

Velocidad bactericida de concentraciones conjuntas de enrofloxacin y ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 en presencia de suero de bovino y de búfalo

Lindt C.; Aguirre S.; Ramírez E.; Presa Rossa C.; Piani E.; Russi N.; Formentini E.
Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL
morganagroovy@hotmail.com

“Actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*; influencia del pH, tamaño del inoculo y actividad antibacteriana intrínseca de suero de bovinos y búfalos” n° 501 201101 00068 LI CAI+D 2011. Resolución C.S. n° 481/13.

Enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) son antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) que son ampliamente usados en Medicina Veterinaria. Como todas las FQs presentan gran actividad sobre *E. coli*. Tras la administración parenteral de EFX a bovinos y búfalos a una dosis de 5 mg/kg, esta es transformada parcialmente a CFX en hígado en glándula mamaria y en macrófagos. La máxima concentración observada de EFX en suero de bovino (SBO) y de búfalo (SBU) es de 0,60 µg/ml y la relación entre las concentraciones plasmáticas de CFX y EFX (CFX/EFX) es de aproximadamente 0,7. El objetivo de este estudio fue evaluar mediante curvas de muerte bacteriana (CMB) la actividad conjunta de EFX y CFX (EFC-CFX) con una relación CFX/EFX de 0,7 en caldo Muller Hinton (MHB) y en MHB + SBO en proporción 50:50 (MHB-SBO) y en MHB + SBU en proporción 50:50 (MHB-SBU). Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). Los valores de CIM de EFX y CFX se estimaron previamente con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008)¹, siendo de 0,0312 µg/ml para EFX y de 0,0156 µg/ml para CFX. Las CBM se realizaron según el procedimiento descrito por García Rodríguez y col., (2001)². La concentración de cada antibiótico se expresó en referencia al valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX-CFX se expresaron como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico tal como se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Concentraciones mixtas de EFX-CFX donde la relación CFX/EFX es 0,7. La concentración de cada antibiótico se expresa en referencia al valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX-CFX se expresan como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico.

Concentración	EFX (µg/ml)	EFX (x CIM)	CFX (µg/ml)	CFX (x CIM)	Suma (x CIM)
1	0,70	22,44	0,49	31,41	53,85
2	0,35	11,22	0,245	15,71	29,92
3	0,175	5,61	0,123	7,85	13,46
4	0,088	2,80	0,061	3,93	6,73
5	0,044	1,40	0,031	1,96	3,37
6	0,022	0,70	0,015	0,98	1,68
7	0,011	0,35	0,008	0,49	0,84
8	0,005	0,18	0,004	0,25	0,42
9	0,0025	0,09	0,002	0,12	0,21

Los recuentos de bacterias viables se realizaron a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h y éstos se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). El límite de detección de la técnica fue de 5 UFC/ml. La eficacia de las concentraciones mixtas de EFX-CFX se evaluó tomando en consideración tres criterios:

- Sin modificación del número de bacterias del conteo inicial (efecto bacteriostático).
 - Reducción del 99,9% del número de bacterias respecto del conteo inicial (efecto bactericida).
 - Reducción del 99,99% del número de bacterias respecto del conteo inicial (erradicación bacteriana).
- La inspección de las CMB de EFX-CFX en MHB-SBO y MHB-SBU mostraron una cinética de eliminación bacteriana con una fase bactericida rápida cuya velocidad dependió de la concentración de

los antibióticos y una segunda fase donde la velocidad de eliminación bacteriana fue menor y similar para todas las concentraciones de EFX-CFX mayores a 1 x CIM. Las CMB de cada concentración mixta de EFX-CFX fueron ajustadas con el siguiente modelo biexponencial:

$$N = N_1 \cdot \exp[(k_a - k_{b1}) \cdot t] + N_2 \cdot \exp[(k_a - k_{b2}) \cdot t]$$

Donde N es el número de bacterias viables (UFC/ml), N_1 y N_2 son subpoblaciones bacterianas expresadas como UFC/ml, exp es el exponente de los logaritmos naturales, k_a es la constante de crecimiento bacteriano estimada anteriormente ($1,44 \text{ h}^{-1}$), k_{b1} es la constante de muerte bacteriana de la fase de eliminación rápida y k_{b2} es la constante de muerte bacteriana de la fase de eliminación lenta.

