



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

**Susceptibilidad de cepas causantes de
infecciones superficiales en el hombre y
mastitis bovina a diferentes antibióticos de
uso frecuente**

Directora: Dra. Mónica Finola

Co-Directora: Mic. Mariana García

Alumna: María José Bianco

Agosto 2011

Trabajo Final de Grado para optar al Título de **MICROBIÓLOGA**, bajo la dirección de la Dra. Mónica Finola y la co-dirección de Mariana García. Realizado en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencia Exactas, Físico-químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología.

Alumna:

María José Bianco

Directora:

Dra. Mónica Finola

Co-directora:

Mariana García

Miembros del Jurado:

Dra. Marisa Rovera

Dra. Liliana Pascual

Dra. Cecilia Farnochi

Río Cuarto, 24 de Agosto de 2011

1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1 Infecciones bacterianas superficiales en el hombre</i>	1
<i>1.2 Mastitis bovina</i>	3
1.2.1 Patogénesis	5
1.2.2 Clasificación	6
1.2.2.1 Mastitis clínica	6
1.2.2.2 Mastitis subclínica	7
1.2.3 Etiología	8
1.2.3.1 Patógenos contagiosos	8
1.2.3.2 Patógenos ambientales	9
1.2.3.3 Patógenos oportunistas	10
1.2.4 Diagnóstico	10
<i>1.3 Clasificación de los antibióticos de uso frecuente según su mecanismo de acción</i>	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
<i>3.1 Materiales</i>	18
3.1.1 Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos	18
3.1.2 Antibióticos	18
3.1.3 Medios de cultivo	19
<i>3.2 Métodos</i>	20
3.2.1 Conservación y propagación de cepas bacterianas	20
3.2.2 Preparación y estandarización de inóculo bacteriano	21
3.2.3 Preparación de las soluciones de antibióticos	21
3.2.4 Análisis de la actividad antibacteriana	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
<i>4.1 Preparación del inóculo bacteriano estandarizado utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana</i>	24
<i>4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria</i>	26
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Microbiota habitual de la piel	2
Tabla 2: Clasificación de los aminoglucósidos	14
Tabla 3: Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos	18
Tabla 4: Concentraciones de antibiótico probadas	22
Tabla 5: Estandarización del inóculo bacteriano de cada cepa a ensayar	24
Tabla 6: Actividad antibacteriana de gentamicina sobre cepas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina	26
Tabla 7: Actividad antibacteriana de penicilina G sobre cepas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina	28
Tabla 8: Actividad antibacteriana de tetraciclina sobre cepas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina	30
Tabla 9: Actividad antibacteriana de gentamicina sobre cepas Gram negativo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina	32
Tabla 10: Actividad antibacteriana de tetraciclina sobre cepas Gram negativo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina	32
Tabla 11: Actividad antibacteriana de ácido nalidíxico sobre cepas Gram negativo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina	33
Grafico 1: CIM de gentamicina, penicilina G y tetraciclina sobre las cepas Gram positivo	35
Grafico 2: CIM de gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico sobre cepas Gram negativo	37

1.1 Infecciones bacterianas superficiales en el hombre

La **piel** es el órgano más grande del cuerpo humano o animal, ocupa aproximadamente 2 m² y su espesor varía desde 0,5 mm hasta 4 mm. Actúa como una barrera protectora, pudiendo aislar el organismo del medio que lo rodea, protegiendo y ayudando a mantener íntegra sus estructuras. Está formada por dos capas diferentes: la **epidermis** que es la capa más externa y cubre la capa de tejido conectivo llamada **dermis**. Cada una de ellas tiene funciones y componentes diferentes que se interrelacionan para formar así lo que se denomina “la primera línea de defensa”. De la piel dependen ciertas estructuras llamadas anexos cutáneos que son los pelos, las uñas, las glándulas sebáceas y sudoríparas (Figura 1). La mayoría de los microorganismos que forman la microbiota habitual (Tabla 1) de este órgano se asocian directa o indirectamente a dichas estructuras, las cuales le proporcionan un hábitat propicio para su desarrollo. En condiciones normales se encuentran de 10³ a 10⁴ microorganismos/cm², sin embargo los recuentos pueden aumentar a 10⁶/cm² en las áreas húmedas del cuerpo, como las axilas y la ingle. La higiene y el lavado adecuado de la piel pueden disminuir los recuentos hasta un 90%, pero se vuelve a las cantidades normales dentro de las 8 horas. Ciertos factores están implicados en el crecimiento bacteriano a nivel cutáneo. Dentro de ellos se destaca: la sequedad, el pH bajo y las sustancias inhibitorias (compuestos bactericidas y bacteriostáticos) producidas por la piel. A pesar de esto, la piel presenta un conjunto de microorganismos que pueden convivir con el huésped en estado normal, sin causar daño o provocar una enfermedad.

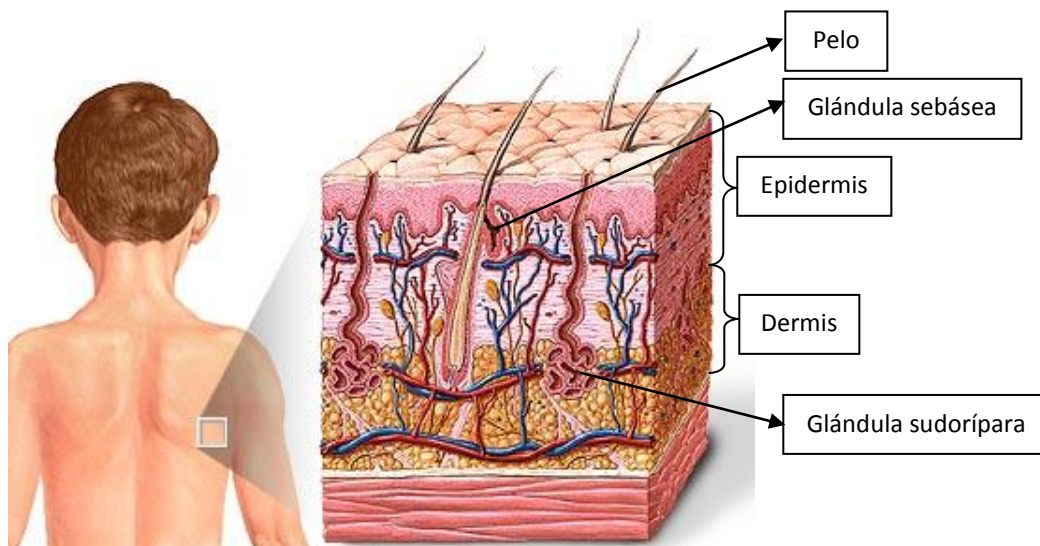


Figura 1: La piel y sus estructuras principales. Fuente: www.adam.com

1.1.1 Tabla 1: Microbiota habitual de la piel

Bacterias Gram positivo	Bacterias Gram negativo
<p>Cocos</p> <p><i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Sarcinas</i> <i>Micrococcus</i> <i>Streptococcus</i> alfa hemolíticos <i>Streptococcus</i> gamma hemolíticos <i>Enterococcus</i></p> <p>Bacilos</p> <p><i>Difteroides</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Propionobacterium</i></p>	<p>Bacilos</p> <p><i>Coliformes</i> <i>Proteus</i> <i>Acinetobacter</i></p>

Esta microbiota habitual se adquiere con rapidez durante y poco después del nacimiento, y cambia de constitución en forma permanente a lo largo de la vida. Tiene como función principal prevenir la colonización de otros microorganismos potencialmente patógenos, gracias a la producción de factores con actividad antibacteriana, tales como bacteriocinas en algunos casos, productos de desecho metabólico que sumados a la falta de oxígeno disponible impiden el establecimiento de otras especies (54).

Hay seres humanos que presentan un riesgo específico de contraer infecciones de piel, tal es el caso de individuos diabéticos, que poseen una irrigación cutánea disminuida, en especial en las manos y en los pies; y los enfermos de SIDA, que presentan un sistema inmunológico deprimido. No obstante la piel dañada por los rayos solares, los macro o micro traumas con objetos, las rascaduras u otra irritación, predisponen a una persona a sufrir una infección (67). Dentro de las denominadas infecciones de las heridas externas, se incluyen las asociadas con una lesión traumática o con úlceras por decúbito (escaras), picaduras o mordeduras de animales o de personas, o cuerpos extraños en la piel o las mucosas (37).

Diferentes bacterias son responsables de la contaminación y colonización de heridas, o de infecciones clínicas. Las bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, frecuentemente se aíslan de las heridas de piel en el hombre (30).

S. aureus es la principal especie patógena de su género y es causa común de diversas infecciones, tanto de origen comunitario como hospitalario. Causa infección de piel y de tejidos blandos (SSTI), entre otras. Muchas cepas de *S. aureus* han desarrollado resistencia a los agentes antibacterianos disponibles, creando un serio problema en la microbiología médica. Los antibióticos β -lactámicos son las drogas de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*. La resistencia a compuestos β -lactámicos hace referencia a meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina y dicloxacilina. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas bacterianas presentan en general resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. A través de diversos mecanismos presentan resistencia a cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y quinolonas. Las infecciones causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) pueden ocasionar una amplia variedad de síntomas dependiendo del área del cuerpo afectada. Estas incluyen heridas de cirugía, quemaduras, sitios de inserción de catéter, ojos, piel y sangre (18).

S. epidermidis produce infecciones que normalmente son adquiridas en el hospital como resultado de la contaminación de cortes quirúrgicos con los microorganismos presentes en los pacientes o en el personal del hospital. Por otro lado, las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* suelen encontrarse formando parte de la microbiota de piel, del aparato genito-urinario y del gastrointestinal; por esto, las infecciones ocurren a partir de estas ubicaciones (7). Además, las infecciones por *P. aeruginosa*, son la complicación más seria en los pacientes con quemaduras, seguida por las infecciones a *K. pneumoniae*, *E. coli*, entre otros microorganismos patógenos (2; 40).

1.2 Mastitis bovina

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria (Figura 2) que produce alteraciones físicas y químicas en la leche, aumento en el número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y finalmente cambios como la pérdida de la funcionalidad. Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes y la presencia de agentes infecciosos que han logrado colonizar el tejido secretor (13).



Figura 2: Bovino con mastitis. Fuente: www.infoagroisp.com

Es importante considerar que se trata de una enfermedad multifactorial, dónde uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la nutrición del animal (31), ya que la deficiencia en energía y proteínas debido a una mala nutrición ejerce un efecto directo sobre la salud de la ubre de la vaca (63). Otros factores que intervienen favoreciendo la producción de la enfermedad son el medio ambiente y el agente causal, jugando el hombre un papel decisivo (59).

Es una enfermedad de distribución mundial y ha sido catalogada como la más costosa de todas las enfermedades que afectan al ganado lechero. Adicionalmente, la mastitis causa alteraciones en la composición y como consecuencia tiene un impacto negativo en el rendimiento y calidad de la leche, así como también la vida útil de los productos derivados (56). La producción lechera en Argentina tiene lugar principalmente en la región pampeana, abarcando las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa, donde se encuentran las principales cuencas lecheras y prácticamente la totalidad de los tambos e industrias del sector (15).

Se han identificado más de 80 agentes etiológicos, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas. Esta condición multietiológica y la ubicuidad en el ambiente de algunos de los microorganismos causantes de la enfermedad hace imposible la erradicación de la misma (3).

El grado de infección puede variar mucho, desde subclínico hasta clínico, en sus diversas formas, dependiendo de la severidad con la que la ubre reaccione a la fuente de irritación (29).

Existen programas de control de mastitis desarrollados desde la década del 60, y se basan en la higiene durante el ordeño, incluyendo desinfección de pezones post ordeño, terapia

antibiótica en el período de lactancia y al inicio del período seco, y descarte de vacas con infección crónica (16). Estos programas permiten reducir la enfermedad a niveles aceptables.

