

CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ALGUNOS ANTIBIOTICOS SOBRE CEPAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE OTITIS CANINA

María T. Calderón G. (MV), Lázaro Zurich Z. (MV),
Sergio Rosende O. (MV), Lisete Bosshard P. (MV).

MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS OF SOME ANTIBIOTICS, AGAINST BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM CANINE OTITIS.

Minimal inhibitory concentrations (MIC) in vitro of antibiotics, alone and associated, were studied in the presence of bacterial strains: Proteus sp, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, isolated from external canine otitis. Determinations were performed by the agar dilution test.

Lower MIC were detected form aminoglycosides against Proteus sp than the MIC observed for Pseudomonas aeruginosa but associations of amikacin and gentamicin showed synergistic action against both strains. Polimixin B was, practically, ineffective. Cloxacillin, gentamicin and ampicillin showed a high proportion of low MIC against the Staphylococcus aureus strains; also, cloxacillin and ampicillin in association was mainly synergic while cloxacillin-gentamicin was antagonic. These results are discussed in relation to the specific activity of each antibiotic and some associations and the possibility to reproduce the MIC in vivo by the local or sistemic administration in the focused pathology.

La gran incidencia de la otitis canina, como asimismo su refractariedad terapéutica, ha sido atribuida a múltiples factores que favorecen el desarrollo de microorganismos en diferentes etapas del curso de la patología (Pugh y Cols., 1974; Evans y Jemmet, 1978; Matsuda y Cols., 1984). Uno de los recursos terapéuticos importantes está constituido por el uso de antimicrobianos, solos o en asociaciones, que son utilizados por vía sistémica y local y cuya eficacia depende, por una parte, de la sensibilidad de las cepas bacterianas presentes en la lesión auricular y, por otra, de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que los antimicrobianos alcanzan en zonas de localización bacteriana (English y Prescott, 1983; Hirsch y Ruhel, 1984).

La identificación de las cepas bacterianas y el estudio de su sensibilidad mediante el antibiograma, constituyen el primer paso que guía la selección

de los antimicrobianos; sin embargo, por el carácter cualitativo del método parece de interés complementar esta información con el estudio de las CMI *in vitro* de los diferentes antimicrobianos de uso en la otitis canina (Amine-Kodja y Cols., 1983). En efecto, el estudio cuantitativo puede contribuir de un modo importante a la clínica pues, desde el punto de vista cinético, permite la posibilidad de un ajuste posológico que favorezca la reproducción *in vivo* de las CMI (Baggot, 1977; Devriese y Dutta, 1981; Fachini, 1981).

El estudio de las CMI *in vitro* en patologías de curso crónico, adquiere una especial connotación en los casos que requieren el uso de asociaciones de antimicrobianos por razones relacionadas con resistencia microbiana, disminución de efectos adversos de uno de los componentes de la asociación o con el fin de obtener una acción sinérgica (Jawetz, 1968; Person, 1983).

En el presente trabajo se estudian las CMI *in vitro* sobre cepas bacterianas obtenidas de cuadros de otitis canina, de antibióticos de uso frecuente en esta patología, tales como los betalactámicos: ampicilina y cloxacilina; aminoglicósidos: amikacina, gentamicina y neomicina y el antibiótico polipeptídico polimixina B.

Laboratorios de Microbiología y Farmacología.
Deptos. de Medicina Preventiva Animal y Ciencias Clínicas.
Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

Trabajo financiado por Proyecto 2422-86 DIB,
Universidad de Chile y aportes del Laboratorio Chile S.A.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó con 85 cepas bacterianas aisladas desde muestras obtenidas del oído externo de caninos con otitis, en diferentes estados de evolución y sin antecedentes de terapia antimicrobiana previa. Se utilizaron 26 cepas de *Proteus sp.*; 29 de *Pseudomona aeruginosa* y 30 de *Staphylococcus aureus*. El aislamiento e identificación se hizo según técnicas clásicas (Bergey, 1975). Las cepas control fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25923.

