2	1,17	0,68	0,51	2,10	0,87	1,07
7	4	4,44	1,18	1,20	9,52	5,28	4,32
8	8	4,63	2,90	2,71	10,91	4,03	5,03
9	12	4,25	4,57	5,15	7,37	5,67	5,40
10	24	2,79	2,76	2,32	3,80	4,30	3,19
11	36	0,76	0,63	0,82	0,73	1,12	nd
12	48	nd	nd	nd	nd	0,48	nd

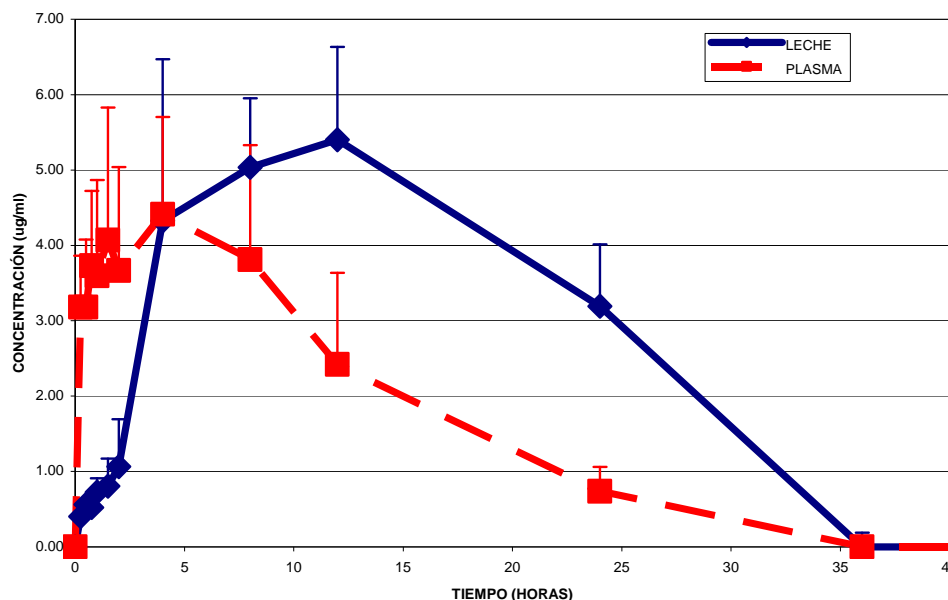
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos de eritromicina en plasma de vacas a las cuales se les administró eritromicina al 20% por vía intramuscular (20 mg/kg) durante la lactancia.

	Plasma					media	D.S.
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	animal 5		
T 1/2 α	0,569	0,449	0,422	0,287	1,351	0,6156	0,4231
T 1/2 β	6,905	8,344	6,859	8,023	8,153	7,6568	0,7166
Cmax	5,1	3,9	6,5	4,2	6,5	5,24	1,2320
Tmax	1,5	1,5	1,5	0,8	4	1,86	1,2341
AUC	59,8	42,2	69,2	47,7	94,9	62,76	20,813
Vd	3088,2	4820,8	2623	4183,4	2134,6	3370	1110,1
Cl	309,93	400,40	265,0	361,3	181,4	303,6	85,38

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos de eritromicina en leche de vacas a las cuales se les administró eritromicina al 20% por vía intramuscular (20 mg/kg) durante la lactancia.

Leche							
	animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	animal 5	media	D.S.
T 1/2 β	10,993	8,392	9,05	7,499	9,499	9,0866	1,16694
Cmax	4,6	4,6	5,2	10,9	5,7	6,2	2,38579
Tmax	8	12	12	8	12	10,4	1,95959
AUC	106,3	90,1	89,6	185,1	147,2	123,66	37,1934
Vd	-	-	-	-	-	-	-
Cl	-	-	-	-	-	-	-
(AUCleche/AUCplasma)	1,72	2,13	1,29	3,88	1,55	2,11	1,03

Figura 1. Curvas farmacocinéticas en plasma y leche de vacas en lactancia a las cuales se les administró eritromicina al 20% (20 mg/kg).



8.5. Estimación de puntos de corte de CIM

De acuerdo con los parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración intramuscular de eritromicina, se calcularon los puntos de corte de CIM. Consecuentemente, los puntos de corte de CIM considerando la concentración de eritromicina en leche se establecieron en 4 y 8 µg/ml para susceptibilidad y resistencia, respectivamente.

Utilizando el punto de corte de CIM de susceptible ≤ 4 , intermedio 3 -7, resistente ≥ 8 µg/ml se establecieron los puntos de corte de las zonas de interpretación del método de difusión en agar (Gráfico 4 y Tabla 14), observándose 4 errores menores y ningún error mayor.