1.2.1 Patogénesis

El carácter, la intensidad y el tiempo de aparición de los síntomas clínicos, así como la duración de la inflamación de la ubre está determinada por:

- La patogenicidad y virulencia del agente causal.
- Los mecanismos de defensa de la vaca.
- El nivel funcional de la glándula mamaria.
- La efectividad de un tratamiento.

Como resultante de la interacción de factores favorables un agente patógeno puede infectar una ubre. La entrada y penetración de una cepa patógena en la glándula se inicia a través del canal del pezón, pasando por la cisterna del pezón hacia la cisterna de la glándula y de allí se dirige a los conductos lácteos para llegar a los espacios alveolares (Figura 3). Esa vía de infección galactógena es la más importante para casi todos los agentes patógenos de la mastitis (63).

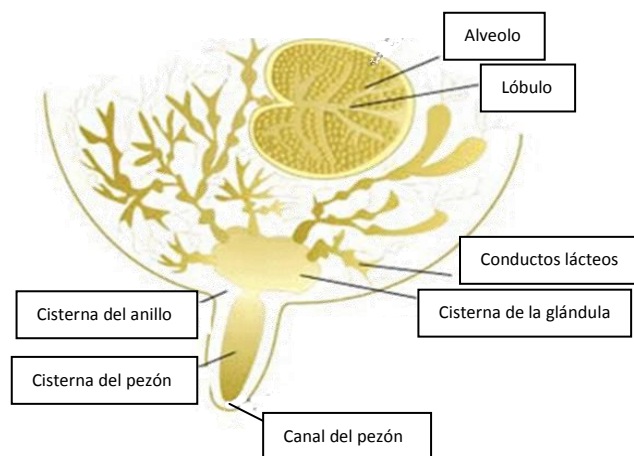


Figura 3: Glándula mamaria. Fuente: <http://buenaspracticaddeordenoanaely.blogspot.com>

De los daños más notables a nivel de tejido glandular se destacan la congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración a nivel capilar que produce cambios en la composición de la leche (25), como por ejemplo:

- Disminución de la calidad y cantidad de caseína sintetizada.
- Disminución de la grasa butirosa.
- Disminución de la lactosa.

- Aumento de la concentración de sodio.
- Aumento de los cloruros.
- Aumento de las proteínas del suero sanguíneo.
- Aumento de enzimas.
- Aumento de las células somáticas.

La contaminación de las manos de los ordeñadores, los paños de lavado y las copas de los aparatos de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales por la leche procedente de cuartos infectados (49).

1.2.2 Clasificación

Desde el punto de vista de los signos que produce, la mastitis se divide en clínica y subclínica.

1.2.2.1 Mastitis clínica

La mastitis clínica es la enfermedad más común y más costosa en la producción de leche de los países industrializados (43). Esta forma de infección intramamaria se caracteriza por anomalías visibles en la ubre y/o en la leche, cuya severidad varía mucho en el transcurso de la enfermedad. Pueden observarse cuartos enrojecidos o hinchados, o bien, palpase endurecidos (1).

La mastitis clínica es causada generalmente por estafilococos, estreptococos y coliformes.

Según su grado de severidad este tipo de mastitis puede ser clasificada como:

- ✓ **Mastitis clínica subaguda:** la inflamación característica es levemente clínica y se encuentran alteraciones menores en la leche como grumos, flóculos o aspecto aguado. El cuarto afectado puede presentar leve hinchazón y sensibilidad al tacto. Puede que exista la posibilidad de reducción en la producción de leche. No se presentan signos sistémicos de la enfermedad.
- ✓ **Mastitis clínica aguda:** el cuarto afectado presenta enrojecimiento, hinchazón, endurecimiento y sensibilidad al tacto. La leche tiene aspecto anormal, pudiendo ser purulenta, serosa aguada o sanguinolenta. La producción láctea disminuye marcada y repentinamente. Pueden presentarse síntomas generales como aumento de la temperatura rectal, pérdida del apetito, menor actividad, disminución de la función ruminal, pulso acelerado, deshidratación, debilidad, temblores, diarrea y depresión.

- ✓ **Mastitis clínica hiperaguda:** es una forma de inflamación mamaria muy poco frecuente que se caracteriza por acontecer muy rápidamente. Los síntomas son los mismos que se presentan en la mastitis clínica aguda, pero con expresión mucho más severa. Además, se presentan signos como shock, fibrosis en la ubre, septicemia, pérdida de la coordinación muscular, extremidades frías, reducción del reflejo pupilar, entre otras (35).

1.2.2.2 Mastitis subclínica

Esta forma de mastitis es el tipo más frecuente de infección intramamaria caracterizada por ausencia de signos clínicos en la ubre; la apariencia de la leche es normal sin que existan cambios organolépticos en la misma (13). El número de células somáticas en la leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, se encuentra elevado al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto. Esta enfermedad es sutil y difícil de corregir ya que la vaca parece saludable. Comúnmente es de larga duración, difícil de tratar con terapia antibiótica, y puede servir como un reservorio para infectar a otros animales en el rebaño lechero (32).

Es importante para los productores lecheros y sus asesores veterinarios enfocar su atención al control de la mastitis subclínica debido a que:

- Es 15 a 40 veces más prevalente que la mastitis clínica.
- Usualmente precede a la mastitis clínica.
- Es de duración prolongada.
- Es más difícil de detectar debido a la naturaleza oculta de la enfermedad.
- Reduce significativamente la producción de leche.
- Afecta adversamente la composición de la leche.
- Constituye en reservorio de patógenos causantes de mastitis que pueden diseminarse a otras vacas del hato (46).

Los agentes asociados más frecuentemente a esta infección subclínica son bacterias Gram positivo, dentro de las cuales se destacan: *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis* (1).

1.2.3 Etiología

Los microorganismos causantes de mastitis proceden de la vaca y/o de sus alrededores; y han sido clasificados de acuerdo a sus características de distribución e interacción con el pezón y su canal (16) como:

1.2.3.1 Patógenos contagiosos

La fuente principal dónde se albergan son los cuartos mamarios de las vacas infectadas. Se transmiten de vaca en vaca generalmente durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, los paños de secado y las pezoneras (56).

Los microorganismos que recobran importancia en este grupo son:

- *Staphylococcus aureus*

No es un patógeno obligado de la ubre, ya que puede encontrarse en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas; las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de allí desencadenar una reacción inflamatoria (13). Puede causar tanto mastitis clínica como subclínica. La infección tiende a producir cicatrices, que resultan en sacos de infección cerrada en la ubre que son difíciles de alcanzar por los antibióticos, tales sacos pueden romperse y abrirse a otras partes de la glándula más tarde (24; 52).

- *Streptococcus agalactiae*

Este microorganismo es la causa más común de infecciones subclínicas pero muy rara vez produce una enfermedad severa (mastitis aguda) (39). El mismo vive en la ubre de la vaca y sobrevive solamente un corto período de tiempo por fuera de la glándula mamaria. Se disemina principalmente durante el ordeño por medio de la máquina de ordeño, las manos contaminadas del operador y telas utilizados para lavar la ubre. La infección permanece en forma indefinida en la glándula mamaria de la novilla. *S. agalactiae*, puede ser erradicado del hato con un tratamiento antimicrobiano apropiado, combinado con buenas prácticas de manejo. Aún con ésta característica de fácil erradicación, puede llegar a diseminar fácilmente en el hato después de la compra de un animal infectado (13).

- *Mycoplasma bovis*

Es un patógeno poco común en los tambos, pero ha sido aislado en Argentina. La mastitis causada por este agente aparece repentinamente y es extremadamente

contagiosa. La producción láctea cae marcadamente, la enfermedad no responde a antibióticos y puede estar acompañada de patologías respiratoria, reproductiva y articular. El uso de jeringas intramamarias multidosis y la inadecuada desinfección de la punta del pezón favorecen el desarrollo de la enfermedad. Los tratamientos no son de utilidad y los animales no desarrollan inmunidad, por lo que todos los animales infectados deben ser aislados inmediatamente del hato (13).

1.2.3.2 Patógenos ambientales

El reservorio principal es el ambiente en el que viven las vacas. Estos microorganismos provienen del suelo, heces, camas de los animales, aguas contaminadas y del alimento, entre otras; y no dependen del momento del ordeño para ganar acceso al extremo del pezón. Pueden provocar infecciones en cualquier momento, pero más frecuentemente en el período de seca y más probablemente en el lapso peri-parto (56). Estos patógenos son los principales agentes causales de la mastitis clínica en la mayoría de las manadas lecheras (58). La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis (47).

Estos organismos constituyen un grupo heterogéneo de géneros y especies bacterianas, siendo las más frecuentemente aisladas:

- *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*

Se encuentran en la cama (especialmente camas orgánicas: paja, aserrín, etc), aguas estancadas y tierra, como así también en la piel de la vaca (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores. Estos microorganismos son generalmente transferidos desde el medio ambiente al pezón entre los ordeños, pero algunas transferencias pueden tener lugar durante el ordeño (28). Estos agentes no pueden ser eliminados del hato debido a que son parte normal del medio ambiente. El grado de infección por estas bacterias tiende a incrementarse cuando las condiciones favorecen su crecimiento, por ejemplo, durante los meses húmedos del año. Ambas especies de *Streptococcus* son responsables de la mayoría de las mastitis que se presentan al comienzo o al final del período de seca. Dentro de los estreptococos ambientales también existen otras especies, por ejemplo, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus faecalis*, con capacidad de causar mastitis (19).

- Bacterias coliformes

Son bacterias que habitan normalmente en el suelo e intestino de las vacas. Son capaces de acumularse y multiplicarse en la materia fecal y en la cama del animal. Los coliformes pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. Una característica distintiva de estos agentes bacterianos es su capacidad de multiplicarse rápidamente en la leche y producir toxinas que son absorbidas dentro del torrente circulatorio. Como resultado de esta capacidad, las infecciones por coliformes conducen a mastitis clínicas agudas. La temperatura corporal de la vaca puede elevarse hasta 40° C, el cuarto infectado se inflama y es sensible al tacto. Por medio de sus mecanismos de defensa, el animal puede eliminar las bacterias de la ubre pero las toxinas permanecen y la vaca puede llegar a morir. Las vacas libres de otras bacterias causantes de mastitis, como *S. aureus* y *S. agalactiae*, pueden ser más susceptibles a las bacterias coliformes. Entre las bacterias coliformes que producen mastitis, la especie patógena predominante es *Escherichia coli* (6; 57). La infección por esta bacteria puede derivar en un cuadro clínico inflamatorio severo, que lleva a la eliminación de la bacteria dentro de las 96 h (44) o a un resultado fatal para el animal que incluye choque, sepsis y a menudo muerte (11; 12).

1.2.3.3 Patógenos oportunistas

La fuente más importante de infección es la piel de la vaca. La frecuencia de infección es mayor en el período de secado, durante el cual, la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección post-ordeño.

Dentro de este grupo de microorganismos patógenos se destacan los estafilococos coagulasa negativos (SCN). Las infecciones que causan suelen ser leves, raramente generan casos clínicos y si aparecen, suelen ser moderados. Su presencia es muy común en la piel sana de los pezones y en las manos del ordeñador. La mayoría de las mastitis producidas por estos microorganismos se curan espontáneamente sin la necesidad de una terapia antimicrobiana (11; 12).

1.2.4 Diagnóstico

La identificación de los microorganismos patógenos causantes de mastitis y su susceptibilidad a antimicrobianos es muy importante, no solo para la elección correcta del tratamiento antimicrobiano que se le aplicará a la vaca, sino también para diseñar o modificar

programas de control aplicados a la finca lechera, para poder prevenir la extensión de la enfermedad.

En la actualidad la detección del agente etiológico es generalmente hecha por cultivo bacteriológico (42).

Otro método de identificación que puede utilizarse es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica precisa, pero requiere para su realización la ayuda de personal experimentado y de un costoso equipo (64).

Una vez aislado e identificado el agente causal puede procederse a la prueba de susceptibilidad a los antibióticos (9). Dentro de los antimicrobianos que se utilizan para el tratamiento de la mastitis se encuentran los β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal (53; 55).

