

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Evaluación de la actividad *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* mediante curvas de muerte bacteriana

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

dejavu_luli@hotmail.com

Laboratorio de Farmacología y Toxicología

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 inoculo 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) fue la primera FQ aprobada para su uso en animales. Ésta presenta 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⁽¹⁾. Como todas las FQs, EFX y CFX presentan una excelente actividad *in vitro* sobre *E. coli*, que es el agente etiológico de infecciones gastrointestinales y septicemias en humanos y animales, y de infecciones del tracto respiratorio en animales. En base a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de EFX y CFX sobre una cepa estandarizada de *E. coli* (ATCC 25922), mediante ensayos *in vitro* de curvas de muerte bacteriana (CMB).

Se utilizó una cepa de *E. coli* (ATCC 25922) y los antibióticos consistieron en estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se realizó con el método de macrodilución en tubo⁽²⁾. Las CMB en presencia de diferentes concentraciones constantes de EFX y CFX se realizaron según la metodología descrita por García Rodríguez y col., (2001)⁽³⁾. Las concentraciones de EFX y CFX testeadas fueron equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 32 veces los valores de CIM estimados para cada antibiótico y los tiempos de muestreo correspondieron a los tiempos 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 y CFX 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).

Los valores de CIM de EFX y CFX fueron estimados en 0,0312 y 0,0156 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La inspección de las gráficas de las curvas de muerte de *E. coli* en presencia de concentraciones constantes de EFX y CFX, muestran que en ambos casos, la velocidad bactericida de los dos antibióticos se incrementó en función del incremento de sus concentraciones, lo que se corresponde con una actividad bactericida concentración dependiente. En el caso de EFX, la mayoría de las concentraciones (2 x CIM, 8 x CIM y 32 x CIM) presentaron actividad bactericida, logrando reducir el valor de N_0 un 99,9%, mientras solo la concentración equivalente a 4 x CIM logró la erradicación bacteriana reduciendo el valor de N_0 en más del 99,99% (Figura 1A).

En cambio, mayoría de las concentraciones de CFX (2 x CIM, 4 x CIM, 8 x CIM y 32 x CIM) presentaron un efecto de erradicación bacteriana lograron reducir el valor de N_0 en más del 99,99% (Figura 1B).

AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

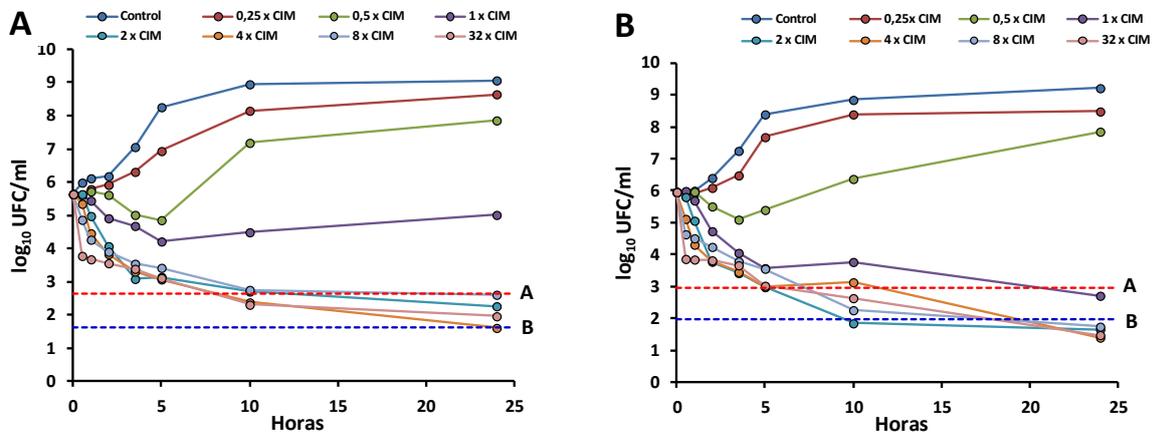


Figura 1. Curvas de muerte de *E. coli* (ATCC 25922) en Caldo Muller Hinton en presencia de concentraciones constantes de enrofloxacin (A) y ciprofloxacin (B). Las líneas de puntos horizontales A y B indican una reducción del conteo bacteriano del 99,9 y 99,99% respectivamente.

La evaluación de la actividad *in vitro* de los antibióticos en ensayos de curvas de muerte bacteriana 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 se observó en la mayoría de las concentraciones de CFX.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que CFX es un antibiótico más potente que su precursor EFX, como lo demuestra el hecho que el valor de la CIM de CFX es la mitad del valor de la CIM de EFX.

Por otra parte, el análisis de los resultados obtenidos demuestran que CFX presenta mayor actividad intrínseca y por lo tanto mayor eficacia que su precursor EFX, como lo demuestra el hecho que la mayoría de las concentraciones de CFX fueron capaces de reducir el conteo bacteriano inicial a niveles compatibles con la erradicación bacteriana.

El estudio de la farmacodinamia es fundamental para la optimización de la terapéutica antimicrobiana, en este sentido, los modelos *in vitro* generan importante información acerca de la evolución temporal de la actividad antimicrobiana. Esta información puede ser incorporada a modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK-PD) para predecir la eficacia de diversos esquemas posológicos.

Bibliografía

- 1- Catarsini, O.; Balbo, S.M.; Pugliese, A. & Prato, F. 1995. Experiences with Baytril® in sheep. Vet Med Rev.; 61: 10-12.
- 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.