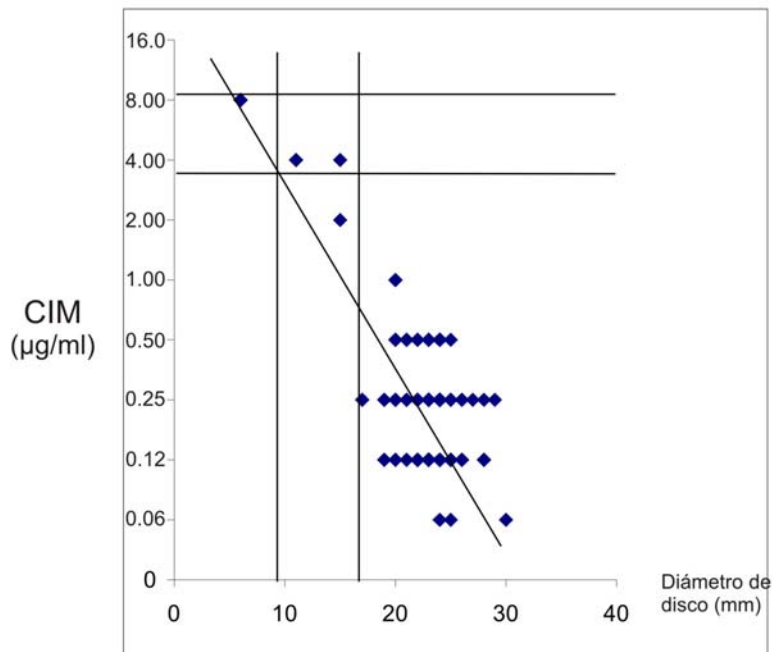


Gráfico 4. Scattergram para CIM y diámetros de inhibición de eritromicina obtenidos con *Staphylococcus aureus* (n= 192) aislados de mastitis bovina. Las líneas horizontales representan los puntos de corte de CIM para las categorías susceptible ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$), intermedio (5-7 $\mu\text{g/ml}$) y resistente ($\geq 8 \mu\text{g/ml}$) fijados en base a los parámetros farmacocinéticos en leche determinados en este estudio, y las líneas verticales representan los puntos de corte para las categorías susceptible ($\geq 17 \text{ mm}$), intermedio (11-16) y resistente ($\leq 10 \text{ mm}$) del test de difusión en agar obtenidos en este estudio.

CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
R	16			
R	8	6		
I	7			
I	6			
I	5			
S	4		3*	
S	2		1*	
S	1			2
S	0,5			23
S	0,25			74
S	0,12			80
S	0,06			3
		R (n=6)	I (n=4)	S (n=182)
		Interpretación diámetros de zona		

Tabla 14. Comparación del diámetro de zona de inhibición y la CIM de 192 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina frente a eritromicina considerando los puntos de corte de CIM propuestos sobre las base de las determinaciones farmacocinéticas en leche y diámetros de zona de interpretación de difusión en agar obtenidos en el presente estudio. S = susceptible ≥ 17 mm - ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ I = intermedio 11-16 mm - 5-7 $\mu\text{g/ml}$ R = resistente ≤ 10 mm - ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ * error menor.

9. DISCUSIÓN

En esta etapa, se analizaron 192 cepas de *Staphylococcus aureus*, a los efectos de contar con un número más representativo de organismos. Los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ obtenidos fueron levemente superiores a los hallados a partir de los análisis de 95 cepas, registrándose un aumento de la concentración equivalente a una dilución. Existe escasa información sobre fenotipos de resistencia a macrólidos en *S. aureus* aislados de mastitis bovina. En estudios recientes realizados en nuestro país sobre 41 *Staphylococcus* spp. aislados de mastitis bovina en la provincia de Buenos Aires no se observaron cepas con fenotipo de resistencia iMLS, mientras que un 7,3 % mostraron fenotipo cMLS (Denamiel *et al.*, 2007). En el presente estudio, sobre un total de 192 cepas de *S. aureus*, un 0,5 % mostró fenotipo iMLS y un 2,6 % fenotipo cMLS. Sin embargo, no es posible hacer comparaciones directas debido a que en el presente estudio se evaluaron aislamientos de *S. aureus* solamente, mientras que en el estudio previo no se especificó si entre los aislamientos de *Staphylococcus* spp. se incluyeron *S. aureus*.

La eficacia de curación de las IIM causadas por *S. aureus* está influenciada por factores del hospedador, del organismo patógeno y del tratamiento antibiótico administrado (Barkema *et al.*, 2006). La selección del antimicrobiano implica el conocimiento tanto de la farmacocinética de las drogas más adecuadas para uso en mastitis bovina (Ziv, 1980), como de la susceptibilidad de las cepas de esta especie a estas drogas. Consecuentemente, la utilización de técnicas precisas y confiables para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de los organismos causantes de mastitis adquiere

relevancia (Pengov and Ceru, 2003; Klement *et al.*, 2005; Barkema *et al.*, 2006). El método de difusión en agar es ampliamente utilizado en los laboratorios de rutina y un gran número de estudios expresan los patrones de susceptibilidad basados en el mismo (Owens and Watts, 1988; Myllys *et al.*, 1998; Calvino *et al.*, 2002; Erskine *et al.*, 2002; Gooraninejad *et al.*, 2007), según criterios de interpretación de las pruebas recomendados por la NCCLS (NCCLS, 2002). Sin embargo, para el caso de la eritromicina, como de otros antimicrobianos, los criterios de interpretación han sido desarrollados a partir de parámetros farmacocinéticos obtenidos en seres humanos (NCCLS, 2002).

De esta manera, se podría especular sobre la reducida relación entre los datos farmacocinéticos en humanos y aquellos generados para una especie animal determinada en el tejido considerado blanco.