1.3 Clasificación de los antibióticos de uso frecuente según su mecanismo de acción

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que difieren en su comportamiento farmacocinético (relación entre la dosis administrada y la duración de su efecto) y farmacodinámico (acción sobre el organismo y sus efectos). Ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo y tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones. La antibioticoterapia tiene como objetivo controlar y disminuir el número de agentes patógenos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos (10).

➤ **Betalactámicos**

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo β -lactámico. Actúan sobre la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática. Presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico.

Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gram negativo, pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. El espectro de los β -lactámicos incluye bacterias Gram positivo, Gram negativo y espiroquetas.

La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, denominada transpeptidación. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los β -lactámicos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular. Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (62).

Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes:

- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Monobactámicos
- Carbapenemes

Penicilinas

Todas las penicilinas presentan la misma estructura básica que consiste en un núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, constituido por un anillo β -lactámico unido a un anillo de tiazolidina.

Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillium*. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas. Se clasifican de acuerdo a su origen y espectro de acción en: penicilinas naturales (penicilina G y V), penicilinas antiestafilocócicas (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilinas). Los tipos de penicilinas difieren entre sí según su espectro de acción. Por ejemplo: la oxacilina tienen actividad *Staphylococcus* spp. meticilino sensibles, la penicilina G es eficaz contra cocos Gram positivo (estreptococos), la ampicilina además actúa sobre *Enterococcus* y *E. coli* no productoras de β -lactamasas, entre otros (62).

Las penicilinas son los antibióticos que poseen menor toxicidad directa con respecto a cualquier otro antimicrobiano. Los efectos colaterales más graves se deben a la hipersensibilidad (65).

Cefalosporinas

Son productos de origen natural derivados de la fermentación del *Cephalosporium acremonium*. Se parecen a la penicilina en su estructura y forma de acción. Se caracterizan por presentar un anillo β -lactámico fusionado a un anillo dihidrotiazina de seis miembros, formando así el núcleo cefem (ácido 7-aminocefalosporánico).

Son antibióticos de uso muy amplio, activos contra la mayor parte de los microorganismos susceptibles a las penicilinas y han resultado ser una alternativa útil en pacientes alérgicos a esta droga. Se las clasifica en generaciones sobre la base de las características generales de su actividad antimicrobiana (66). Actualmente existen cuatro generaciones donde, en líneas generales, las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos Gram positivo, y las generaciones sucesivas van perdiendo parte de esa actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos Gram negativo, con algunas excepciones. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y *Listeria monocytogenes* (62).

Monobactámicos

Se caracterizan por poseer un anillo β -lactámico monocíclico y resisten a la acción de las β -lactamasas. Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias Gram negativo aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a Gram positivo y bacterias anaerobias (65).

Carbapenemes

Constituyen la única clase de β -lactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem es el primer carbapenem desarrollado para uso clínico. Es un derivado semisintético producido por *Streptomyces* spp. Otros compuestos más modernos son meropenem y ertapenem.

Su actividad bactericida se extiende a cocos Gram positivo incluyendo *Staphylococcus* spp. sensibles a meticilina, *S. pneumoniae* y otros *Streptococcus*. Solo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a betalactámicos, algunas especies de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Es activo sobre la mayoría de aislamientos de enterobacterias y *Haemophilus* spp., incluyendo las cepas productoras de β -lactamasas. Tiene una muy buena actividad anaerobicida, con excepción de *Clostridium difficile*. En el caso de ertapenem, este no es activo sobre *P. aeruginosa* (62).

La utilización de inhibidores de β -lactamasas en combinación con antibióticos β -lactámicos permite la inactivación de determinadas β -lactamasas producidas por gérmenes Gram positivo, Gram negativo, anaerobios, y aun por micobacterias. Los inhibidores de β -lactamasas representan una alternativa terapéutica mejorada respecto del resto de los β -lactámicos al asegurar un espectro antimicrobiano mayor. Actualmente existen tres inhibidores de β -lactamasas disponibles: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (5).

➤ Aminoglucósidos

Están representados por un grupo de antibióticos caracterizados por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol.

Como se observa en la tabla 2, los aminoglucósidos se clasifican en familias según los aminoazúcares (62).

Tabla 2: Clasificación de los aminoglucósidos

Familias	Miembros
Estreptomicina	Estreptomicina
Kanamicina	Kanamicina Amicacina Tobramicina Dibekacina
Gentamicina	Gentamicina Netilmicina
Neomicina	Neomicina

En nuestro país los aminoglucósidos disponibles son: gentamicina, amicacina y estreptomicina para uso parenteral. La tobramicina se encuentra disponible en presentación para uso oftalmológico.

Generalmente los aminoglucósidos son activos frente a los estafilococos, a la mayoría de especies de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, e inactivos frente a las bacterias anaerobias. Los enterococos son moderadamente resistentes a la gentamicina y la estreptomicina. Su mecanismo de acción consiste en la unión de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica bacteriana. A pesar de los avances en el

conocimiento de la forma de actuar de estos antibióticos, el mecanismo último de la muerte de la bacteria (efecto bactericida) aún se desconoce, ya que no puede explicarse por la simple inhibición de la síntesis de las proteínas. Puede que el prolongado efecto post antibiótico que presentan los aminoglucósidos refuerce su capacidad bactericida (62).

➤ Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos; su mecanismo de acción se caracteriza por inhibir la síntesis de proteínas de las células procariotas y eucariotas, existiendo preferencia por las primeras. Son capaces de adherirse a la subunidad ribosómica 30 S. Bloquean la fijación del aminoacil ARNt al sitio receptor del complejo ARNm-ribosoma y, en consecuencia, la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (65).

Constituyen una familia de antibióticos de amplio espectro con actividad contra una extensa gama de especies Gram negativo y Gram positivo, micoplasmas, rickettsias y clamidias. En este grupo está incluido el compuesto madre tetraciclina, varios productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, demetilclortetraciclina) y una serie de derivados semisintéticos (doxiciclina, minociclina).

Lamentablemente, con el empleo exagerado de las tetraciclinas naturales se ha desarrollado un elevado nivel de resistencia, en especial dentro del ambiente hospitalario (66).

➤ Quinolonas

Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por un núcleo central 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas tienen clasificaciones diversas según diferentes libros o artículos. Una forma común de clasificación es en generaciones, encontrándose así (62):

- Las quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico y ácido pipemídico) tienen actividad sobre enterobacterias. Son inactivas sobre bacterias Gram positivo y anaerobias. Alcanzan concentraciones muy bajas en suero, su distribución sistémica es baja y solo se usan para casos de infecciones urinarias bajas.
- Las de segunda generación (norfloxacina y ciprofloxacina) son llamadas fluoradas, ya que incorporan un átomo de flúor y presentan mayor actividad sobre bacterias Gram negativo. La ciprofloxacina es la que mejor actividad tiene sobre *P. aeruginosa*. Tienen

una moderada actividad sobre bacterias Gram positivo, son activas sobre microorganismos atípicos y no presentan actividad sobre anaerobios.

- Las de tercera generación (levofloxacin, gatifloxacin) mantienen la actividad sobre bacterias Gram negativo y mejoran la actividad sobre bacterias Gram positivo. Es importante su acción sobre *Streptococcus* y especialmente sobre *S. pneumoniae*. Además tienen una muy buena actividad sobre microorganismos atípicos.
- Las de cuarta generación (moxifloxacin, trovafloxacin) mantienen actividad sobre microorganismos Gram negativo y aumentan la actividad sobre aquellos Gram positivo, especialmente *S. aureus* y *Enterococcus*. Además son activos sobre microorganismos anaerobios.

Se caracterizan por interactuar con dos sitios diferentes pero relacionados, dentro de la célula bacteriana: la ADN girasa y la topoisomerasa IV. La primera es más sensible a la acción de las quinolonas en caso de bacterias Gram negativo, mientras en los Gram positivo la más sensible es la topoisomerasa IV. Así, las quinolonas inhiben la síntesis de ADN y a concentraciones altas también la de ARN. Cuando interacciona con la ADN girasa, la inhibición ocurre rápidamente, mientras que cuando interacciona con la topoisomera IV la inhibición ocurre más lentamente. Este efecto es debido a la habilidad de las quinolonas de estabilizar los complejos de ADN y topoisomerasas II (62).

2.1 HIPÓTESIS

- Bacterias aisladas frecuentemente de infecciones superficiales en humanos y de mastitis bovina, poseen diferentes sensibilidades frente a antibióticos de uso frecuente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad de antibióticos con inóculo estandarizado, sobre bacterias aisladas de infecciones superficiales en humanos y mastitis bovina, mediante la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

2.2.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar los inóculos bacterianos correlacionando Absorbancia (Abs) con UFC/ml.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de diferentes antibióticos sobre bacterias Gram positivo y Gram negativo, aisladas de infecciones superficiales en humanos y de mastitis bovina mediante la técnica de difusión en pozo.

3.1 MATERIALES

3.1.1 Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos

Tabla 3: Cepas bacterianas

CEPA	ORIGEN
Bacterias Gram positivo	
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	Cepa de referencia ATCC 29212
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	Infección de tobillo (ambulatoria)
<i>Enterococcus faecalis</i> 3 y 4	Herida de piel infectada (ambulatoria)
<i>Enterococcus faecium</i>	Herida de piel infectada (intrahospitalaria)
<i>Micococcus luteus</i>	Cepa de referencia ATCC 9341
<i>Staphylococcus aureus</i> A,B,C,D,E,F,G,H,M	Mastitis bovina
<i>Staphylococcus aureus</i> MR1 y MR2	Leche de vacas con mastitis
<i>Staphylococcus aureus</i> MS1	Cepa de referencia ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> MS2	Leche de vacas con mastitis
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leche bovina
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1	Cepa de referencia ATCC 27956
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2 y 3	Mastitis bovina
<i>Streptococcus agalactiae</i> A, B, C, D, E	Mastitis bovina
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Mastitis bovina
<i>Streptococcus uberis</i>	Mastitis bovina
Bacterias Gram negativo	
<i>Enterobacter</i> sp.	Mastitis bovina
<i>Escherichia coli</i>	Agua de pozo
<i>Escherichia coli</i> A	Mastitis bovina
<i>Escherichia coli</i> B	Mastitis bovina
<i>Escherichia coli</i> E	Herida de cirugía (humano)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Compostaje de ave

3.1.2 Antibióticos

- **Gentamicina** (Sigma-Aldrich, 642 µg/mg en base seca).
- **Penicilina G** (Calbiochem, Pureza: 99,46 %, 1589 unidades de pG/mg).
- **Tetraciclina** (Sigma, 1004 µg de tetraciclina/mg).
- **Ácido nalidíxico** (Sigma).

3.1.3 Medios de cultivos

- **Agar Infusión Cerebro Corazón (ACC)**

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión corazón vacuno	250.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico	2.5
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.4 ± 0.2	

- **Caldo Infusión Cerebro Corazón con glicerol al 15%**

Fórmula (en gramos por 100 ml)	
Infusión de cerebro de ternera	20.0
Infusión corazón vacuno	25.0
Peptona	1.0
Cloruro de sodio	0.5
Glucosa	0.2
Fosfato disódico	0.25
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.4 ± 0.2	
Glicerol	15 ml

- **Caldo Infusión Cerebro Corazón (CCC)**

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión corazón vacuno	250.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico	2.5
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.4 ± 0.2	

- **Caldo Tripticasa Soya (CTS)**

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.5
Glucosa	2.5
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.3 ± 0.2	

- **Agar Tripticasa Soya (ATS)**

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.3 ± 0.2	

- **Agar Müeller Hinton (AMH)**

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de carne	300.0
Peptona ácida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7.3 ± 0.1	

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Conservación y propagación de cepas bacterianas

En el presente trabajo de tesis se utilizaron cepas bacterianas de colección de los laboratorios de Microbiología General y Genética Microbiana del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Cada una de las cepas bacterianas fueron aisladas mediante estrías por agotamiento en placas de Petri conteniendo ACC e incubadas a 37° C durante 24 horas. Posteriormente se realizó la tinción de Gram a cada una de las colonias aisladas, logrando de esta manera observar al microscopio óptico sus características morfológicas, tintoriales y pureza.