Los antibióticos ensayados y su respectiva potencia, µg/mg base, fueron: amikacina sulfato 600,84; gentamicina sulfato 619,80; neomicina sulfato 631,14; ampicilina sódica 837,99; cloxacilina sódica 984,60 y polimixina B 760,00. Todos en calidad de droga pura. Se prepararon soluciones base de cada antibiótico.

El inóculo fue preparado sembrando cada cepa en caldo Mueller Hinton (Difco), previa incubación durante 24 horas ajustando la suspensión al 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland lo que equivale a 150.000.000 de bacterias aproximadamente, se prepararon diluciones 1:20 de cada cepa. Las diluciones seriadas de antibióticos en agar Mueller Hinton (Difco) se realizaron a partir de la solución base ensayándose doce concentraciones desde 0,25 hasta 128 µg/ml. Estas fueron mezcladas con el agar a 50°C en razón 1:10 y, una vez solidificado, se mantuvieron a 4°C durante 24 horas. Las diluciones de los antibióticos estudiados en asociación se realizaron mediante la técnica simplificada del "Tablero de Ajedrez" (Sabath 1968; Krogstad y Moellering, 1980) y que consiste en un cuadrulado que permite el estudio de múltiples combinaciones de dos antibióticos en diferentes concentraciones que se

expresan en múltiplos de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), y utilizando diluciones en factor de 2. Esto permite ensayar diversas concentraciones que se diluyen a lo largo de sus ejes, X e Y, y por otra parte, permite determinar la posible sinergia entre los antibióticos estudiados.

Las placas fueron inoculadas mediante el uso del aparato inóculo replicador de Steers (1959) y las determinaciones se realizaron en duplicado e incubándose a 37°C durante 18 horas, realizándose la lectura por evidencia macroscópica de crecimiento.

Los valores de la CMI se expresan en términos absolutos y, en el caso de las asociaciones de antibióticos, los resultados corresponden al cálculo del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF), que se obtiene por aplicación de la siguiente fórmula (Krogstad y Moellering, 1980; Sande y Mandell, 1980);

$$\text{CIF} = \frac{A}{\text{CMI A}} + \frac{B}{\text{CMI B}}$$

A = Concentración de la droga A.

B = Concentración de la droga B.

CMI A = CMI de la droga A para un determinado microorganismo.

CMI B = CMI de la droga B.

CIF 0,5 = Sinergia.

CIF = 1,0 = Aditividad.

CIF > 1,0 = Antagonismo.

RESULTADOS

1. Estudio de aminoglicósidos y polimixina B sobre cepas Gram negativas.

1.1. *Pseudomona aeruginosa*.

En el cuadro 1 se muestran los valores de las CMI de polimixina B, amikacina y gentamicina que permi-

CUADRO 1
CMI DE POLIMIXINA B, GENTAMICINA Y AMIKACINA
SOBRE 29 CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Concentraciones µg/ml	Polimixina B	Gentamicina	Amikacina
0,25	—	—	—
0,5	—	—	4
1,0	—	—	9
2,0	—	—	2
4,0	1	1	4
8,0	—	11	4
16,0	—	16	3
32,0	—	1	3
64,0	1	—	—
128,0	—	—	—
>128,0	27	—	—

CUADRO 2
CMI DE GENTAMICINA, AMIKACINA Y NEOMICINA
SOBRE 29 CEPAS DE PROTEUS SPP

Concentraciones µg/ml	Gentamicina	Amikacina	Neomicina
0,25	—	—	2
0,5	1	1	1
1,0	2	6	—
2,0	7	4	9
4,0	3	2	7
8,0	4	1	2
16,0	6	3	2
32,0	—	5	2
64,0	3	—	—
128,0	—	—	—
>128,0	—	4	1

ten apreciar los menores CMI requeridas por los aminoglicósidos para ejercer sus efectos sobre la cepa ensayada, polimixina B prácticamente no tuvo efectos en porcentajes superiores al 90% como se observa en el cuadro 3.