En el presente estudio se utilizaron los puntos de corte de CIM indicados por el NCCLS (NCCLS, 2002), para estimar a partir de los valores de las 192 cepas de los *Staphylococcus aureus* los puntos de corte de zonas de interpretación para el método de difusión en agar (Z), mediante el análisis de regresión lineal y método de “error rate-bounded” propuesto por Metzler and DeHaan (1974), generado con valores de cepas de *S. aureus* autóctonas. El valor de r^2 obtenido mostró una buena correlación entre ambos métodos. Los puntos de corte fijados para las zonas de interpretación, clasificaron las cepas en las categorías susceptible, intermedio y resistente, obteniendo un porcentaje (2,08%) de errores menores inferior a la considerada como aceptable por este método (NCCLS, 1999) y sin detectar errores mayores ni “very major errors”. Por el contrario, se detectó un elevado 25% (n = 48) de errores menores, utilizando tanto los puntos de corte de CIM como los puntos de corte del test de difusión en agar propuestos por el NCCLS (NCCLS, 2002); si bien no se detectaron errores mayores ni “very major

errors". La mayoría de estos errores menores (95,8%) se generaron debido a que con los diámetros de zona de interpretación fijados por el NCCLS, se clasificaron como intermedias a cepas susceptibles de acuerdo con el punto de corte de CIM. Este porcentaje de errores menores podría ser considerado aceptable desde el punto de vista técnico, ya que pueden ser consecuencia de la variación experimental esperada para la CIM (Pengov and Ceru, 2003). Sin embargo, debe considerarse que desde el punto de vista clínico, clasificar a una cepa en la categoría de intermedio implica la posible obtención de una respuesta indeterminada o incierta al administrar la dosis estándar (MacGowan and Wise, 2001), en consecuencia, ese antimicrobiano podría ser considerado como una segunda opción, o ser administrado en una dosis mayor para lograr una adecuada eficacia de curación ante un organismo que, de acuerdo con el punto de corte establecido para el método de dilución en agar, es considerado como susceptible.

El análisis de regresión lineal arrojó un valor de r^2 de 0,755, el cual es considerado aceptable. Algunos estudios expresan los resultados obtenidos a partir de ambos métodos para cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina frente a la eritromicina (Gentilini *et al.*, 2000; Giannechini *et al.*, 2002), sin embargo existen pocos informes sobre la correlación entre ambos métodos para *S. aureus* frente a este antimicrobiano. Por el contrario en un estudio reciente, Klement *et al.*, (2005) hallaron una muy baja correlación entre ambos métodos (r^2 0,03) frente a la eritromicina para 121 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM en Israel. A pesar de esta baja correlación, el porcentaje de cepas susceptibles detectado por el método de difusión en agar (93,3%) fue levemente inferior al detectado por CIM (99,2%). Sin embargo, no fue posible

comparar los errores de clasificación entre ambos estudios, ya que el objetivo del estudio de Klement *et al.*, (2005) fue proponer una nueva metodología para fijar los puntos de corte de las pruebas de susceptibilidad.

La mayoría de los puntos de corte para determinar las categorías de susceptibilidad (susceptible, intermedio, resistente) para antimicrobianos utilizados en la terapéutica de infecciones en animales, son aquellos empleados en la terapia de infecciones en seres humanos (NCCLS, 2002). Estos puntos de corte se han obtenido a partir de parámetros cinéticos observados en seres humanos, generalmente basados en concentraciones de la droga en sangre halladas luego de la aplicación de la dosis usual, aún reconociendo que la concentración de droga en el tejido infectado puede variar respecto de la obtenida en sangre (Thornsberry *et al.*, 1993; MacGowan and Wise, 2001). Uno de los problemas inherentes al uso de estos puntos de corte deriva de las diferentes dosis utilizadas en medicina veterinaria con relación a las usadas en medicina humana y de la distinta propiedad farmacocinética según la especie animal. Además, los organismos patógenos de origen animal son distintos a los patógenos de origen humano (Thornsberry *et al.*, 1993). Una de las características implícitas para la elección de un punto de corte radica en que la concentración del antimicrobiano en el sitio de infección es uno de los parámetros mas fuertemente asociado al resultado de la terapia aplicada (MacGowan and Wise, 2001). En el presente estudio, se determinaron los parámetros farmacocinéticos de la eritromicina en leche y sangre luego de su administración intramuscular; utilizando dicha vía por considerarla como la de aplicación más frecuente en nuestro país. Asimismo, desde el punto de vista patológico, el uso de la vía parenteral puede justificarse en aquellas infecciones que radican en la profundidad del tejido, o que por su severidad se considere pueda estar dificultada la difusión del

antimicrobiano, como ocurre en mastitis causadas por *S. aureus*. En estos casos puede haber una distribución pobre o irregular de la droga en el parénquima intensamente inflamado por la compresión o bloqueo de los ductos como resultado de la acción de los productos de la inflamación (Ziv, 1980; Anderson, 1986; Calvino, 2007). Por lo tanto, considerando el efectivo pasaje de sangre a leche de la eritromicina, se determinaron los metabolitos microbiológicamente activos en leche para fijar los puntos de corte de CIM para este sitio particular, considerando la falta de actividad de los metabolitos unidos a proteínas (Ziv, 1980; MacGowan and Wise, 2001).