Las colonias bacterianas aisladas se repicaron en tubos que contenían ACC inclinado y se incubaron a 37° C por 24 horas. Al cabo de ese tiempo, los cultivos fueron conservados a 4° C y se repicaron en medio estéril ACC cada treinta días.

Para prolongar su tiempo de conservación, las cepas se mantuvieron en CCC más el agregado de glicerol al 15% en tubos Eppendorff a -18° C.

3.2.2 Preparación y estandarización del inóculo bacteriano

Con el propósito de evaluar la susceptibilidad de las cepas a los diferentes antibióticos, se utilizó un inóculo bacteriano estandarizado para todas las cepas en estudio a fin de poder realizar comparaciones de actividad antibacteriana. Se determinó la absorbancia para cada inóculo bacteriano con una densidad en el orden de $10^6 - 10^7$ UFC/ml, con la cual se logra un crecimiento confluyente, apropiado para visualizar los halos de inhibición del crecimiento (23). Esto es equivalente a utilizar el estándar 0,5 de la escala de McFarland (36).

Para ello, se realizó una siembra de cada bacteria a ensayar en tubos de hemólisis que contenían 2 ml de CTS. Los mismos fueron incubados en estufa a 37° C durante 18 horas, logrando así obtener los cultivos "overnight". Posteriormente, a partir de los mencionados cultivos se realizaron diluciones factor diez en CTS. A partir de cada una de las diluciones se tomó una alícuota y se procedió a la siembra en placa en superficie en ATS para realizar el recuento de colonias bacterianas; simultáneamente a cada dilución se le midió la Absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 h y posteriormente se realizó el recuento en aquellas que contenían entre 30 y 300 colonias. Así, para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos se utilizaron como inóculo las diluciones correspondientes a un recuento entre 10^6 y 10^7 UFC/ml.

3.2.3 Preparación de las soluciones de antibióticos

Se prepararon soluciones madres de cada uno de los antibióticos en agua destilada estéril, a una concentración de 1000 μ g/ml, de las cuales algunas fueron conservadas a 4° C y otras a -18° C, hasta su utilización.

Partiendo de cada solución madre de antimicrobiano se preparó una solución en agua destilada estéril cuya concentración final correspondió a 200 μ g/ml (4).

A partir de éstas soluciones se efectuaron diluciones factor dos en agua destilada estéril, las cuales fueron utilizadas en los ensayos de CIM (tabla 4). En algunas determinaciones fue necesario utilizar la solución madre de antibiótico correspondiente a 1000 μ g/ml.

Tabla 4: Concentraciones de antibióticos utilizadas

Dilución	Concentración de Antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)
SM	1000
P	200
1:2	100
1:4	50
1:8	25
1:16	12,5
1:32	6,2
1:64	3,1
1:128	1,5
1:256	0,75
1:512	0,38

Referencias. SM: Solución Madre; P: Pura

3.2.4 Análisis de la actividad antibacteriana

Técnica de difusión en pozo: Determinación de CIM de antibióticos

Sobre placas de Petri conteniendo AMH, previamente sembradas por el método de placa vertida con 200 μl de inóculo bacteriano, se realizaron orificios de 5 mm de diámetro en la superficie del agar, posteriormente se colocó 50 μl de las diferentes diluciones de los antibióticos, dejando reposar las placas sobre la mesada (temperatura ambiente) por 30 minutos aproximadamente para permitir la difusión de la alícuota. Luego, las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas (41). Finalizado este tiempo se procedió a la medición de los halos de inhibición del crecimiento. A partir de estos resultados se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), que corresponde a la mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir el desarrollo microbiano.

Aunque la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (41) indica la utilización de AMH adicionado con sangre de carnero al 5% para determinar la susceptibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, en el presente trabajo de tesis se utilizó ACC debido a que no fue posible adquirir el AMH adicionado con sangre de carnero al 5% en el laboratorio. Mediante la técnica de difusión en pozo se sembraron 100 μl de inóculo bacteriano sobre la superficie del agar y

fue esparcido con espátula de Drigalsky hasta su absorción total. Posteriormente se realizaron orificios de 5 mm de diámetro en la superficie del agar, sobre los cuales se adicionó 50 μ l de las diferentes diluciones de los antibióticos, dejando reposar las placas a temperatura ambiente por 30 minutos aproximadamente para permitir la difusión de la muestra. Luego, se incubaron a 37° C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la medición de los halos de inhibición del crecimiento determinándose la CIM para cada cepa bacteriana.

4.1 Preparación del inóculo bacteriano estandarizado utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana

La Tabla 5 muestra los recuentos (UFC/ml) para cada cepa bacteriana utilizada en el presente trabajo y sus respectivos valores de absorbancia; estos inóculos fueron utilizados posteriormente en los diferentes ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana de antibióticos de uso frecuente en humanos y animales. Como puede observarse para la mayoría de las bacterias, los recuentos entre 10^6 y 10^7 UFC/ml corresponden a la primera o segunda dilución decimal a partir del cultivo overnight (Figura 4).

Tabla 5: Estandarización del inóculo bacteriano de cada cepa a ensayar

Cepas bacterianas	Dilución	Absorbancia	UFC/ml
Cepas Gram positivo			
<i>Enterococcus faecalis 1</i>	10^{-1}	0,305	$9,2 \times 10^7$
<i>Enterococcus faecalis 2</i>	10^{-1}	0,244	$8,3 \times 10^6$
<i>Enterococcus faecalis 3</i>	10^{-1}	0,316	$1,5 \times 10^7$
<i>Enterococcus faecalis 4</i>	10^{-1}	0,288	$3,5 \times 10^7$
<i>Enterococcus faecium</i>	10^{-1}	0,227	$2,7 \times 10^7$
<i>Micrococcus luteus</i>	10^{-1}	0,025	$5,9 \times 10^6$
<i>Staphylococcus aureus MS1</i>	10^{-1}	0,211	$3,8 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus MS2</i>	10^{-1}	0,237	$4,9 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus MR1</i>	10^{-2}	0,121	$1,1 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus MR2</i>	10^{-1}	0,322	$1,3 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus A</i>	10^{-2}	0,032	$3,4 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus B</i>	10^{-2}	0,028	$2,5 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus C</i>	10^{-2}	0,024	$1,5 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus D</i>	10^{-1}	0,140	$3,2 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus E</i>	10^{-1}	0,153	$3,5 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus F</i>	10^{-1}	0,262	$5,8 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus G</i>	10^{-1}	0,190	$3,9 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus H</i>	10^{-2}	0,026	$1,8 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus M</i>	10^{-1}	0,119	$1,9 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus O</i>	10^{-1}	0,202	$4,1 \times 10^7$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10^{-1}	0,388	$2,7 \times 10^7$

<i>Streptococcus agalactiae</i> 1	10^{-1}	0,224	$6,3 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2	10^{-2}	0,035	$1,4 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> 3	10^{-1}	0,200	$5,9 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> A	10^{-1}	0,242	$5,4 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> B	10^{-1}	0,246	$7,6 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> C	10^{-1}	0,235	$6,5 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> D	10^{-2}	0,047	$2,3 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i> E	10^{-2}	0,077	$3,1 \times 10^7$
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> A	10^{-1}	0,283	$7,4 \times 10^7$
<i>Streptococcus uberis</i>	10^{-1}	0,224	3×10^7
<i>Streptococcus uberis</i> A	10^{-1}	0,594	$3,3 \times 10^7$
<i>Streptococcus uberis</i> B	10^{-1}	0,688	$2,5 \times 10^7$
Bacterias Gram negativo	Dilución	Absorbancia.	UFC/ml
<i>Enterobacter spp.</i>	10^{-1}	0,050	$1,6 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i>	10^{-1}	0,423	$2,4 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i> A	10^{-1}	0,110	$3,8 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i> B	10^{-1}	0,126	$4,6 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i> E	10^{-1}	0,099	$2,9 \times 10^6$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10^{-1}	0,451	$4,5 \times 10^7$

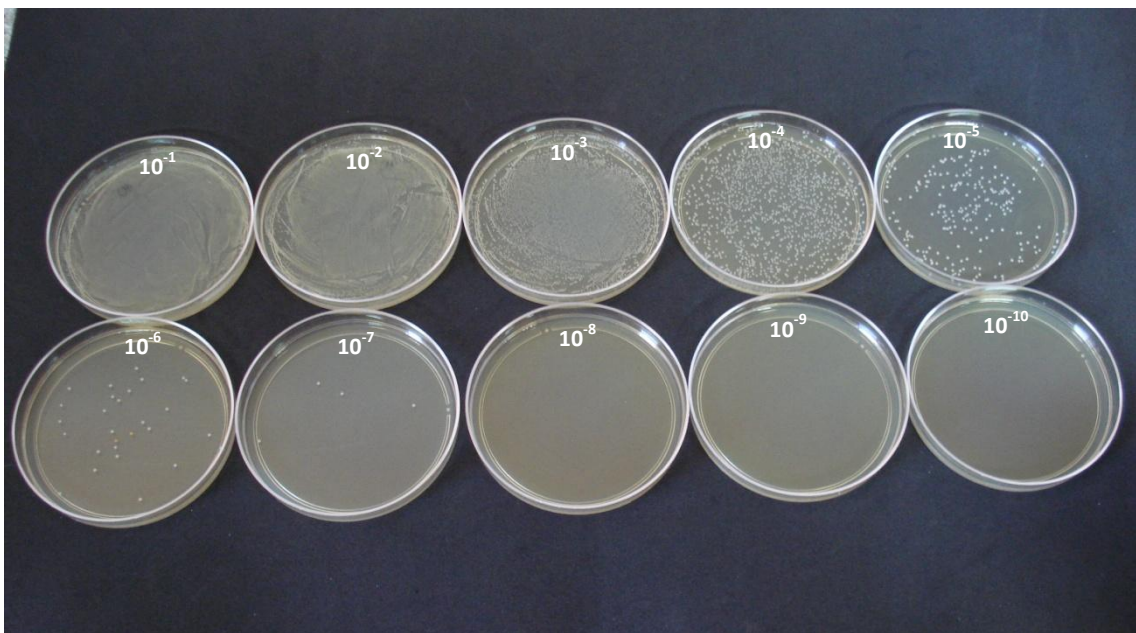


Figura 4: Recuento de colonias de *Staphylococcus epidermidis*

4.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

En una primera etapa de la fase experimental, con el fin de adquirir manejo de las técnicas utilizadas comúnmente en el laboratorio de microbiología, se prepararon 39 inóculos bacterianos; mientras que la determinación de la mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir el desarrollo microbiano (CIM) se realizó a partir de 11 de ellos, seleccionados al azar.

Partiendo así de un grupo más reducido de cepas bacterianas y considerando antecedentes bibliográficos (4), se seleccionaron los antibióticos y las concentraciones adecuadas para los ensayos *in vitro*, obteniéndose los resultados siguientes:

Las tablas 6, 7 y 8 resumen los resultados de la actividad antibacteriana de gentamicina, penicilina y tetraciclina, respectivamente; en ellas se describe el promedio de los diámetros (en milímetros) de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de cepas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y mastitis bovina.

Cabe destacar que en dichas tablas los valores de las CIM para cada cepa Gram positivo se resalta con color violeta.