1.2. *Proteus sp.*

En el cuadro 2 en que se presentan los valores de CMI sobre cepas de *Proteus sp.* dado que requirieron menores CMI de los antibióticos en comparación a las de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Estudio de CMI en asociaciones de antibióticos sobre cepas Gram negativas.

2.1. CMI de gentamicina-amikacina sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus sp.*

Con esta asociación se ensayó sólo cepas que presentaron valores de CMI iguales o menores a 128

µg/ml y que correspondieron a 29 de *Pseudomonas aeruginosa* y 22 de *Proteus sp.*, calculándose el índice CIF para cada una de las cepas y que, según se presenta en el cuadro 4, muestra con *Pseudomonas* un efecto sinérgico en 48,2%; aditivo en el 45% y sólo se apreció antagonismo en el 6,8% de los casos considerados. En el caso de *Proteus sp.*, los efectos sinérgicos y aditivos son algo inferiores a los observados en el caso anterior, pero predominan notablemente sobre las acciones antagonicas que alcanzan al 14% de los experimentos.

2.2. CMI de neomicina-gentamicina sobre *Proteus sp.*

Esta asociación también fue ensayada frente a cepas de *Proteus sp.* que presentaron valores de CMI iguales o inferiores a 128 µg/ml en presencia de los antibióticos por separado. En 25 cepas los efectos sinérgicos se observaron en 16; la aditividad en 7 y

CUADRO 3
RANGOS, FRECUENCIA Y DISTRIBUCION PORCENTUAL DE CMI
DE AMIKACINA, GENTAMICINA, NEOMICINA Y POLIMIXINA B
SOBRE CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y PROTEUS SP

Cepas Microbianas	N	Antibióticos	Rango µg/ml	CMI y %*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	Gentamicina	4 - 32	8 - 16 (93)
		Amikacina	0,5 - 32	1 (21)
		Polimixina B	4 - >128	>128 (93)
<i>Proteus sp.</i>		Gentamicina	0,5 - 64	2 (26)
		Amikacina	1 - >128	2 (23)
		Neomicina	0,5 - >128	4 - 8 (61)

*CMI más frecuentes. El número entre paréntesis corresponde al porcentaje de cepas inhibidas.

CUADRO 4
EFFECTOS DE LA ASOCIACION
GENTAMICINA - AMIKACINA SOBRE CEPAS
PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y PROTEUS SP*

Cepas Microbianas	N	Efectos		
		Aditivos	Sinérgicos	Antagónicos
Pseudomonas aeruginosa	29	13	14	2
Proteus sp	22	7	12	3

*Según cálculo del índice CIF.

plantean un punto importante de discusión. En el cuadro 6 se presentan los rangos de CMI y la distribución porcentual de los antibióticos estudiados y que complementan los resultados descritos.

3.2. CMI de ampicilina-cloxacilina y de gentamicina-cloxacilina sobre cinco cepas de *Staphylococcus*.

Los resultados de las acciones de los antibióticos estudiados por separado nos indujeron a realizar algunos estudios, de carácter preliminar, con las asociaciones mencionadas sobre cinco cepas de

CUADRO 5
CMI DE AMPICILINA, CLOXACILINA Y GENTAMICINA
SOBRE 30 CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Concentraciones $\mu\text{g/ml}$	Ampicilina	Cloxacilina	Gentamicina
< 0,25	7	17	18
0,25	—	—	—
0,5	11	4	1
1,0	2	—	2
2,0	5	—	2
4,0	2	—	3
8,0	2	—	2
16,0	—	—	2
32,0	—	3	—
64,0	—	3	—
128,0	—	—	—
>128,0	—	3	—

el antagonismo en 2 que equivalen a 64,28 y 8% respectivamente, demostrando el predominio de la acción inhibidora de esta asociación.

3. Estudio de CMI de antibióticos solos y en asociación sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.1. CMI de ampicilina, cloxacilina y gentamicina.