En el presente estudio se administró una dosis de 20 mg/kg por vía intramuscular, mientras que en otros estudios se utilizaron dosis menores por vía intramuscular o intravenosa (Swarbrick, 1966; Baggot and Gingerich, 1976). Ziv (1980) determinó que para una CIM de 0,5 µg/ml, valor idéntico a la CIM₉₀ hallada en este estudio, se puede obtener una concentración terapéutica en leche normal y mastítica por 24 hs utilizando una dosis de eritromicina de 10 mg/kg de peso corporal. En el presente estudio la concentración detectada en leche a las 24 hs de la aplicación de la dosis fue de 3,2 µg/ml, alcanzando un pico de 5,4 µg/ml a las 12 hs post administración. Es interesante destacar que en un estudio reciente, luego de la aplicación intramamaria de una preparación de 300 mg de eritromicina se determinó una concentración media en leche de 22,9 µg/ml a las 12 hs post administración (Bajwa *et al.*, 2007). Para definir los puntos de corte de CIM se tomaron los valores de eritromicina alcanzados en leche luego de la administración intramuscular de la droga, que cubrieron un 50-60% del intervalo entre dosis (Vogelman *et al.*, 1988; McKellar *et al.*, 2004). En base a estos puntos de corte no se detectaron errores mayores o “very major”, mientras que se

generaron 4 errores menores. Estos resultados son similares a los hallados mediante los puntos de corte de Z obtenidos en este estudio, y los puntos de corte de CIM propuestos por la NCCLS (NCCLS, 2002), sin embargo, se encontraron las diferencias fundamentalmente en el área que define a los aislamientos intermedios.

La eritromicina, como otros macrólidos de mayor actividad, se han mostrado efectivos para el tratamiento de IIM causadas por *S. aureus* y siguen siendo considerados como una de las opciones principales para el tratamiento de estas infecciones (McKellar, 1991; Ballarini, 2001; Tarabla and Canavesio, 2003; Bajwa *et al.*, 2007; Pol *et al.*, 2007). La eritromicina es considerada en un gran número de estudios como el representante de la familia de los macrólidos (Watts and Salmon, 1997; De Oliverira *et al.*, 2000; Gentilini *et al.*, 2000; Giannechini *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2002; Haveri *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio representan una importante contribución al establecer los puntos de corte de CIM en base a la concentración de eritromicina en leche luego de la administración de una dosis de 100 mg/Kg de peso.

Desde el punto de vista clínico, el objetivo principal de la utilización de un test de rutina para evaluar la susceptibilidad de un antimicrobiano usando puntos de corte estandarizados, es predecir el resultado de la terapéutica de la infección (Thonrsberry *et al.*, 1993, Mac Gowan and Wise, 2001). La amplia variación en la eficacia de curación clínica y bacteriológica entre rodeos y entre vacas por factores atribuidos a la patogénesis de la infección y respuesta del hospedador hacen dificultoso evaluar la respuesta clínica de la terapia con eritromicina (Ziv, 1980; Barkema *et al.*, 2006) y no fue planteada dentro de los objetivos del presente estudio.

En nuestro país se han utilizado también otros macrólidos para el tratamiento de mastitis bovina con aceptable eficacia (Calvinho *et al.*, 1988; Tarabla *et al.*, 2000; Tarabla and Canavesio, 2003; Pol *et al.*, 2007). Desde un punto de vista aplicado, la utilización de un agente para representar a una familia de compuestos estrechamente relacionados es motivo de controversias. Si el representante es considerado como el menos activo de la familia, puede llevar al incremento de informes de falsa resistencia frente a otros componentes del grupo con mayor actividad. Sin embargo, esta opción, desde el punto de vista clínico, acarrea menos peligro que predecir la susceptibilidad de un agente menos activo, basándose en la información obtenida de pruebas de susceptibilidad de un compuesto más activo (MacGowan and Wise, 2001).

10. CONCLUSIÓN

Las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos fueron clasificadas mediante los puntos de corte del test de difusión en agar generados en este estudio y los puntos de corte de CIM propuestos por la NCCLS, con un porcentaje aceptable de errores menores y muy inferior al obtenido utilizando los puntos de corte propuestos por la NCCLS para ambos métodos.

Las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos fueron clasificadas de manera similar mediante los puntos de corte de CIM y del test de difusión en agar generados en este estudio.