Tabla 6: Actividad antibacteriana de gentamicina sobre cepas bacterianas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$)								
	1000	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6
<i>E. faecalis</i> 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> D	ND	16,7	14	12,7	9,3	6	-	-	-
<i>S. aureus</i> MR1	ND	22,2	18	16	12	10	8,3	-	-
<i>S. aureus</i> MR2	ND	22	18,3	14,7	11,7	8,7	5,7	-	-
<i>S. epidermidis</i>	ND	18	16	14	11,3	8,7	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> A	ND	15,3	12,7	10	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae</i> D	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias. ND: No determinado; - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

Las cepas bacterianas que presentaron mayor resistencia, es decir que fueron capaces de desarrollar a las concentraciones más altas ensayadas de gentamicina (1000 µg/ml) fueron *Enterococcus faecalis* 2, 3 y 4. Otros investigadores observaron un alto porcentaje de resistencia a gentamicina en cepas de *E. faecalis* aisladas de bacteriemia en el hombre, correspondiente a un 84,2 % de un total de 168 aislamientos (20). Es importante recordar que los enterococos son moderadamente resistentes a dicho antibiótico (62).

En cuanto a los microorganismos del género *Streptococcus*, cabe destacar que, *S. agalactiae* D mostró ser más resistente a este agente antimicrobiano que *S. agalactiae* A, siendo sus CIM 1000 µg/ml y 50 µg/ml, respectivamente (Figura 5: A y B).

Tanto SARM1 y SARM2 mostraron CIM de 6,2 µg/ml. Ambas cepas fueron más sensibles que *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* D, ya que para estas últimas la concentración mínima de gentamicina necesaria para inhibir el desarrollo resultó ser de 12,5 µg/ml.



Figura 5-A: Actividad antibacteriana de gentamicina por técnica de difusión en pozo frente a *Streptococcus agalactiae* A.

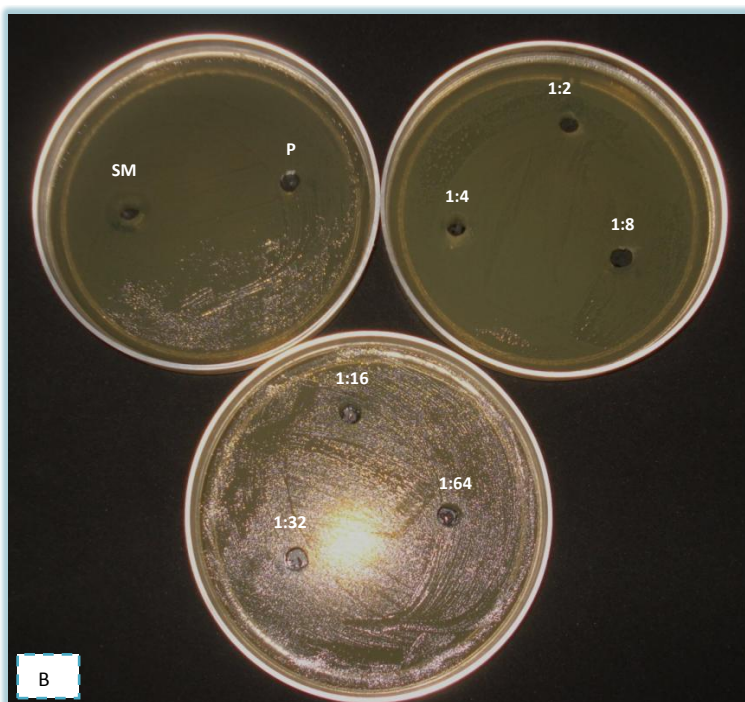


Figura 5-B: Actividad antibacteriana de gentamicina por técnica de difusión en pozo frente a *Streptococcus agalactiae D.*

Referencias: SM = 1000 µg/ml; P = 200 µg/ml; 1:2 = 100 µg/ml; 1:4 = 50 µg/ml; 1:8 = 25 µg/ml; 1:16 = 12,5 µg/ml; 1:32 = 6,2µg/ml; 1:64= 3,1 µg/ml.

Tabla 7: Actividad antibacteriana de penicilina G sobre cepas bacterianas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de penicilina G (µg/ml)									
	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8	0,4
<i>E. faecalis 2</i>	24	20,7	18	14	8,7	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis 3</i>	26	21,3	16,7	10,7	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis 4</i>	22	18	11,3	8,7	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus D</i>	36	34	32	29,3	27,3	22	20	12	-	-
<i>S. aureus MR1</i>	38	34,3	32	28,3	22	18,7	11,3	-	-	-
<i>S. aureus MR2</i>	37,3	34	30,3	28	18,7	13,3	8,3	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	32	28	24,6	22,3	20	18	15,7	9,3	-	-
<i>S. agalactiae A</i>	11,3	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae D</i>	25,3	21,3	16,7	11,3	-	-	-	-	-	-

Referencias. - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

En referencia a la CIM de penicilina G, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* D, mostraron menor resistencia frente al mencionado antibiótico (Figura 6). Esto se evidencia al observar los valores de CIM alcanzados que son inferiores al compararlos con el resto de las cepas Gram positivo evaluadas en iguales condiciones. Vale destacar que dos de los tres *S. aureus* ensayados tienen la particularidad de ser cepas Meticilino-Resistentes (SARM). Las cepas SARM arrojaron un valor de CIM 3,1 µg/ml.

La mayoría de las investigaciones referidas al estudio de los antibióticos empleados en este trabajo de tesis sobre las mismas cepas bacterianas, utilizan otras metodologías tales como técnica de difusión en disco (17; 14; 50), técnica de difusión en tubo (48) y microdilución en caldo (8; 51). Por lo tanto, los resultados obtenidos por medio de la técnica de difusión en pozo no serían comparables con ellos.

Streptococcus agalactiae A fue el agente bacteriano más resistente a este antibiótico, cuya CIM corresponde a una concentración de 100 µg/ml.

La mínima concentración de penicilina G utilizada en el presente estudio para lograr inhibir el crecimiento de *Enterococcus faecalis* 3 y 4, y de *Streptococcus agalactiae* D, correspondió a 25 µg/ml. *Enterococcus faecalis* 2 mostró una resistencia menor con respecto al resto de las cepas del género *Enterococcus* ensayadas, ya que su CIM resultó ser de 12,5 µg/ml.

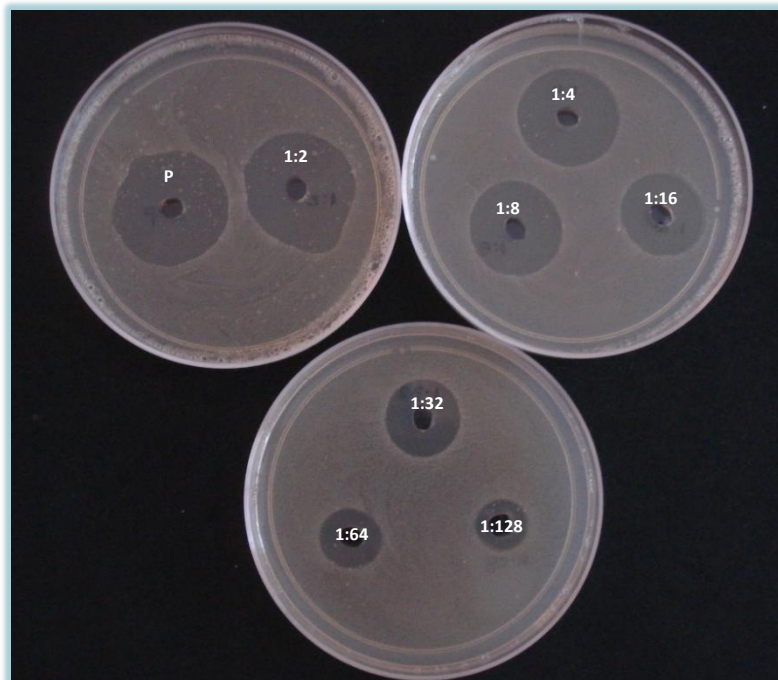


Figura 6: Actividad antibacteriana de penicilina G por técnica de difusión en pozo frente a *Staphylococcus epidermidis*.

Referencias: P = 200 µg/ml; 1:2 = 100 µg/ml; 1:4 = 50 µg/ml; 1:8 = 25 µg/ml; 1:16 = 12,5 µg/ml; 1:32 = 6,2 µg/ml; 1:64 = 3,1 µg/ml; 1:128 = 1,6 µg/ml.

Tabla 8: Actividad antibacteriana de tetraciclina sobre cepas bacterianas Gram positivo aisladas de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de tetraciclina ($\mu\text{g/ml}$)								
	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8
<i>E. faecalis 2</i>	28	24,7	21,3	16,7	14,3	10,7	-	-	-
<i>E. faecalis 3</i>	26,3	20,7	18	14,3	12	-	-	-	-
<i>E. faecalis 4</i>	31,3	20,1	18	12,7	7,3	-	-	-	-
<i>S. aureus D</i>	21,3	18	14	9,7	-	-	-	-	-
<i>S. aureus MR1</i>	25,3	23	19,7	12,7	8,7	-	-	-	-
<i>S. aureus MR2</i>	26	24	18,3	13,3	8	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	25	20,7	18	16,3	10,7	-	-	-	-
<i>S. agalactiae A</i>	22	17	10,7	-	-	-	-	-	-
<i>S. agalactiae D</i>	16,3	11,3	-	-	-	-	-	-	-

Referencias. - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

A pesar de que existen diferencias no muy marcadas, las cepas más sensibles fueron las pertenecientes al género *Enterococcus*, ya que la concentración de tetraciclina mínima con la cual se observó inhibición del desarrollo es menor comparada con la obtenida para los agentes bacterianos pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, respectivamente (Figura 7: A y B).

En lo que respecta al ensayo realizado sobre las dos cepas bacterianas de *Streptococcus agalactiae*, A y D, es importante marcar la diferencia de valores de CIM, resultando ser más resistente *S. agalactiae D*, cuyo valor de CIM es 100 $\mu\text{g/ml}$, comparándolo con 50 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa A.

En cuanto a las diferentes cepas de *Staphylococcus*, *S. aureus D* fue inhibido con un valor de CIM de tetraciclina de 25 $\mu\text{g/ml}$, mayor al obtenido para las otras cepas del género ensayadas.

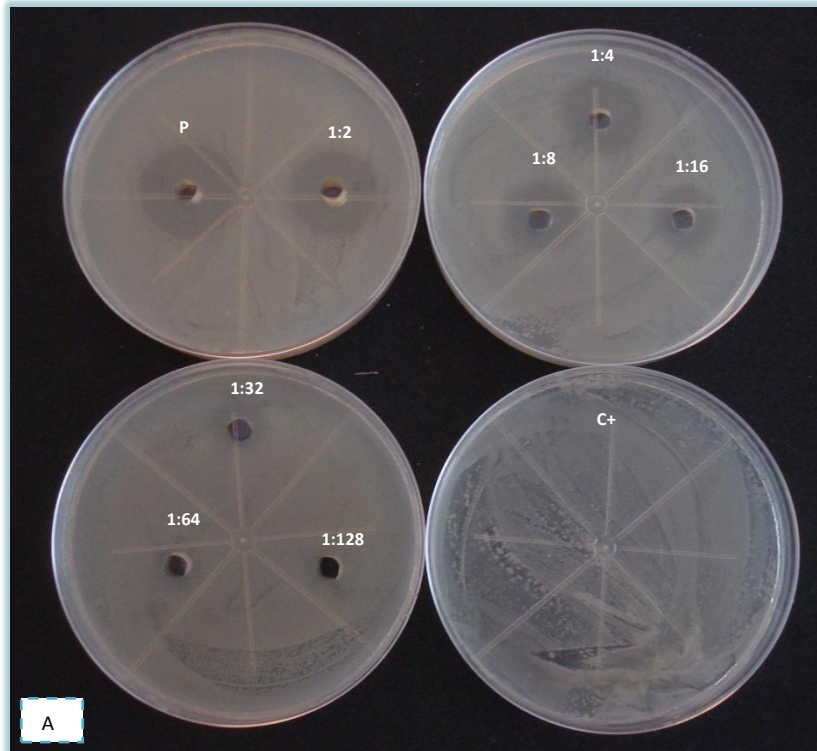


Figura 7-A: Actividad antibacteriana de tetraciclina por técnica de difusión en pozo frente a *Enterococcus faecalis* 3.