El ajuste de los datos experimentales se realizó por regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con el software de regresión no lineal ADAPT II (BMSR, University of Southern California, USA), en todos los casos el esquema de ponderación utilizado fue $1/y$. Los valores de las constantes de muerte bacteriana rápida (k_{b1}) y lenta (k_{b2}) en función de concentraciones mixtas de EFX-CFX en presencia de SBO y SBU se presentan en la figura 1.

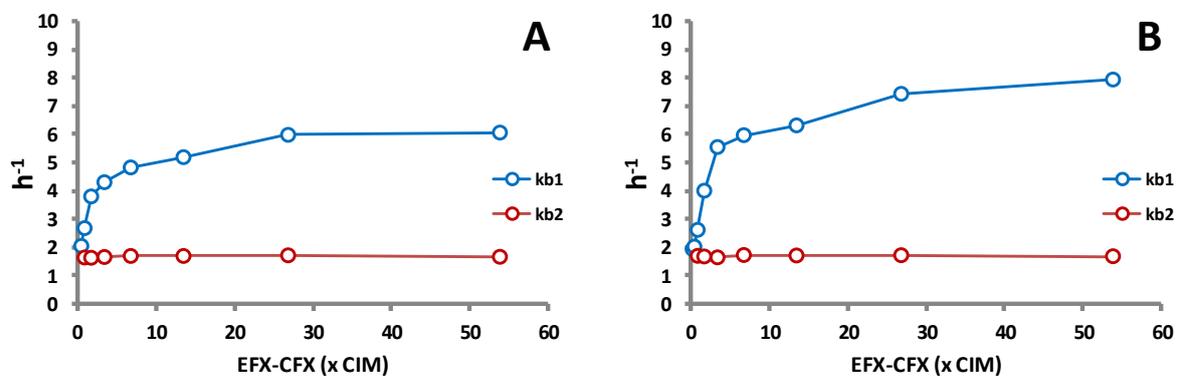


Figura 1: Valores de las constantes de muerte bacteriana rápida (k_{b1}) y lenta (k_{b2}) expresadas como la recíproca del tiempo (h^{-1}) en función de concentraciones mixtas de EFX y CFX en presencia de (A) suero de bovino (MHB-SBO) y (B) suero de búfalo (MHB-SBU). Las concentraciones se hallan expresadas como la sumatoria de los valores de CIM de EFX y CFX (ver tabla 1).

Tanto en presencia de SBO y SBU los valores de k_{b1} se incrementaron en función de las concentraciones de EFX-CFX hasta alcanzar un estado de equilibrio estacionario. En esta fase de eliminación bacteriana rápida, la eficacia bactericida de EFX-CFX fue mayor en presencia de SBU. Sin embargo, no se observaron diferencias en los valores de k_{b2} .

Las gráficas de las CMB mostraron que tanto en presencia de SBO como de SBU, las concentraciones mixtas de EFX-CFX presentaron cinéticas de eliminación bacteriana similares, aún cuando los valores de k_{b1} en SBU fueron mayores a los observados en presencia de SBO.

Estos hallazgos, corroboran que la velocidad bactericida inicial concentración dependiente que se observa en las 2-3 horas iniciales de las CMB no son determinantes de la eficacia de EFX-CFX, ya que un tiempo de exposición de 24 h. es necesario para reducir el número de bacterias viables a valores compatibles con la erradicación bacteriana.

1-CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, (2008). Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline, vol. 28, third ed. Document M37-A3. Wayne, Pennsylvania, USA.

2-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.