En conclusión, estos resultados justifican la revisión de los puntos de corte del método de difusión en agar para eritromicina a los efectos de facilitar la selección y uso racional de antimicrobianos por los veterinarios clínicos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACUÑA, C.N.; CHERTCOFF, R.E.; CISNEROS, G.; IZAK, E. and NIMO, J.M. (2000) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from quarters with clinical mastitis in Argentina. Proceedings National Mastitis Council Annual Meeting, Atlanta, GE.p. 217-218.
- ALI-VEHMAS, T.; WETPHALEN, P.; MYLLYS, V. and SANDHOLM, M. (1997) Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin G. J. Dairy Res. 64:253-260.
- ANDERSON, J.C. (1983). Veterinary aspects of Staphylococci. In: Staphylococci and Staphylococcal infections. Vol. 1. C.S.F. Easmon and C. Adlam (eds). Academic Press. London-New York.p. 193-241.
- ANDERSON, J.C. (1986). Barriers to successful therapy of staphylococcal mastitis, In: Proc. Symp. Mast. Cont. Hyg. Prod. Milk. Espoo, Finland.p. 109-117.
- ARRET, B.; JOHNOSON, D.P. and KIRSHBAUM, A. (1971). Outline of details for microbiological assays of antibiotics: second revision. J. Pharmaceutical Sci. 60:1689-1694.
- BAGGOT, J .D. and GINGERICH, D. A. (1976). Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. Res. Vet. Sci. 21:318-323
- BAGGOT, J. D. (1986). Principios de farmacología clínica veterinaria. 1ra ed. Zaragoza (España). Acribia S. A. 236 p.
- BAJWA, N.S.; BANSAL, B.K.; SRIVASTAVA, A.K. and RANJAN, R. (2007) Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. Vet Res. Comm. 31:603–610.
- BALLARINI, I.G. (2001). Drug therapy of bovine mastitis and pharmacokinetics. Ob. Doc. Vet. 22:27-31
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H. and ZADOKS, R.N. (2006). The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci 89: 1877-1895.
- BARON, E.J. and FINEGOLD, S.M. (1990). Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. S. Manning (ed.), The C. V. Mosby Co., St. Louis, MO. Pp. 172-185.
- BARRY, A.L. and JONES, R.N. (1987). Reliability of high-content disks and modified broth dilution tests for detecting staphylococcal resistance to the penicillinase-resistant penicillins. J. Clin. Microbiol. 25:1897-1901.

BOOTH, J.M. (1975). Mastitis control in the field: some results of two large field trials. In: Proc. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA.p. 19-31.

BOUTIVA-BEN BOUBAKER, I.; BEN ABES, R.; BEN ABDALLAH, H.; MAMIOUK, K.; MAHJOUBI, S.; KAMNOUN, A.; BEN REDJEB, S. (2004) Evaluation of a cefoxitin disc diffusion test for the routine detection of methicillin resistance. J. Clin. Microbiol; 10:762-765.

BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J.; FOX, L.K.; HARMON, R.J.; HOGAN, J.S.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; SMITH, K.L. and SORDILLO, L.M. (1996). Current concepts of bovine mastitis, p. 64. 4th Edition, The National Mastitis Council, Madison, WI.

BRAKSTAD, O.G. and MAELAND, J.A. (1997). Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. Review. APMIS 105: 264-276.

CALVINHO, L.F.; VITULICH, C.A.; ALMEIDA, R.A.; CANAVESIO, V.R.; QUAINO, O. (1988). Tratamiento contra mastitis agudas a base de espiramicina. Therios, 11:203-212.

CALVINHO, L.F.; DELGADO, A.R.; VITULICH, C.A.; OCCHI, H.L.; CANAVESIO, V.R.; ZURBRIGGEN, M.A. y TARABLA, H.D. (1991a) Susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. Vet. Arg. 8:677-860.

CALVINHO, L.F.; VITULICH, C.A.; ZURBRIGGEN, M.A.; CANAVESIO, V.R. y TARABLA, H.D. (1991b). Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. Therios 18:188-196.

CALVINHO, L.F.; TOSELLI, W.R.; WEIMANN, W.R.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; IGUSQUIZA, I.A. (2002) Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de estafilococos coagulasa positivos aislados de mastitis ovina en la cuenca lechera central de la Argentina. Rev. Arg. de Microbiol. 34:171-175.

CALVINHO, L.F. (2007). Terapia en mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*. Rev. IDIA XXI. 7:174-179.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W. (1995) Staphylococcus. En: Carter GR., Chengappa MM., Roberts AW (Ed), Essentials of Veterinary Microbiology. Fifth Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 115-120.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECCKER, P.; VAN LANDUYT, H. (2004) Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30ug) for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Eur J. Clin. Microbiol. Infect Dis. May; 23(5):389-92.

DEGRAVES, F.J. and FETROW, J. (1993). Economics of mastitis and mastitis control. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 9:421-434.