Figura 7-B: Actividad antibacteriana de tetraciclina por técnica de difusión en pozo frente a *Enterococcus faecalis* 4.

Referencias: P = 200 $\mu\text{g/ml}$; 1:2 = 100 $\mu\text{g/ml}$; 1:4 = 50 $\mu\text{g/ml}$; 1:8 = 25 $\mu\text{g/ml}$; 1:16 = 12,5 $\mu\text{g/ml}$; 1:32 = 6,2 $\mu\text{g/ml}$; 1:64 = 3,1 $\mu\text{g/ml}$; 1:128 = 1,6 $\mu\text{g/ml}$; C+= control positivo.

Con el empleo exagerado de las tetraciclinas naturales se ha desarrollado un elevado nivel de resistencia, en especial dentro del ambiente hospitalario. Las bacterias son capaces de desarrollar resistencia, siendo uno de los mecanismos la menor permeabilidad frente al antibiótico (66).

Dentro de las bacterias Gram negativo que pueden causar infecciones superficiales y mastitis bovina existen dos grupos: los coliformes y los no coliformes. Con respecto a los primeros, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, y *Klebsiella* spp., son responsables de aproximadamente la mitad de los casos de mastitis clínicas agudas, mientras que, dentro de los no coliformes, *Pseudomonas* spp. y *Serratia* spp., están más comúnmente asociados con infecciones intramamarias (34). Después del parto las infecciones por *E. coli* a menudo causan síntomas clínicos severos acompañados por cambios en la composición de la leche y daño extenso del tejido mamario (11; 33; 61).

En las siguientes tablas (9, 10 y 11) se detallan los resultados de la actividad antibacteriana de gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico, respectivamente; se muestra el promedio de los diámetros, en milímetro, de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas Gram negativo aisladas de infecciones superficiales en humanos y de mastitis bovina.

Cabe resaltar que en dichas tablas los valores de las CIM de cada cepa Gram negativo se muestran en los recuadros de color violeta.

Tabla 9: Actividad antibacteriana de gentamicina sobre cepas bacterianas Gram negativo aislados de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de gentamicina ($\mu\text{g/ml}$)								
	1000	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6
<i>E. coli</i> A	22	18	15,3	14	12	10	-	-	-
<i>E. coli</i> E	15	11,3	-	-	-	-	-	-	-

Referencias. - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

Tabla 10: Actividad antibacteriana de tetraciclina sobre cepas bacterianas Gram negativo aislado de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de tetraciclina ($\mu\text{g/ml}$)								
	1000	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6
<i>E. coli</i> A	ND	25,3	21,3	14,7	12	-	-	-	-
<i>E. coli</i> E	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias. ND: No determinado; - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

Tabla 11: Actividad antibacteriana de ácido nalidíxico sobre cepas bacterianas Gram negativo aislados de infecciones superficiales en el hombre y de mastitis bovina.

Cepa bacteriana	Concentración de ácido nalidíxico ($\mu\text{g/ml}$)								
	1000	200	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6
<i>E. coli</i> A	16	12	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> E	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias. - ausencia de halo de inhibición. Los valores expresan el promedio de halos de inhibición del crecimiento en milímetros.

A partir de las tabla 9, 10 y 11 se puede inferir que ambas cepas del género *Escherichia* evaluadas no presentan las mismas características frente a los antibióticos gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico. Es así, que *E. coli* E resultó ser más resistente que *E. coli* A. Esto se evidencia al comparar los valores de CIM de cada cepa para cada antibiótico.

En el caso de la cepa *E. coli* A, los valores de CIM obtenidos fueron 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$, para gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico, respectivamente (Figura 8).

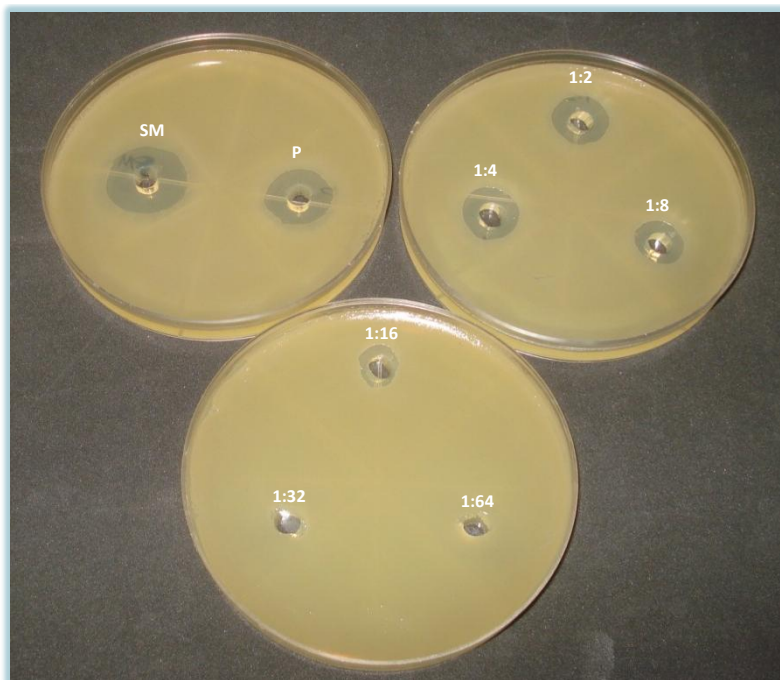


Figura 8: Actividad antibacteriana de gentamicina por técnica de difusión en pozo frente a *Escherichia coli* A.

Referencias: SM = 1000 $\mu\text{g/ml}$; P = 200 $\mu\text{g/ml}$; 1:2 = 100 $\mu\text{g/ml}$; 1:4 = 50 $\mu\text{g/ml}$; 1:8 = 25 $\mu\text{g/ml}$; 1:16 = 12,5 $\mu\text{g/ml}$; 1:32 = 6,2 $\mu\text{g/ml}$; 1:64 = 3,1 $\mu\text{g/ml}$.

Para la cepa bacteriana *E. coli* E, la gentamicina fue el único antibiótico con el que se pudo inhibir el crecimiento bacteriano, resultando ser de 200 $\mu\text{g/ml}$ la CIM. Los aminoglucósidos son activos frente a la mayoría de especies de las familias *Enterobacteriaceae* (62). En cambio, tanto para tetraciclina como para ácido nalidíxico, el microorganismo resultó ser resistente,

haciéndose evidente por el crecimiento del mismo a todas las concentraciones de los antibióticos probadas (Figura 9: A, B, C). Estos datos concuerdan con los informados por Pantozzi y col., (2010) quienes determinaron la presencia de resistencia a diversos antimicrobianos en bacterias indicadoras tales como *E. coli*, *Enterococcus* spp., entre otras, aisladas de animales de campo. Estos investigadores reportaron una elevada resistencia de dichas cepas a tetraciclina y ácido nalidíxico (45).

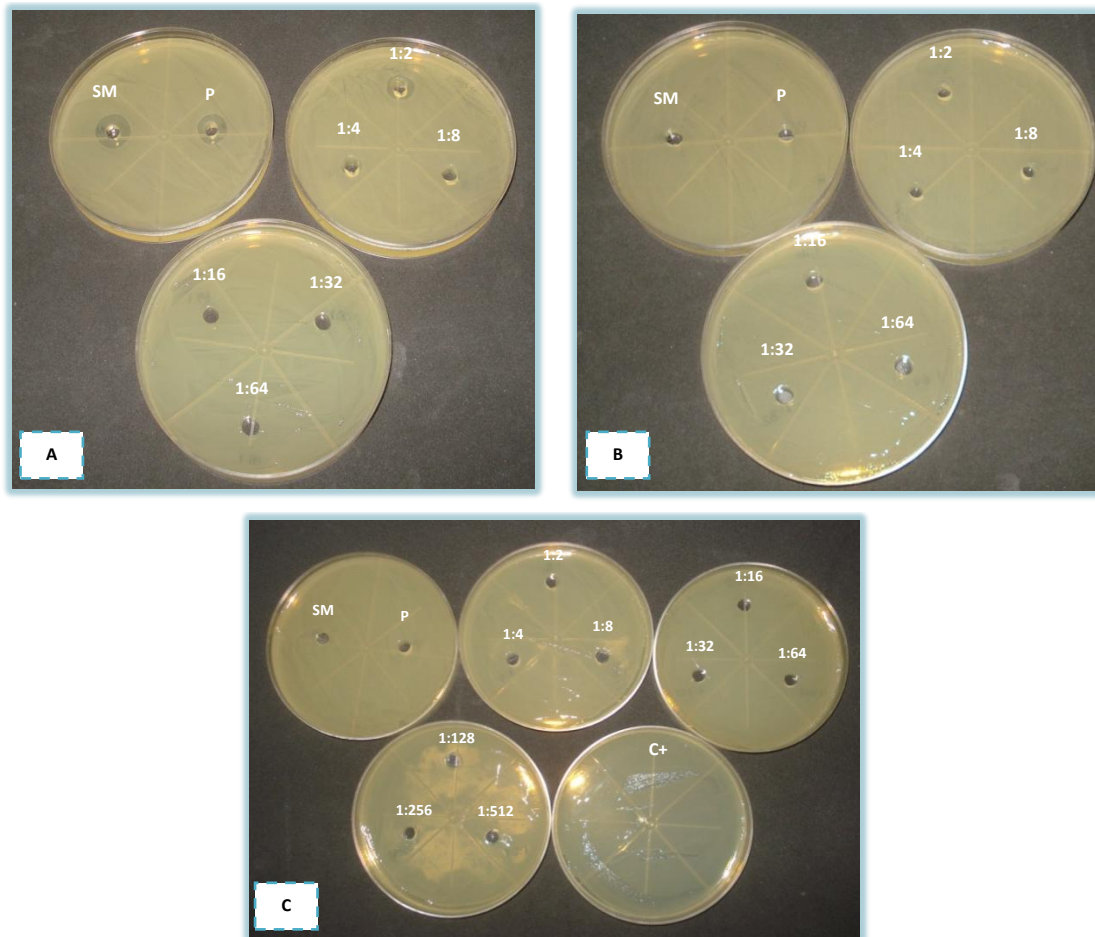


Figura 9: Actividad antibacteriana de Gentamicina (A), Ácido nalidíxico (B) y Tetraciclina (C) por técnica de difusión en pozo frente a *Escherichia coli* E.

Referencias: SM = 1000 µg/ml; P = 200 µg/ml; 1:2 = 100 µg/ml; 1:4 = 50 µg/ml; 1:8 = 25 µg/ml; 1:16 = 12,5 µg/ml; 1:32 = 6,2 µg/ml; 1:64 = 1,6 µg/ml; 1:128 = 0,8 µg/ml; 1:256 = 0,4 µg/ml; 1:512 = 0,2 µg/ml; C+= Control positivo.

La actividad de los antimicrobianos frente a las bacterias sólo tiene carácter orientador, dado que la susceptibilidad de las cepas depende de variados factores, siendo los más importantes, la concentración y acción del antibiótico en el sitio de infección (9).

La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza cada vez mayor, tanto en medicina humana como veterinaria, ya que el uso indiscriminado de los antibióticos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionando, en

algunos casos, fracaso terapéutico e incluso puede llegar a causar la muerte del hombre y/o animal (53; 55).

Comparando los resultados obtenidos para los diferentes grupos bacterianos ensayados se puede decir que cada uno de ellos presentó variabilidad con respecto a sus CIM con los distintos antibióticos probados.

En el gráfico 1 se observan las CIM de gentamicina, penicilina y tetraciclina sobre las cepas Gram positivo estudiadas.

