

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Actividad *in vitro* de enrofloxacin sobre *Escherichia coli* en presencia de suero de bovino y de búfalo

Aguirre S.; Lindt C.; Ramirez E.; Piani E.; Rebelindo M.; Lapolla L.; Cusit C.; Russi N.; Formentini, E.

Laboratorio de Farmacología y Toxicología. soledad.aguirre87@hotmail.com

Proyecto 501 201101 00068 LI CAI+D 2011: “Actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*; influencia del pH, tamaño del inóculo y actividad antibacteriana intrínseca de suero de bovinos y búfalos”

Las fluoroquinolonas (FQs) son antibióticos relacionados estructuralmente con el ácido nalidíxico y que son usados en Medicina Veterinaria y Medicina Humana para tratar una amplia variedad de infecciones de etiología bacteriana. Enrofloxacin (EFX) presenta una excelente actividad *in vitro* sobre *E. coli*, tiene buena distribución tisular y en hígado y posiblemente en otros sitios como la ubre y los macrófagos es transformada parcialmente a ciprofloxacina (CFX), que es un metabolito activo y es responsable de gran parte de su actividad antimicrobiana. Se ha observado que la correlación entre la actividad *in vitro* de un antibiótico y la resolución de un cuadro clínico no siempre es del 100%, ya que muchas infecciones bacterianas tratadas con el antibiótico al cual el microorganismo muestra ser sensible *in vitro* no responden satisfactoriamente a la terapéutica antibiótica. Esto se explica porque en un cuadro clínico, además del antibiótico y las bacterias, interviene el sistema inmune de los pacientes. El suero presenta una importante actividad bactericida determinada mayoritariamente por dos componentes; los anticuerpos naturales (AcN) y el complemento⁽¹⁾. Los AcN actúan opsonizando a los microorganismos e iniciando la cascada de activación del complemento por las vías clásica, alternativa y de las lectinas, culminando con el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (CAM) sobre la superficie de los patógenos, formando poros que causando un desbalance electrolítico provocan la lisis de las bacterias o las partículas virales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los sueros de bovino (SBO) y de búfalo (SBU) sobre la actividad antibacteriana de EFX sobre una cepa de *E. coli* (ATCC 25922), mediante curvas de muerte bacteriana (CMB).

Se utilizó una cepa de *E. coli* (ATCC 25922) y el antibiótico consistió en un estándar de EFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). Los SBO y SBU fueron obtenidos a partir de muestras de sangre de varios animales adultos y sanos de cada especie que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los tres meses previos a la extracción. La esterilidad del pool de sueros de cada especie fue testada mediante procedimientos bacteriológicos clásicos.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX se determinó por macrodilución en tubo en caldo Muller-Hinton (CMH)⁽²⁾. Las CMB se construyeron en CMH, CMH-SBO (50:50) y CMH-SBU (50:50) a concentraciones de EFX equivalentes a 0,25- 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 y 32 veces la CIM⁽³⁾. Las muestras se tomaron a tiempo cero y a las 0,5 - 1 - 2 - 3,5 - 5 - 10 y 24 h y en éstos se determinó el número de unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml). La eficacia antibacteriana de EFX fue evaluada con dos criterios:

a) *Efecto bactericida asociado con la remisión clínica*: tomando como referencia la reducción del 99,9% del número de bacterias viables respecto del conteo bacteriano inicial (N_0) al final del ensayo ($-3 \log_{10}$ respecto de \log_{10} de N_0).

b) *Efecto de erradicación bacteriana asociado con cura bacteriológica*: tomando como referencia la reducción del 99,99% del número de bacterias viables respecto del conteo bacteriano inicial (N_0) al final del ensayo ($-4 \log_{10}$ respecto de \log_{10} de N_0).

La CIM de EFX fue estimada en 0,0312 $\mu\text{g/ml}$. La inspección de las gráficas de las CMB muestra que en CMH, CMH-SBO y CMH-SBU la velocidad bactericida de EFX se incrementó en función del incremento de sus concentraciones, lo que se corresponde con una actividad concentración dependiente. En CMH con excepción de 4 x CIM, el conteo de bacterias viables solo presentó una

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

reducción entre $>3 \log_{10}$ y $<4 \log_{10}$ respecto del $\log_{10} N_0$, lo que se corresponde con una eficacia $> 99,9\%$ y $<99,99\%$ (Figura 1A). En cambio en presencia de SBO y SBU, el conteo de bacterias viables presentó una reducción $\geq 4 \log_{10}$ respecto del $\log_{10} N_0$, lo que se corresponde con una eficacia $\geq 99,99\%$ (Figura 1B y Figura 1C).