- DENAMIEL, G.; ALBARELLOS, G.; MAS, J.; PUIGDEVALL, G.T. y GENTILINI, E. (2007). Prevalencia de fenotipos de resistencia a macrólidos en estafilococos de animales domésticos. Rev. Arg. Microbiol. 39 (Supl. 1):176.
- DENIS, O.; MAGDALENA, J.; DEPLANO, A.; NONHOLL, C.; HENDRICK, E.; STRUELENS, M. (2002) J. Antimicrob. Chemother. 50. 755-766
- DE OLIVEIRA, A.P.; WATTS, J.L.; SALMON, S.A. and AARESTRUP, F.M.(2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. J. Dairy Sci. 83: 855-862
- ENRIGHT, M.C. (2003). The evolution of a resistant pathogen the case of MRSA. Curr. Op.Pharmacol. 3:474-479.
- ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; TROTTI, N. (1999) Mastitis bovina: terapéutica antimicrobiana intramamaria. Vet. Arg. 16:347-357.
- ERSKINE, R.J.; WALKER, R.D.; BOLIN, C.A.; BARTLETT, P.C. and WHITE, D.G. (2002) Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 85:111-1118.
- FAMIGLIETTI, A.; QUINTEROS, M.; PREDARI, S.C.; CORSO, A.; MARIN, M.; NICOLA, F.; RADICE, M.; LOPARDO, H.; CASELLAS, J.M.; BANTAR, C.; COUTO, E.; GALAS, M.; GOLDBERG; GUTKIND, G.; KONENSKY PUPKO, J.; SOLOAGA, R. (2004) Actualización del Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos-gram-positivos. Subcomité de antimicrobianos, SADEBAC, AAM. Diciembre 2004,
[Http: //www.aam.org.ar/actividades/T_CONSENSO_CGP.pdf](http://www.aam.org.ar/actividades/T_CONSENSO_CGP.pdf)
- FOX, L.K. and GAY, J.M. (1993). Contagious mastitis. Vet. Clin. North America: Food Anim. Pract. 9:475-487.
- FRANCIS, P.G. (1989). Update on mastitis. III. Mastitis therapy. Br. Vet. J. 145:302-310.
- FRANKLIN, A. (1998). Antibiotic policy and occurrence of resistance in Sweden. Proceedings of 25th International Dairy Congress, Aarhus, Denmark 229-234.
- FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; SCALISE, I.; GIRAUDO, J. y CALZOLARI, A. (1995). Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aislados en tres tambos de Córdoba, Argentina. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires). 76:288-292.
- GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DEGREGORIO, O. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci 83:1224-1227.
- GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; RODRIGUEZ FERMEPIN M.; DE TORRES, R. (2002) Antimicrobial susceptibility of Coagulase-

Negative Staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci., 85: 1913-1917.

GIANNEECHINI, R.E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. (2002) Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay. Acta vet. scand., 43:31-41.

GIBALDI, M. and PERRIER, D. (1982). Pharmacokinetics, Second edition, Ed. Marcel Decker, New York

GOORANINEJAD, S.; GHORBANPOOR, M. and PARVIZ SALATI, A. (2007) Antibiotic susceptibility of Staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis. Pakistan J. Biol. Sci. 10:2781-2783.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GOODMAN GILMAN, A. (1996) Quimioterapia de las enfermedades bacterianas. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman. Vol. II. 9 ed. México, McGraw-Hill. 1093-1299 p.

HAVERI, M.; SUOMINEN, S.; RANTALA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYÖRÄLÄ, S. (2005) Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. Vet. Microbiol. 106:97-102.

HINCKLEY, L.S.; POST, J.E. and DE CLOUX, J. (1985). Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. J.A.V.M.A. 187:709-711.

HOFSHAGEN, M.; KRUSE, H.; LASSEN, J.; STAVNES T.L.; ESSUN K.; HOLSTAD, G.; MORK, T.; SCHAU, J.; GRAVE, K. (1999). Resistance in bacteria from infections in animals. In: Usage of antimicrobial agents in animals and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from animals, feed, and food in Norway, NORM-VET, Ed. Hilde Kruse, ISSN-1502-4695, Oslo, Norway, pp 16-18.

HOGAN, J.S.; GONZALEZ, R.N.; HARMON, R.J; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. (1999) Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc. Madison, WI, p. 222.

JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B; WILFERT, C.M. (1994). Agentes antimicrobianos. En: Zinsser Microbiología.. 20^a. ed Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana S.A. 219-266 p.

KEHREMBERG, C. and SCHWARZ, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1156-1163.

KLEMENT, E.; CHAFFER, M.; LEITNER, G.; SHWIMMER, A.; FRIEDMAN, S.; SARAN, A. and SHPIGEL, N. (2005) Assessment of accuracy of disk diffusion tests

for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogen: a novel approach. *Mic. Drug Res.* 11:342-350

LAMBERT, A.P. (2005) Bacterial resistance to antibiotic: modified target sites. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 57:1471-1485.

LITTERIO, N.J.; CALVINHO, L.F.; FERNANDEZ, H.; TARABLA, H.D. and BOGGIO, J.C. (2007). Tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts detected by a microbiological screening test. *J. Vet. Med. A* 54:30-35.

LOUHI, M.; INKINEN, K.; MYLLYS, V. and SANDHOLM, M. (1992). Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. *J. Vet. Med. B* 39:253-262.

MACGOWAN, P. and WISE, R. (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (Suppl. S1):17-28.

MCKELLAR, Q.A. (1991). Intramammary treatment of mastitis in cows. *In Practice* (Nov.):244-249.

MCKELLAR, Q.A.; SANCHEZ BRUNI, S.F. and JONES, D.G. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27:503-514.

MCKINNEY, T.K.; SHARMA, V.K.; CRAIG, W.A. and ARCHER, G.L. (2001) Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J. Bacteriol.* 183:6862-6282.

MENSA, J.; GARCIA-VAZQUEZ, E. y VILA, J. (2003). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:200-208.

METZLER, C.M. and DEHAAN, R.M. (1974) Susceptibility tests of anaerobic bacteria: Statistical and clinical considerations. *J. Infect. Dis.* 130:588-594

METZLER, C.; ELFRING, G. and MCEWEN, A. (1986). A user Manual for NONLIN and Associated Programs. Upjohn, Iowa.

MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E.; HIRVELÄ-KOSKI, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JUNTILA, J.; KULKAS, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEN, M.; SALONIEMI, H.; SANDHOLM, M. and SARANPÄÄ, T. (1998) Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 – Changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta. Vet. Scand.* 39:119-126.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1994a). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically-third edition; Approved standard. NCCLS Document M7-A3. Villanova, PA.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1994b). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test-fifth edition; Approved standard. NCCLS Document M2-A5. Villanova, PA.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1999) Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M37-A. Wayne, Pennsylvania, USA

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Second Edition. NCCLS document M31-A2. Pp. 86. Wayne, Pennsylvania, USA.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2004). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests – Seventh Edition : Approved standard M2-A8. NCCLS, Villanova, PA.

NICOLA, F.; BANTAR, C.; FERNANDEZ CANIGIA, L.; RELLOSO, S.; BIANCHINI, H.; SMAYEVSKY, J. (2000). Comparison of several methods to determine methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* 36:91-93

OTERO, P.E.; REBUELTO, M.; ALBARELLOS, G.; KREIL, V.; AMBROS, L.; DENAMIEL, G.; GENTILINI, E.; HALLU, R.E. (1999) Farmacocinética del florfenicol en bovinos en lactación. *In. Vet.* 1:33:37.

OWENS, W.E. and WATTS, J.L. (1987). Effects of milk on activity of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine udders. *J. Dairy Sci.* 70:1946-1951.

OWENS, W.E. and WATTS, J.L. (1988). Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase testing of staphylococci isolated from dairy herds. *J. Dairy Sci.* 71, 1934-1939.

OWENS, W.E.; RAY, C.H.; WATTS, J.L.; YANCEY, R.J. (1997). Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci* Vol. 80:313-317.

PENGOV, A. and CERU, S. (2003) Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 86:3157-3163

- PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- POL, M.; CATRACCHIA, C.; MAITO, J.; TIRANTE, L.; CHAVES, J.; CALVINHO, L. (2007). Factors affecting cure of *Staphylococcus aureus* mastitis treated with systemic or intramammary extended therapies. En: Proceedings 46th Annual Meeting, National Mastitis Council. Pg. 292-293. San Antonio, Texas, EE.UU.
- PORTIS, E.S.; WATTS, J.L.; LINDEMAN, C.J. (2005) Interpretive Criteria for Antimicrobial Susceptibility Testing Of Ceftiofur Against Bacteria Associated With Bovine Mastitis. NMC Annual Meeting Proceedings. P 277.
- PRESCOTT J.F. (1999). Antimicrobial Chemotherapy. En : Hirsh DC, Zee YC (Ed), Veterinary Microbiology, Blackwell Science, Inc. Malden, Massachusetts, p. 28-45.
- PYÖRÄLÄ, S.H. and PYÖRÄLÄ, K.O. (1998) Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989 – 1995). *J.A.V.M.A* 212:407–412.
- RIVERO, V.B.; VENA, M.M. y CORBELLINI C.N. (1984). Resultados bacteriológicos en casos de mastitis clínicas en rodeos lecheros de la cuenca de abasto del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4:211-223.
- ROSSETTI, C. (1993). Prevalencia de mastitis subclínicas por *Staphylococcus aureus* en tambos de la cuenca de Buenos Aires y su susceptibilidad “in vitro” a los antimicrobianos. *Vet. Arg.* 95:523-527.
- RULE, R.; FRANCO, M.; PRACCA, G.; GRANDE, F. y VENERONI, R. (1992). Diagnóstico bacteriológico de mastitis aguda de bovinos lecheros y su sensibilidad a quimioterápicos. *Vet. Arg.* 9:604-608.
- SALMON, S.A.; WATTS, J.L.; AARESTRUP, F.M.; PANKEY, J.W. and YANCEY, R.J.(1998). Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary gland of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.* 81:570-578
- SANDHOLM, M.; ALI-VEHNAS, T.; NYHOLM, K.; HONKANEN-BUZALSKI, T. and LOHUI, M. (1991). Failure mechanisms in lactational therapy of staphylococcal mastitis. *Flem. Vet. J.* 62 (Suppl. 1):171-186.
- SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.A.; AGUERO, H.; LEON, B.; ESPINOZA, S.; IRAGUEN, D.; PUGA, J. y BORIE, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X^a Región, Chile. *Arch. Med. Vet. (Valdivia)* 34:221-234
- SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J. and JAIN, N.C.(1971). Bovine Mastitis. p. 360. Lea & Febiger. Philadelphia.

SKOW, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON-LIJEQUIST, B. and KAHLMETER, G. (2003). Evaluation of a cefoxitin 30 µg disk on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 52:204-207.

SOBACK, S.; PAAPE, M.J.; FILEP, R.; VARMA, K.J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. J. vet. Pharmacol. Therapy. 18. 413-417.

SOLOAGA, R.; CORSO, A.; GAGETTI, P.; FACCONI, D.; GALAS, M.; Grupo Colaborador MRSA (2004). Detección de meticilino-resistencia en *Staphylococcus aureus* : Comparación de métodos convencionales y aglutinación con MRSA- Screen latex. Rev. Arg. Microbiol. 36:36-40.