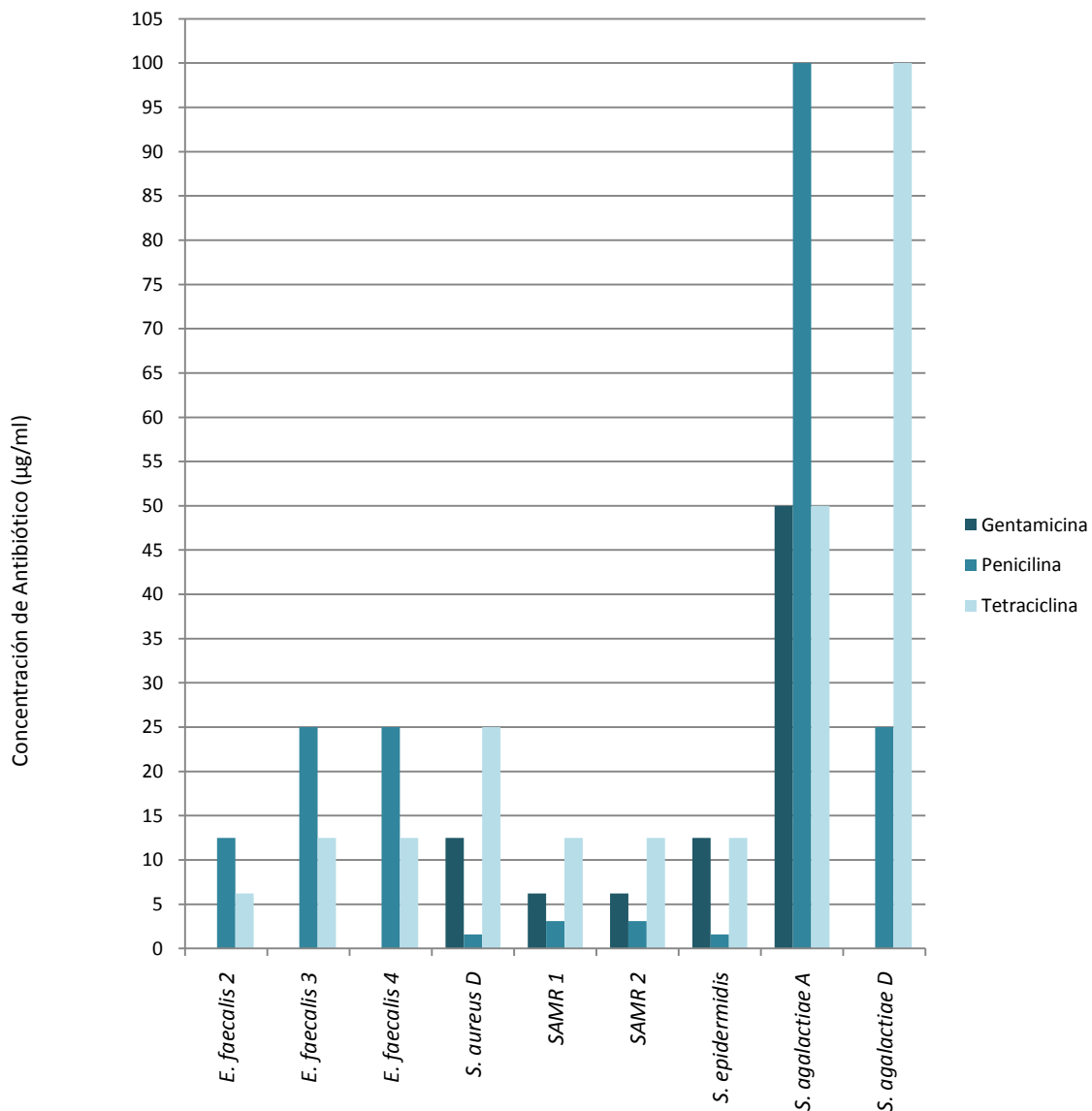


Gráfico 1: CIM de gentamicina, penicilina G y tetraciclina sobre las cepas Gram positivo

En Argentina han sido reportados distintos tipos de microorganismos causantes de mastitis bovina, dentro de los cuales *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más frecuentemente aislado (50). Cabe destacar que todas las cepas del género *Staphylococcus* ensayadas resultaron ser más sensibles a penicilina que a los demás antibióticos, ya que los valores de CIM obtenidos para este antimicrobiano fueron los menores. La CIM de penicilina para ambas cepas SARM fue mayor que las correspondientes a *S. epidermidis* y *S. aureus* D. Asimismo, las tres cepas de *S. aureus* resultaron más resistentes a tetraciclina que a gentamicina. La diferencia de CIM entre ambos antibióticos es del 50 %.

La cepa de *S. epidermidis* ensayada presentó el mismo valor de CIM para gentamicina y tetraciclina.

Los enterococos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de las personas sanas, y pueden colonizar heridas de tejido blando tanto en personas ambulantes como en pacientes hospitalizados. Muchos estudios han demostrado el cambio en la resistencia a antibióticos por parte de estos microorganismos. En la actualidad, muchas cepas de *Enterococcus* muestran alto nivel de resistencia a varios fármacos, siendo los más importantes estreptomina y gentamicina (60). En este análisis tanto penicilina G como tetraciclina fueron capaces de inhibir el crecimiento de las tres cepas de *Enterococcus faecalis* ensayadas. Puede observarse que los valores de CIM son idénticos para las cepas de *E. faecalis* 3 y 4. A su vez, para todos, resulta ser más eficaz tetraciclina. Gentamicina no fue capaz de inhibir el desarrollo bacteriano de las cepas de *Enterococcus*, aún a la máxima concentración probada.

Las infecciones superficiales menores causadas por cocos Gram positivo pueden responder a la incisión y drenaje o sólo requieren un antibiótico oral como tetraciclina, clindamicina o trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), para poder eliminar dichos patógenos (26).

S. agalactiae es un agente etiológico de la mastitis bovina mundialmente reconocido, causando tanto mastitis subclínica como clínica de larga duración (35; 21). Las células bacterianas son transferidas en la leche de cuartos infectados a cuartos no infectados y a otras vacas por lo general durante el período de ordeño (27; 38). Para *S. agalactiae* A, los antibióticos gentamicina y tetraciclina presentaron igual CIM; mientras que para penicilina se requiere el doble de la concentración de antimicrobiano, para producir un efecto inhibitorio sobre dicho agente bacteriano. Para el caso de *S. agalactiae* D, gentamicina resultó ser el

agente antibacteriano con menor actividad, seguido de tetraciclina, resultando ser la penicilina G el antimicrobiano más eficaz.

Es importante destacar que la penicilina es el principal antibiótico utilizado para el tratamiento de mastitis bovina producida por bacterias Gram positivo (22) y la principal resistencia a la misma por *S. aureus* está mediada por la producción de β -lactamasas (8).

Para el caso de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* ensayadas, se puede destacar que la cepa *Escherichia coli* E presentó mayor resistencia debido a que los valores de CIM para cada antibiótico fueron mayores que los de la cepa *E. coli* A. El motivo de la diferencia en los valores de CIM puede deberse al origen de las cepas, siendo *E. coli* A de origen animal (mastitis bovina) y *E. coli* E de origen humano (herida de cirugía).

En el gráfico 2 se representan las CIM de gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico sobre las cepas Gram negativo estudiadas.

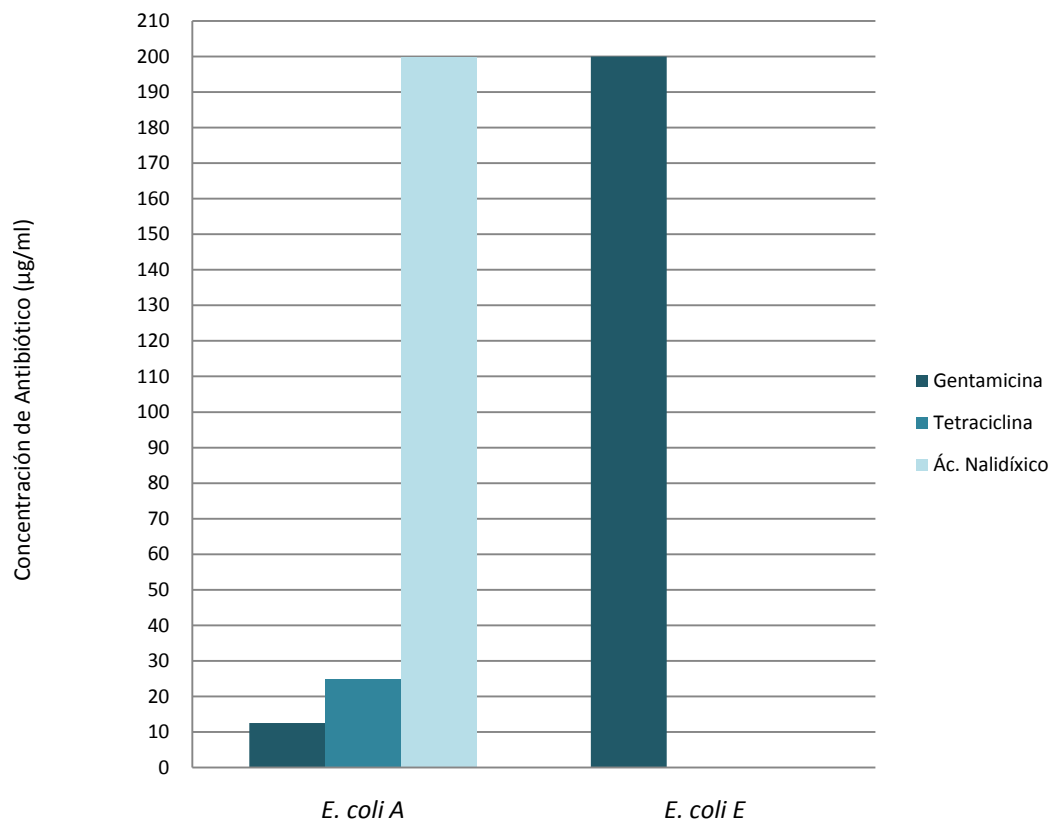


Gráfico 2: CIM de gentamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico sobre las cepas Gram negativo

Los diferentes valores de CIM a los distintos antibióticos ensayados en este trabajo son explicables ya que el CIM se considera una respuesta individual de cada cepa y no de la especie. El mantenimiento de altos niveles de sensibilidad a distintos antimicrobianos y la vigilancia de la aparición de resistencia en el tiempo y en diferentes localidades geográficas adquiere vital importancia en el caso de Medicina Veterinaria. El patrón de sensibilidad a distintos antibióticos puede ser diferente para localidades geográficas distintas, aunque sean vecinas (9).

El monitoreo de la resistencia por sí solo no provee la información suficiente para una intervención bien dirigida hacia el control de este problema, ya que se requiere información detallada tanto sobre la generación de resistencia como sobre el uso que se hace de los distintos antimicrobianos. Además, orienta la elección terapéutica pero no asegura el éxito de la misma ya que deben considerarse además las interrelaciones con el ambiente interno del hospedero. La tendencia actual aconseja usar antimicrobianos de espectro reducido, sobre todo aquellos que son de primera línea de elección en infecciones graves en medicina humana (9).

- La susceptibilidad a los antibióticos de uso frecuente sobre las cepas analizadas fue variada para los diferentes géneros bacterianos.
- Gentamicina tuvo mayor efecto antibacteriano sobre las cepas *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (MR1 y MR2) de origen bovino, comparadas con el resto de las bacterias Gram positivo aisladas de bovinos y de infecciones superficiales en el hombre.
- Las cepas bacterianas que presentaron mayor resistencia a gentamicina fueron *Enterococcus faecalis* 2, 3 y 4, de origen humano, ya que las CIM para cada microorganismo no se pudo determinar aún con la concentración más alta de antibiótico ensayada.
- *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* D, de origen bovino, fueron las bacterias Gram positivo más sensibles *in vitro* a la actividad antibacteriana de penicilina G.
- Las cepas correspondientes al género *Enterococcus* de origen humano resultaron ser más sensibles a tetraciclina debido a que los valores de CIM obtenidos fueron menores al compararlos con los logrados por las cepas del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* de origen animal.
- Para *Streptococcus agalactiae* A, cepa aislada de mastitis bovina, se obtuvo igual valor de CIM para los antibióticos gentamicina y tetraciclina; mientras que para penicilina G se requirió el doble de la concentración de antimicrobiano para producir un efecto inhibitorio sobre dicho agente bacteriano.
- La sensibilidad a gentamicina, tetraciclina y ácido nalidixico por parte de las cepas del género *Escherichia* fueron diferentes, resultando ser *E. coli* E, aislada de una infección humana, más resistente debido a que los valores de CIM obtenidos fueron superiores a los de *E. coli* A de origen bovino.
- Los diferentes valores de CIM a los distintos antibióticos ensayados en este trabajo son explicables ya que la CIM se considera una respuesta individual de cada cepa y no de la especie.