En el cuadro 5 se muestran las CMI de los tres antibióticos que permite apreciar un claro efecto inhibidor de cloxacilina y gentamicina aun en concentraciones inferiores a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, es interesante destacar las acciones de la ampicilina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y que

CUADRO 6
RANGO, FRECUENCIA Y DISTRIBUCION PORCENTUAL
DE CMI DE AMPICILINA, CLOXACILINA
Y GENTAMICINA SOBRE 30 CEPAS
DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Antibióticos	Rango $\mu\text{g/ml}$	CMI y % $\mu\text{g/ml}$	*
Gentamicina	<0,25 - 16	<0,25	(60)
Ampicilina	<0,25 - >128	0,5	(36,6)
Cloxacilina	<0,25 - >128	<0,25	(56,6)

*CMI más frecuentes. El número entre paréntesis corresponde al porcentaje de cepas inhibidas.

Staphylococcus aureus. En el cuadro 7 se observa una marcada acción sinérgica de ampicilina-cloxacilina y sólo efectos aditivos y antagonísticos de la asociación cloxacilina-gentamicina.

CUADRO 7
EFECTOS DE LAS ASOCIACIONES
AMPICILINA - CLOXACILINA
Y GENTAMICINA - CLOXACILINA
SOBRE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS*

Efectos	Asociación Ampicilina Cloxacilina	Asociación Gentamicina Cloxacilina
Aditivos	1	2
Sinérgicos	4	0
Antagónicos	0	3
N	5	5

*Según cálculo del índice CIF.

DISCUSION

Desde un punto de vista general, los resultados permiten reconocer variaciones en la sensibilidad de cepas bacterianas presentes en las otitis caninas, hecho que, agregado a la condición de cronicidad de esta patología, justifica el estudio de las CMI *in vitro* con el fin de favorecer la selección del antimicrobiano con mejores posibilidades de reproducir CMI de carácter sinérgico o aditivo *in vivo*, con un margen de seguridad adecuado (Baggot, 1977).

El análisis en particular de las CMI de los diferentes antibióticos ensayados sobre cepas Gram negativas demuestra que, tanto amikacina como gentamicina, ejercen efectos inhibitorios sobre un elevado porcentaje de cepas de *Pseudomonas* con bajas CMI y, por tanto, susceptibles de reproducir *in vivo* aplicando esquemas derivados de la información cinética actualizada (Conzelman, 1980; Ling, 1981; Brown y Cols., 1982; Zurich, 1983). La posología, según la literatura citada, corresponde al uso parenteral de gentamicina en dosis de 4 ó 10 mg/kg en ritmo horario de 12 horas. Esto permite alcanzar concentraciones sanguíneas entre 1 a 5 µg/ml y que se comparan favorablemente con las CMI *in vitro* del presente trabajo. No tenemos antecedentes sobre concentraciones titulares, específicamente auriculares, de gentamicina y amikacina aplicadas por vía sistémica, pero el uso local de

preparados al 3% exceden las CMI sanguíneas aun cuando, esta modalidad de uso sólo se recomienda cuando existe integridad del tímpano, pues en caso contrario se favorece la difusión hacia el oído medio que puede provocar alteraciones del sistema acústico (Adler y Finland 1971; Clark, 1977).

Respecto de neomicina, de amplio uso tópico y local en nuestro medio, los resultados permitieron verificar la elevada eficacia *in vitro* sobre cepas de *Proteus sp.* a juzgar por los efectos con CMI entre 0,5 y 8,0 µg/ml que son relativamente fáciles de alcanzar en el conducto auditivo externo con las presentaciones farmacéuticas de uso tópico.

Es interesante hacer notar, aunque escapa a los propósitos de este trabajo, que el mejor contacto entre la droga y el tejido efector se obtiene cuando se retira el exudado del conducto auditivo externo previa la aplicación del antimicrobiano (Sharma y Rhoades, 1975).