STEWART, C.D.; RANEY, P.M.; MORRELL, A.K.; WILLIAMS, P.P.; MCDUGALL, L.K.; JEVITT, L.; MCGOWAN, J.E.; TENOVER, F.C. (2005). Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 43:1716-1721.

SWARBRICK, O. (1996). The use of parenteral erythromycin in the treatment of bovine mastitis. Vet. Rec. 79:508-512.

SWENSON, J.M; TENOVER, F.C.(2005). Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J. Clin. Microbiol. 43:3818-3823.

TARABLA, H.D.; CALVINHO L.F. y CANAVESIO, V.R. (2000). Eficacia de una combinación de espiramicina y sulfato de neomicina como tratamiento antibiótico de vaca seca. Therios 29:41-44.

TARABLA, H.D. and CANAVESIO, V.R. (2003). Prevalence of intramammary infections by major pathogens at parturition in dairy cows after intramuscular antibiotic therapy at drying off: a preliminary report. J. Dairy Res. 70:233-235.

TESSI, M.A.; De ESPONDA, R.A.; SABATTINI de COMINI, L.; GIAVEDONI de TAHER, M.D.; PAURA, A.; MOGUILVSKY, M.A.; CASADO, N.; ROMANO, L. y WEIDMANN, P. (1979). Etiología microbiana de mastitis bovina subclínica en la cuenca lechera santafesina. Rev. Arg. Microbiol. 11:49-56.

THORNSBERRY, C. (1985). Automated procedures for antimicrobial susceptibility test, p. 1015-1018 In: E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and Shadomy (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

THORNSBERRY, C.; MARLER, J.K.; WATTS, J.L. and YANCEY, R.J. (1993). Activity of pirlimycin against pathogens from cows with mastitis and recommendations for disk diffusion tests. Antimicrob. Agents Chemother. 37:1122-1126.

THORNSBERRY, C.; BURTON, P.J.; YEE, Y.C.; WATTS, J.L. and YANCEY, R.J. (1997). The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. *J. Dairy Sci.* 80:413-421.

URBASKOVA, P; MELTER, O; MACKOVA, B; JAKUBU, V; WUNSCHOVA, M. (2004) Detection of MRSA in a group of 752 strains of *S. aureus* using a cefoxitin disk. *Epidemiol Mikrobiol Immunol.*; 53:62-65

VADILLO MACHOTA, S; PIRIZ DURAN, S.; MATEOS YANES, E.M. (2002) Resistencia bacteriana. Valoración de antibacterianos. En: Manual de Microbiología Veterinaria. 2 ed. Madrid. McGraw-Hill. Interamericana. 133-144 p.

VARMA, K.J.; SAMS, R.A.; LOBELL, R.D. and LOCKWOOD, P.W. (1991) Pharmacokinetics and efficacy of a new broad spectrum antibiotic florfenicol in cattle. *Acta. Vet. Scand. (Suppl.)* 87:102-104.

VOGELMAN, B.; GUDMUNDSSON, S.; LEGGET, J.; TURNIDGE, J.; EBERT, S. and CRAIG, W.A. (1988). Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J. Infect. Dis.* 158:831-847.

WAINMAIER, M. (1984). Estudio de la sensibilidad *in vitro en cepas de Staphylococcus aureus*. En: Actas 1er. Cong. Nac. Mastitis Bov. P. 51.

WATTS, J.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41-66.

WATTS, J.L. and YANCEY, R.J. (1994a). An update on antimicrobial susceptibility testing of mastitis pathogens. In: Proc. National Mastitis Council Annual Meet. Pp. 14-19.

WATTS, J.L. and YANCEY, R.J. (1994b). Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:346-356.

WATTS, J.L.; SALMON, S.A.; YANCEY, R.J., Jr.; NICKERSON, S.C.; WEAVER, L.J.; HOLMBERG, C.; PANKEY, J.W. and FOX, L.K. (1995). Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 78:1637-1648.

WATTS, J.L. and SALMON, S.A. (1997). Activity of selected antimicrobial agents strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. *J. Dairy Sci.* 80, 788-791.

WEIDMANN, P.; HEER, G.; ROSSET, A.; GONZALES, A.; WEIDMANN, R.; ERNI, L. y RUSSI, N. (1988). Calidad de leche producida en 25 tambos que aplicaban tecnología avanzada en el Departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe durante el período de Abril de 1984 a Abril de 1985. En: XII Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata, 16-18 de Junio.

WILSON, D.J.; SEARS, P.M.; GONZALEZ, R.N.; SMITH, B.S.; SHULTE, H.F.; BENNETT, G.J.; DAS, H.H. and JOHNSON, C.K. (1996). Efficacy of florfenicol for treatment of clinical and subclinical bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 57:526-528.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M. and KOJIMA, A. (2002). Minimum Inhibitory Concentrations of 20 Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Intramammary Infections in Japan. *J. Vet. Med. B* 49, 457-460.

ZIV, G. (1969). Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine udders in Israel. *Refuah Vet.* 26:104-113.

ZIV, G. (1980). Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *J.A.V.M.A.* 176:1109-1115.

ZIV, G. (1992). Treatment of acute and peracute mastitis. *Vet Clin. Noth. Am.: Food Anim. Pract.* 8:11-15.