

Evaluación del efecto de un extracto de *Panax ginseng* sobre la concentración inhibitoria mínima de la cefalexina en placas de microdilución.

Beccaria, C; Baravalle, C; Dallard, B.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina
camila-beccaria@hotmail.com

CAI+D PI-2011. Resolución C.S N° 187/13. “Evaluación del efecto inmunoestimulante y caracterización del mecanismo de acción de un modificador de la respuesta biológica en un modelo de mastitis murino”

La glándula mamaria (GM) bovina es altamente susceptible a las nuevas infecciones intramamarias (IIM) durante la etapa temprana del período de vaca seca y el parto, cuando las defensas están deprimidas. Las IIM que se originan en el período seco pueden reducir la producción láctea hasta en un 35% y están asociadas con mastitis clínicas durante el primer mes de lactancia. El uso de antibióticos intramamarios administrados al inicio del período seco controla parcialmente las IIM presentes al secado y disminuye las IIM al parto. Sin embargo, la necesidad de lograr mayores tasas de curación de IIM en el secado temprano y prevenir IIM ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas dirigidas a reforzar tanto la terapia antimicrobiana administrada al secado, como los factores protectores naturales de la GM. Una de ellas, es la utilización de modificadores de la respuesta biológica (MRB) o inmunomoduladores capaces de interactuar con el sistema inmune y modular la respuesta del huésped, resultando en un incremento o una depresión de la respuesta inmunitaria.

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha centrado sus investigaciones en el estudio de la inmunomodulación de la GM bovina a través de la utilización de MRB aplicados al inicio del período de vaca seca, generando conocimientos acerca del efecto en la GM bovina de compuestos con potencial inmunoestimulante. Uno de los MRB evaluados es el extracto de la raíz de *Panax ginseng* (PG). Los principales resultados obtenidos muestran que la aplicación intramamaria de un extracto de PG al momento del secado incrementa la respuesta inmune innata en la GM y contribuye a acelerar el proceso de remodelación durante la involución activa.

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante ensayos de microdilución en placa el efecto del PG sobre la concentración inhibitoria mínima de las cefalosporinas (cefalexina), utilizando una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

El método de microdilución se realizó en placas de 96 pocillos (12x8) con fondo en U. En las dos primeras filas A y B se realizaron 11 diluciones seriadas en base 2 del antimicrobiano (cefalexina) en caldo Mueller-Hinton (M-H) y un pocillo control (columna 12) de caldo sin antimicrobiano. Con este esquema de diluciones en la columna 1 se ubicó la concentración más alta del antimicrobiano (64 µg/ml) y en la columna 11 la más baja (0,0625 µg/ml). En las filas C y D se adicionó al caldo PG en una concentración final de 0,5 mg/ml. Por otra parte, en las filas E y F, se adicionó PG en una concentración de 3 mg/ml. El volumen final de cada pocillo fue de 100 µl.

La preparación del inóculo se llevó a cabo a partir de una suspensión de 10^8 UFC/ml (0,5 de la escala de Mc Farland) que posteriormente se diluyó 1:10, con lo que se obtuvo una concentración final de 5×10^5 UFC/ml o 5×10^4 UFC/pocillo¹. Se sembraron en cada pocillo de la placa 5 μ l del inóculo.

Además de los pocillos de control de crecimiento (pocillos sin antibiótico), se prepararon controles negativos (caldo sin inocular). La placa se incubó a 37° C durante 24 hs.

Se realizaron recuentos de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido fue de 5×10^5 UFC/ml. Para ello se tomó una alícuota de 10 μ l de cada pocillo control y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron por duplicado (20 μ l) en placas de agar base. Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados visualmente y mediante determinación de densidades ópticas por espectrofotometría² en una longitud de onda de 600 nm.

Se determinó como CIM a la menor concentración del antimicrobiano en la cual no se observó crecimiento bacteriano a simple vista, tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos control de crecimiento positivo, los cuales presentaban un botón mayor a 2 mm de diámetro. La CIM de las cefalosporinas, que incluye a la cefalexina, recomendada por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) está comprendida entre 0,12 μ g/ml a 0,5 μ g/ml.

Al comparar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en las diferentes concentraciones de cefalexina se determinó que tanto en el caldo sin PG como en el caldo con PG en una concentración de 0,5 mg/ml los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la dosis 0,25 μ g/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 0,5 μ g/ml. En cambio en el caldo con PG en una concentración de 3 mg/ml, los botones indicadores de crecimiento se visualizaron hasta la dosis de 0,125 μ g/ml inclusive, determinando como CIM la dosis inmediata superior de 0,25 μ g/ml.

Las densidades ópticas (DO) obtenidas de las lecturas en espectrofotómetro coincidieron con las lecturas visuales, aquellos pocillos con densidades ópticas mayores a 1 son los mismos que mostraron botón de crecimiento a simple vista (Tabla 1).

	1 μ g/ml	0,5 μ g/ml	0,25 μ g/ml	0,125 μ g/ml	0,0625 μ g/ml	control
Caldo sin PG	0,440	0,479	1,027	1,582	1,951	2,162
Caldo + PG (0,5 mg/ml)	0,313	0,510	1,047	2,052	2,158	2,308
Caldo + PG (3 mg/ml)	0,488	0,840	0,727	1,214	1,609	2,427

Tabla 1: Promedio de los valores OD de los diferentes tratamientos y dosis, medidos por espectrofotometría.

En conclusión, el agregado de 3 mg/ml de PG al caldo M-H disminuyó la CIM de la cefalexina, lo que podría tener relevancia al momento de elaborar formulaciones de aplicación intramamaria que contengan PG y antibióticos como alternativa a la terapia de secado tradicional. Se necesitan futuros estudios que determinen qué tipo de interacciones son las que se establecen entre la cefalexina y el PG.

Bibliografía

- 1- **García Rodríguez J.A.; Cantón R.; García Sánchez J.E.; Gómez Lus M.L.; Martínez L.; Rodríguez-Avial C.; Vila J.** (2000) Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. http://www.seimc.org/documentoscientificos.php?mn_MP=3&mn_MS=357
- 2- **Stiefel S.; Gumiy D.; Canalis M.; Siroski, P.; Picco, E; Ortega, H; Formentini, E.** (2013) Desarrollo de un método colorimétrico en microplaca para determinar la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias ISSN 1666-938X.vol. 12 (pág. 1-2).