Las asociaciones de gentamicina con neomicina y amikacina presentaron CMI bajas, con efectos aditivos y sinérgicos predominantes, lo cual puede constituir un buen elemento de juicio en la selección de antimicrobianos frente a infecciones auriculares con presencia de *Pseudomonas* y *Proteus*. En todo caso, nuestros experimentos no permiten discriminar entre las asociaciones ensayadas, de tal forma que cualquier indicación en este sentido debe ser obtenida a través de exámenes que contemplen el estudio de las CMI *in vitro*.

En relación a polimixina B, llama la atención las elevadas concentraciones necesarias para ejercer acciones inhibitorias *in vitro*, hecho que no concuerda con las indicaciones, en este tipo de infecciones, que aparecen en los textos clásicos (Brander y Cols., 1982; Booth y MacDonald, 1982). Este hecho parece confirmar, por una parte, la necesidad de instaurar estudios de CMI conjuntamente con los exámenes clásicos de sensibilidad bacteriana y, por otra, confrontar los resultados *in vitro* versus *in vivo* con el fin de intentar una mejor explicación de la actividad antibacteriana (English y Prescott, 1983).

Las acciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* demostraron una elevada efectividad de los antibióticos ensayados. CMI inferiores a 0,25 µg/ml fueron frecuentes para cloxacilina y gentamicina. Sin embargo, fue interesante constatar la marcada acción inhibitoria de ampicilina cuya naturaleza estructural (Acred y Cols., 1962) es sensible a las acciones de las betalactamasas liberadas por cepas de estafilococos resistentes. Esto puede hacer pensar que un número importante de cepas no corresponde, tal vez, a productoras de enzimas inactivantes y, por esta razón, mostraron una gran sensibilidad frente a ampicilina. Sin duda que los trabajos futuros deben contemplar la identificación de los estafilococos presentes en la infección.

La asociación ampicilina-cloxacilina presentó un efecto sinérgico o aditivo sobre las cepas de estafilococos ensayadas en oposición a los efectos antagónicos de las asociaciones cloxacilina-gentamicina. Ambos experimentos, por el bajo número de casos ensayados, no permiten emitir conclusiones pero, en términos farmacológicos, demuestran la importancia de ajustarse a los principios que rigen las asociaciones de antimicrobianos, las cuales presenten mejores posibilidades terapéuticas cuando se combinan fármacos que poseen mecanismos de acción complementarios (Jawetz, 1968; Person, 1983).

RESUMEN

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) *in vitro* de amikacina, gentamicina, neomicina, polimixina B, cloxacilina y ampicilina, fueron estudiadas frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.* y *Staphylococcus aureus* aisladas de otitis canina. Las determinaciones fueron realizadas mediante el método de dilución en agar.

Los resultados mostraron efectos inhibitorios de aminoglicósidos sobre *Proteus sp.* y, en menor proporción, sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Las asociaciones de amikacina-gentamicina presentaron efectos sinérgicos y aditivos en mayor proporción que los antagónicos de acuerdo al índice CIF Cloxacilina y ampicilina, solas o asociadas, presentaron una marcada acción inhibitoria y sinérgica sobre cepas de *Staphylococcus aureus* al igual que gentamicina que requirió bajas CMI.

Se discuten los resultados en relación a sus efectos específicos y la posibilidad de reproducir las CMI activas *in vivo* con fines terapéuticos como asimismo la importancia de la determinación de CMI en procesos sépticos crónicos.

REFERENCIAS

- ACRED, P., D.M. BROWN, D.H. TURNER, M.J. WILSON. Pharmacology and chemotherapy of ampicillin. A new broad spectrum penicillin. *Brit. J. Pharmacol.* 18: 366-369, 1962.
- ADLER, J.L., M. FINLAND. Susceptibility of recent isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin, polymixin and five penicillins with observations on the pyocin and immune types of strains. *Appl. Microbiol.* 22: 870-875, 1971.
- AMINE-KODJA, C.A., J.L. PELLERIN, J. CHANTAL, A. MILOU. L'antibiogramme dans les pyodermatitis et les otites suppurées du chien. Note 2: Resultats des examens effectués au Service de Microbiologie Immunologie de l'Ecole National Veterinaire, Toulouse, 1975-1979. *Rev. Méd. Vét. (Toulouse)* 134: 533-540, 1983.
- BAGGOT, J.D. Principles of drug disposition in domestic animals: The basis of veterinary clinical pharmacology. Phil. Saunders, 1977.

