

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de diclofenac asociado a antimicrobianos frente a *Staphylococcus aureus*.

ejpicco@fcv.unl.edu.ar

Larrateguy, C.A.; Canalis, M.R.; Mostafá, M.M.; Diaz David, D.C.; Picco, E.J.

Cátedra de Farmacología. F.C.V.-U.N.L.

Proyecto CAI+D 2011: “Caracterización de la actividad antimicrobiana *in vitro* del diclofenac frente a *Staphylococcus aureus* valorando su interacción con los antibióticos usados en el tratamiento de mastitis bovina”.

En las últimas décadas varios medicamentos antibacterianos han sido desarrollados y las compañías farmacéuticas han suministrado, generación tras generación, antibióticos mejorados. Sin embargo, el uso masivo y con frecuencia irracional durante períodos prolongados ha dado lugar al desarrollo de resistencia bacteriana. Hoy en día, la presencia de bacterias resistentes sigue su marcha inexorable, por lo que se postula que el descubrimiento de antibióticos más potentes no es la única solución a esta amenaza⁴. Una alternativa a este problema podría ser el empleo de compuestos “no antibióticos” que poseen propiedades antibacterianas. La aplicación conjunta con fármacos antimicrobianos podría resultar en un mejor efecto en comparación a la aplicación de un antibiótico como agente único, posiblemente debido a que los mecanismos de acción son diferentes³. La búsqueda sistemática entre los fármacos “no antibióticos” reveló que el antiinflamatorio no esteroide diclofenac (DCF) posee actividad antibacteriana moderada a fuerte frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, tanto *in vitro* como *in vivo*¹. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la incorporación de DCF potenciaba el accionar de antimicrobianos (ATM) como cefquinoma (CFQ), ciprofloxacina (CPF), cloxacilina (CLX), eritromicina (ERT), florfenicol (FLR), gentamicina (GTM) o tulatromicina (TTM) frente a una cepa de referencia de *S. aureus*.

La metodología utilizada consistió en determinar en primer término la concentración inhibitoria mínima de los ATM frente a la cepa de *S. aureus* (ATCC 29213) mediante la técnica de macrodilución en tubo con caldo Mueller-Hinton. Seguidamente se procedió a evaluar el efecto ejercido por la incorporación de DCF sobre la actividad de cada uno de los ATM, para lo cual los tubos se dispusieron conformando un tablero con diluciones de DCF y los ATM en concentraciones inferiores y superiores a la CIM. En el eje X se colocaron las diluciones de los ATM en concentraciones iguales a 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1 y 2 veces la CIM; en tanto que en el eje Y se colocaron diluciones de DCF en las siguientes concentraciones: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 y 1 vez la CIM. De esta manera quedaron representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones, además de un control. Cada tubo del tablero presentó un volumen final de 1 mL, de los cuales 0,25 se incorporaron con la concentración de los ATM y 0,25 con la de DCF para esa casilla, correspondiendo los restantes 0,5 mL al inóculo bacteriano (10^6 UFC/mL). A continuación se incubó a 35° C durante 24 horas, al cabo de las cuales se procedió a la lectura de los resultados. Con estos datos se determinó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (FICI), el cual se calculó de la siguiente manera: $FICI = FIC_{ATM} + FIC_{DCF}$; donde: $FIC_{ATM} = CIM_{ATM+DCF} / CIM_{ATM}$ y $FIC_{DCF} = CIM_{DCF+ATM} / CIM_{DCF}$. Si el FICI es menor o igual a 0,5 hay sinergismo, en tanto que si el FICI es superior a 4 hay antagonismo².

La CIM determinada para los distintos antimicrobianos fue: cefquinoma; 1,024 µg/mL, ciprofloxacina: 0,128 µg/mL, cloxacilina: 0,256 µg/mL, eritromicina: 0,512 µg/mL, florfenicol: 4,096 µg/mL, gentamicina: 1,024 µg/mL, tulatromicina: 4 µg/mL. Por su parte, la CIM para DCF fue de 256 µg/mL. Al aplicar en forma conjunta los ATM y DCF encontramos que la CIM de TTM descendió a 1 µg/mL luego de la incorporación de DCF a razón de 64 µg/mL. Basándose en el cálculo del FICI se evidenció un efecto sinérgico, ya que el mismo arrojó un resultado de 0,5, puesto que la CIM de TTM se redujo

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

4 veces en presencia de DCF (Tabla 1). Por su parte, la CIM de CPF descendió a 0,016 µg/mL luego de la incorporación de DCF a razón de 32 µg/mL, evidenciándose también un efecto sinérgico con una FICI de 0,25, puesto que la CIM de CPF se redujo 8 veces en presencia de DCF (Tabla 2). Finalmente, no se demostró efecto sinérgico entre DCF y cefquinoma, cloxacilina, eritromicina, florfenicol y gentamicina.

Tabla 1: Representación gráfica de la interacción entre diclofenac y tulatromicina frente a *S. aureus* empleando la técnica del tablero (■ Con crecimiento bacteriano; □ Sin crecimiento bacteriano).

Diclofenac (µg/mL)	256							
	128	■	■	□	□	□	□	□
	64	■	■	■	□	□	□	□
	32	■	■	■	■	□	□	□
	16	■	■	■	■	□	□	□
	0	■	■	■	■	■	□	□
		0	0,250	0,500	1,000	2,000	4,000	8,000
Tulatromicina (µg/mL)								

Tabla 2: Representación gráfica de la interacción entre diclofenac y ciprofloxacina frente a *S. aureus* empleando la técnica del tablero. (■ Con crecimiento bacteriano; □ Sin crecimiento bacteriano).

Diclofenac (µg/mL)	256							
	128	■	□	□	□	□	□	□
	64	■	■	□	□	□	□	□
	32	■	■	■	□	□	□	□
	16	■	■	■	■	□	□	□
	0	■	■	■	■	■	□	□
		0	0,008	0,016	0,032	0,064	0,128	0,256
Ciprofloxacina (µg/mL)								

Es factible que el diferente mecanismo de acción que presentan los ATM sea el condicionante de que DCF potencie el accionar de unos, pero no de otros fármacos. Cabe señalar que si bien se ha demostrado que el DCF puede modificar la CIM de cloxacilina y vancomicina frente al *S. aureus*, este efecto es dependiente de la cepa de empleada, por lo que este sería otro factor a tener en cuenta al momento de interpretar los resultados⁴. Por otra parte, dado las propiedades inmunoregulatoras del DCF, es que se requieren de estudios complementarios empleando modelos *in vivo* para determinar la importancia clínica de esta interacción.

Bibliografía

1-Annadurai, S.; Basu, S.; Ray, S.; Dastidar, S.G.; Chakrabarty, A.N. (1998). Antibacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium. Indian J. Exp. Biol., 36: 86-90.
 2-Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (2006). Instructions to authors. Antimicrob. Agents Chemother. 50:1-21.
 3-Kristiansen, J.E.; Hendricks, O.; Delvin, T.; Butterworth, T.S.; Aagaard, L.; Christensen, J.B.; Flores, V.C.; Keyzer, H. (2007). Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. J. Antimicrob. Chemother, 59:1271-1279.
 4- Riordan, J.; Dupre, J.; Cantore-Matyi, S.; Kumar-Singh, A.; Song, Y.; Zaman, S.; Horan, S.; Helal, N.; Nagarajan, V.; Elasri, M.; Wilkinson, B.; Gustafson, J. (2011). Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 10:30 1-11.