- **1. Almeida, R. A.; Mathews, K. R.; Cifrian, E.; Guidry, A. J.; Oliver, S. P. (1996).** *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science. 79: 1021-1026.
- **2. Altoparlak, U.; Aktas, F.; Selebi, D.; Ozkurt, Z.; Akcay, M. (2005).** Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 31: 707-710.
- **3. Andresen, H. S. (2001).** Mastitis: prevención y control. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 12(2): 55-64.
- **4. Andrews, J. M. (2001).** Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 48 (1): 5-16.
- **5. Barcelona, L.; Marin, M.; Stambouljan, D. (2008).** Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas. Amoxicilina-sulbactam. Fundación revista Medicina. Buenos Aires, Argentina. 68 (1).
- **6. Barkema, H. W.; Schukken, Y. H.; Lam, T. J. G. M.; Beiboer, M.L.; Wilmink, H.; Benedictus, G.; Brand, A. (1998).** Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. Journal of Dairy Science. 81: 411–419.
- **7. Basualdo, J. A., Coto, C. E.; de Torres, R. A. (1996).** Microbiología Biomédica. Editorial: Atlante S.R.L. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 17, pp 249-251.
- **8. Bengtsson, B.; Unnerstad, H. E.; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson-Ost, M.; Waller, K. P. (2009).** Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Veterinary microbiology. 136: 142-149.
- **9. Betancourt, O.; Scarpa, C.; Villagrán, Y. (2003).** Estudio de resistencia de cepas de *staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 8 (5): 413-417.
- **10. Boggio, J.C.; Díaz David, D.; Fernández, H.; Litterio, N.; Picco, E.; Rubio, M. (2005).** Farmacología Veterinaria. Editorial de la Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina. Capítulo 40: Introducción a los antimicrobianos. pp 435-454.
- **11. Burvenich, C.; Van Merris, V.; Mehrzad, J.; Diez-Fraile, A.; Duchateau, L. (2003).** Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Veterinary Research. 34(5):521-564.
- **12. Burvenich, C.; Monfardini, E.; Mehrzad, J.; Capuco, A.V.; Paape, M.J. (2004).** Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis:

- physiology or pathology. *Verhandelingen Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van Belgie*. 66: 97–150.
- - **13. Calderon, A.; Rodriguez, V. C. (2008).** Prevalence of bovine mastitis and its infectious etiology in specialized milk production systems at cundiboyacense plane (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21: 582-589.
 - **14. Calvino, L. F.; Toselli, F. G.; Weimann, W. R.; Canavesio, V. R.; Neder, V. E.; Iguzquiza, I. A. (2002).** Susceptibilidad a antibióticos de cepas de estafilococos coagulasa positivos aisladas de mastitis bovina en la cuenca lechera central de la Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 34: 171-175.
 - **15. Calvino, L. F.; Tirante L. (2005).** Prevalencia de microorganismos patógenos de Mastitis Bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE, sección Ciencias Veterinarias* (4) 1-12.
 - **16. Calvino, L. (2007).** Control de mastitis causadas por estreptococos ambientales. *Jornada APROCAL*: 1-11.
 - **17. Chrystal, J. L. (2002).** Estudio de susceptibilidad in vitro de *Enterococcus* spp. *Revista chilena de Infectología*, 19(2):111-115.
 - **18. Chomnawang, M.; Surassmo, S.; Wongsariya, K.; Bunyapraphatsara, N. (2009).** Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 80: 102-104.
 - **19. Cruz, C. A.; Estepa, C. E.; Hernández L.J.J.; Sanabria, V. J. P. (2007).** Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. *Actualidad y Divulgación Científica*. 1: 81-91.
 - **20. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. (2007).** Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: A report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58: 163–70.
 - **21. Dmitriev, A.; Shakleina, E.; Tkacikova, L.; Mikula, I.; Totolian, A. (2002).** Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. *Journal of Veterinary Medical*. 47: 291–295.
 - **22. Ekman, T.; Astrom, G.; Funke, H. (1994).** Mesuares taken by veterinarians in Sweden in cases of bovine mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 35: 329-335.
 - **23. García, M.; Finola, M.; Marioli, J. (2010).** Antibacterial activity of royal jelly against bacteria capable of infecting cutaneous rounds. *Journal of ApiProducts and ApiMedical Science*. 2(3): 93-99.

- **24. Gentillini, E.; Denamile, G.; Godaly, M. S. (1995).** Mastitis bovina: Tipificación del género *Staphylococcus*. Revista Veterinaria Argentina. 12: 384-386.
- **25. Glauber, C. E. (2007).** Mastitis: hasta cuando y hacia donde. Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.
- **26. Gould, I. M. (2009).** Antibiotics, skin and soft tissue infection and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cause and effect. International Journal of Antimicrobial Agents 34, (1): 8–11.
- **27. Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V. (2001).** Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Advanced Drug Delivery Reviews. 50: 245–259.
- **28. Guérin-Faublée, V.; Tardy, F.; Bouveron, C.; Carret, G. (2001).** Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. International Journal of Antimicrobial Agents 19: 219–226.
- **29. Gunay, A.; Gunay, U. (2008).** Effects of Clinical Mastitis on Reproductive Performance in Holstein Cows. Acta Veterinaria Brunensis. 77: 555-560.
- **30. Halcón, L.; Milkus, K. (2004).** *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. American Journal of Infection Control. 32, 402-408.
- **31. Heinrichs, A. J.; Costello, S. S.; Jones, C. M. (2009).** Control of heifer mastitis by nutrition. Veterinary Microbiology 134: 172–176.
- **32. Heringstad, B.; Klemetsdal, G.; Ruane, J. (2000).** Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. Livestock Production Science. 64:95-106.
- **33. Hill, A. W. (1994).** *Escherichia coli* mastitis. Centre for Agricultural Bioscience International. Wallingford, United States. 117:133
- **34. Hogan, J.; Smith, K. L. (2003).** Coliform mastitis. Veterinary Research. 34: 507–519.
- **35. Keefe, G. P. (1997).** *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Canadian Veterinary Medical Association. 38: 429–437.
- **36. Koneman, E. (1999).** Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, 5ta edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 15: Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos. pp. 763-832.
- **37. Koneman, E. (2006).** Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, 6^{ta} edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 2: Introducción a la microbiología. pp. 66-108.

- **38. Lammers, A.; Van Vorstenbosch, C. J.; Erkens, J. H. F.; Smith, H. E. (2001).** The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Veterinary Microbiology*. 80: 255–265.
- **39. Merl, K.; Abdulmawjood, A.; Lämmler, C.; Zschöck, M. (2003).** Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters* 226: 87-92.
- **40. Nasser, S.; Mabrouk, A.; Maher, A. (2003).** Colonization of burn wounds in Ain Shams University Burn Unit. *Burns*. 29 (3): 229-233.
- **41. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved standard (M2-A8) Wayne. PA: NCCLS.
- **42. National Mastitis Council (2004).** Microbiological Procedures for Use in the Diagnostics of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. National Mastitis Council, 4th. Edition. Madison, United States of America.
- **43. Osteras, O. (2006).** Mastitis epidemiology practical approaches and applications. XXIV World Buiatrics Congress. Nice, France. 14.
- **44. Paape, M.; Mehrzad, J.; Zhao, X.; Detilleux, J.; Burvenich, C. (2002).** Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes, *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*. 7: 109–121.
- **45. Pantozzi, F.; Moredo, F.; Vigo, G.; Giacoboni, G. (2010).** Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 42 (1): 49-52.
- **46. Philpot, W. N. (1998).** Today is Challenge to Meet Tomorrow's Needs. Proc. Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality. Mérida, México. pp. 12-21.
- **47. Phuektes, P.; Mansell, P. D.; Dyson, R. S.; Hooper, N. D.; Dick, J. S.; Rowning, G. F. (2001).** Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from Dairy Cows with Mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1460-1466.
- **48. Poloni, V. (2009).** Determinación de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima de antibióticos de uso frecuente en apicultura. Tesina de grado para optar por el título de Microbióloga. Universidad Nacional de Río cuarto, Córdoba, Argentina.
- **49. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C.; Hinchcliff, K. W. (2002).** Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Editorial McGraw – Hill Interamericana. Madrid. 9 (1).

- **50. Revelli, G. R.; Rodriguez, C. G. (2001).** Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona del noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 23: 48-53.
- **51. Ruiz, J.; Ramírez, N.; Arroyave, O. (2001).** Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 14 (2) 143-154.
- **52. Russi, N. B.; Bantar, C.; Calvinho, L. F. (2008).** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología*. 40:116-119.
- **53. Sandgren, C. H.; Persson-Waller, K.; Emanuelson, U. (2008).** Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *The Veterinary Journal* 175: 108–117.
- **54. Santamaría González, V.; Alvarado Delgadillo, A. (2002).** Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Revista del Centro Dermatológico Pascua*. 11 (1): 18-21.
- **55. Saran A, Chaffer M. (2002).** Mastitis y calidad de Leche. *Inter-Médica*. Buenos Aires, Argentina. 36 (1): 41-54.
- **56. Scaramelli, A.; González, Z. (2005).** Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. 9: 328-334.
- **57. Schukken, Y.H.; Grommers, F.J.; Vandegeer, D.; Brand, A. (1989).** Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic-cell counts in bulk milk. *Veterinary Record*. 125:60–63.
- **58. Smith, K. L.; Hogan, J. S. (2001).** The World of Mastitis. *Proceedings of the 2nd International symposium on mastitis and milk quality*. 1-12.
- **59. Soca Perez, M.; Suárez Fernández, Y. E.; Soca Pérez, M.; Pestano Oliva, M.; Puron Guzmeli, C. A. (2005).** Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en dos unidades ganaderas de la Empresa Pecuaria “El Cangre”. *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*. 6 (8): 1-10.
- **60. Ulku Altoparlak, Ozlem Koca, Zulal Ozkururns, Mufide N. Akcay. (2010).** Incidence and risk factors of vancomycin-resistant enterococcus colonization in burn unit patients. *Burns*. 37 (1): 49-53.
- **61. Vandeputte-Van Messom, G.; Burvenich, C.; Roets, E.; Massart-Leen, A. M.; Heyneman, R.; Kremer, W. D.; Brand, A. (1993).** Classification of newly calved cows

- into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Research*. 60 (1): 19-29.
- **62. Seija V.; Vignoli R. (2006).** Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de La República. 6ta edición. Capítulo 34: Principales grupos de antibióticos. pp: 631-647.
 - **63. Wolter, W.; Castañeda V.H.; Kloppert B.; Zschoeck M. ()**. La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara. 1-68.
 - **64. Yamagishi, N.; Jinkawa, Y.; Omoe, K.; Makino, S.; Oboshi, K. (2007).** Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis by broth cultivation and PCR. *Veterinary Record*. 161: 381-383.
 - **65. Yawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A.; Brooks, G.F.; Butel, J.S.; Orneston L.N. (1990).** Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. Capítulo 11: Quimioterapia antibacteriana antimicótica. pp. 142-173.
 - **66. Wilfert, M. D.; Willeertt, P. D. Zinsser. (1998).** Microbiología. Editorial Panamericana S.A. 20ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 9: Agentes antimicrobianos. pp. 219-266.
 - **Sitios web**
 - **67.** Enfermedades de la piel: disponible on-line www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogat/seccion_18