- BERGEY, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams & Wilkins Co. 1975.
- BOOTH, N., L.E. MACDONALD. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5th ed. Ames, Iowa State University Press, 1982.
- BRANDER, G.C., D.M. PUGH, R.J. BAYWATER. Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics. 4th ed. Bailliere and Tindall, London, 1982.
- BROWN, M.P., S.M. STOVER, R.H. KELLY, T.B. FARVER. Gentamicin sulphate in the horse: serum, sinovial, peritoneal and urine concentrations after single dose intramuscular administration. *J. Vet. Pharm. Ther.* 5: 119-122, 1982.
- CLARCK, C.H. The toxicity of aminoglycosides antibiotics. *Med. Vet. Pract.* 58: 594-598, 1977.
- CONZELMAN, M.G. Pharmacotherapeutics of aminoglycoside antibiotics. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1078-1080, 1980.
- DEVRIESE, L.A., G.N. DUTTA. Antibiotic sensitivity testing: correlations between *in vitro* test and *in vivo* situations. *Ann. Reach. Vet.* 12: 41-46, 1981.
- ENGLISH, P.B., PRESCOTT, C.W. Antimicrobial chemotherapy in the dog. II Some practical considerations. *J. Small Anim. Pract.* 24: 371-382, 1983.
- EVANS, J.M., J.E. JEMMET. Otitis externa the place of polipharmacy. *N. Z. vet. J.* 26: 280-283, 1978.
- FACHINI, B. Aislamiento de microorganismos y antibiograma en otitis canina. *Gac. Vet. (Bs. Aires)*, 43: 658-664, 1981.
- HIRSCH, D.C., W.W. RUEHL. A rational approach to the selection of an antimicrobial agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185: 1058-1061, 1984.
- JAWETZ, E. The use of combinations of antimicrobial drugs. *Ann. Rev. Pharmacol.* 8: 151-170, 1968.
- KROGSTAD, D.J., J.R.C. MOELLERING. Combinations of antibiotics, mechanisms of interactions against bacteria. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed. Lorian V. 5th ed. Baltimore Williams & Wilkins, 1980.
- LING, G.V., M.G. CONZELMAN, C.E. FRANTI, A.L. RUBY. Urine concentrations of gentamicin, tobramycin, amikacin and kanamycin after subcutaneous administration to healthy adult dog. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1792-1794, 1981.
- MATSUDA, H., M. TOJO, K. FUKUI, T. IMORI, E. BABA. The aerobic bacteria flora of the middle and external ears in normal dogs. *J. Small Anim. Pract.* 25: 269-274, 1984.
- PERSON, J.M. Aspects microbiologiques des associations d'antibiotiques. *Rec. Méd. Vét. (Alfort)* 159: 543-548, 1983.
- PUGH, K.E., J.M. EVANS, P.G. HENDY. External otitis in the dog and cat: An evaluation of a new treatment. *J. Small Anim. Pract.* 15: 387-400, 1974.
- SABATH, L.D. Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 210-217, 1968.
- SANDE, M.A., G.L. MANDELL. Antimicrobial agents: General considerations. En: *Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. A. Goodman and A. Gilman. 6th ed. New York. MacMillan, 1980.
- SHARMA, V.D., H.E., RHOADES. The occurrence and microbiology of otitis externa in the dog. *J. Anim. Pract.* 16: 241-247, 1975.
- STEEERS, E. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* 9: 307-311, 1959.
- ZURICH, L. Antibióticos aminoglicósidos. Aspectos farmacológicos y terapéuticos de interés en clínica veterinaria. *Monografías Med. Vet.* 5: 5-28, 1983.

Recibido abril 1987, aprobado junio 1987.