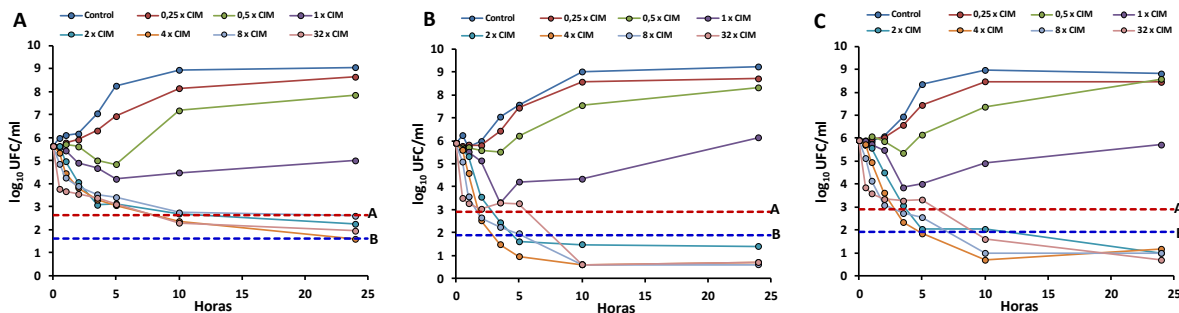


Figura 1. Curvas de muerte de *E. coli* (ATCC 25922) en (A) caldo Muller Hinton, (B) Caldo Muller Hinton + suero bovino 50:50 y (C) Caldo Muller Hinton + suero de búfalo 50:50, en presencia de concentraciones constantes de enrofloxacina. Las líneas de puntos horizontales A y B indican una reducción del conteo bacteriano del 99,9 y 99,99% respectivamente.

La evaluación de la actividad *in vitro* de los antibióticos en ensayos de CMB se basa en tres variables: a) concentración del antibiótico; b) tiempo de exposición y c) reducción de bacterias al final del ensayo. La tercera variable permite evaluar en forma directa la eficacia del antimicrobiano. Actualmente se consideran dos criterios para cuantificar la eficacia; 1)- la reducción $>3 \log_{10}$ y $<4 \log_{10}$ de N_0 , (reducción de la carga bacteriana del 99,9%) suficiente para lograr la remisión clínica del cuadro infeccioso y 2)- la reducción $\geq 4 \log_{10}$ de N_0 (reducción de la carga bacteriana del 99,99%) compatible con la erradicación de microorganismos y por lo tanto con la cura bacteriológica. Esta última solo pudo observarse en presencia de SBO y SBU. La explicación que proponemos a este hallazgo es que la activación del complemento sérico a causa de la opsonización de los microorganismos por parte de los AcN presentes en SBO y SBU produjo la lisis de las bacterias. Por el contrario, la actividad de EFX en CMH, fue una condición experimental equivalente a la que se podría observar en un paciente inmunosuprimido donde la actividad del antimicrobiano por sí mismo no sería suficiente para erradicar el agente infeccioso bacteriano del organismo.

Estos resultados son interesantes ya que proporcionan evidencia para direccionar la investigación hacia el uso de alternativas terapéuticas para contrarrestar el desarrollo de las bacterias. Una de ellas es el empleo de inmunomoduladores para incrementar las concentraciones de factores de respuesta inmune inespecífica en el suero. Esto es particularmente interesante porque las proteínas de suero son degradables y no están sujetas al fenómeno de acumulación como los antibióticos.

Bibliografía

1-Matson, K.D., Ricklefs, R.E. & Klasing, K.C. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev Comp Immunol.* 28: 34-49.
 2-CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2008. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; Approved guideline. 3rd Edition, Document M37-A3, 2008, Volume 28, Number 7. Wayne, Pennsylvania USA.
 3-García Rodríguez, J.A.; R. Cantón; J.E. García Sánchez; M.L. Gómez-Luis; L. Martínez Martínez; C. Rodríguez-Avial & J. Vila. 2001. Métodos Especiales para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. En Juan J. Picazo Editor: Procedimientos en Microbiología Clínica; SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Primera Edición. España.