

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*

Lindt C.; Ramirez E.; Piani E.; Rebelindo M.; Lapolla L.; Cusit C.; Aguirre S.; Russi N.; Formentini, E.
morganagroovy@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. La EFX y la CFX pertenecen al grupo de las piperazinil quinolonas y se caracterizan por ser anfóteros, ya que presentan en su estructura un grupo carboxílico y un grupo amino. En un pH cercano a la neutralidad (entre 6 y 8) los dos grupos se hallan cargados en equilibrio (punto isoeléctrico), lo que determina que en un pH de 7,4 estos compuestos sean liposolubles. De esta manera la difusión de estos compuestos a través de las membranas biológicas depende del pH del medio.

Muchos estudios han demostrado que la actividad de las fluoroquinolonas se reduce por la acidificación del medio, y la magnitud de este fenómeno varía según la estructura química de los diferentes compuestos. Se ha postulado que un desvío a la acidez del medio reduce la actividad de las mismas por disminuir su capacidad de difusión (Yildirim et al., 2011)⁽²⁾. El efecto del pH sobre la distribución y la actividad de las FQs y en particular EFX y CFX cobra importancia clínica debido a que el pH no es constante y varía según el líquido biológico del compartimiento tisular considerado (sangre, duodeno, orina, líquido peritoneal entre otros) y el compartimiento subcelular (líquido intracelular, fagolisosoma). Asimismo es necesario considerar el fenómeno de gradiente de pH entre distintos compartimientos y la acumulación de estos compuestos por efecto del fenómeno de atrapamiento iónico. Las FQs se acumulan en leucocitos polimorfonucleares y macrófagos y presentan actividad sobre bacterias de localización intracelular.

En base a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de EFX y CFX sobre una cepa estandarizada de *E. coli* (ATCC 25922), mediante estimación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en los siguientes valores de pH: 7,4 - 6,5 y 5,5. 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 CIM de EFX y CFX se realizó con el método de macrodilución en tubo⁽³⁾ en caldo Muller-Hinton (pH 7,4 ± 0,1) y ajustando el pH del medio de cultivo a 6,5 y 5,5 con ácido ortofosfórico al 0,1%. Se realizaron diluciones 1:1 de EFX y CFX en un intervalo de concentraciones comprendidas en 0,5 y 0,0078 µg/ml y la CIM se determinó como la mínima dilución del antimicrobiano que evitó el crecimiento visible de *E. coli*. Cada determinación se realizó por duplicado.

Los valores estimados de CIM de EFX fueron 0,0312 µg/ml (pH 7,4), 0,125 µg/ml (pH 6,5) y 0,25 µg/ml (pH 5,5), mientras que para CFX los valores fueron 0,0156 µg/ml (pH 7,4), 0,125 µg/ml (pH 6,5) y 0,5 µg/ml (pH 5,5) (Figura 1, Tabla1).

AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

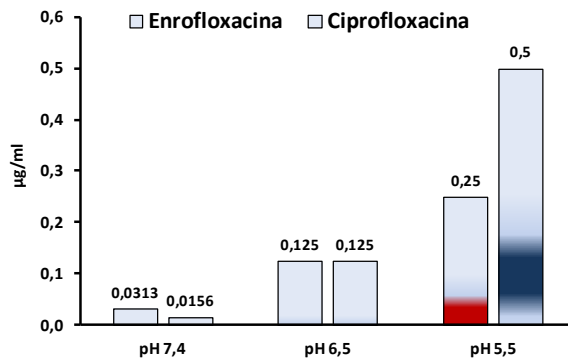


Figura 1. Valores estimados de CIM para enrofloxacin y ciprofloxacin a pH 7,4 - 6,5 y 5,5. Los ensayos se realizaron en caldo Muller-Hinton (pH 7,4 ± 0,1) y ajustando el pH del medio de cultivo a 6,5 y 5,5 con ácido ortofosfórico al 0,1%.

pH	Enrofloxacin			Ciprofloxacin		
	CIM (µg/ml)	R ^a	% en forma no iónica	CIM (µg/ml)	R ^a	% en forma no iónica
7,4	0,0312	1	90-100	0,0156	1	90-100
6,5	0,125	2	25-22,5	0,125	4	12,5-11,3
5,5	0,25	8	12,5-11,3	0,5	32	3,1-2,8

Tabla 1. Valores de CIM, relación entre valores de CIM y % de droga en su forma no iónica (liposoluble) o activa.

^a es la relación entre la CIM determinada a pH 7,4 y la CIM determinada a pH ≠ 7,4.

En este estudio se evaluó la actividad de EFX y CFX pH de 7,4 - 6,5 y 5,5, porque en los animales superiores, dentro de los límites fisiológicos los valores de de pH se desvían hacia la acidez antes que hacia la alcalinidad. Cuando el pH se desvía a la acidez, la actividad de las FQs disminuye significativamente, de manera que se necesitan concentraciones mayores para inhibir el crecimiento visible de *E. coli*. El gradiente de pH entre el líquido intersticial (pH 7,35) y el líquido intracelular (pH 7,1-7,3) determina que la difusión EFX y CFX desde el medio extracelular al intracelular de origen a un fenómeno de atrapamiento iónico, llegando las concentraciones intracelulares ser entre 4 y 10 veces mayores a las extracelulares. Si bien elevadas concentraciones intracelulares no son sinónimo de mayor actividad, la fracción no ionizada (liposoluble) garantizaría concentraciones activas similares adentro y fuera de la célula.

Es conocido que las FQs presentan buena distribución tisular, especialmente en leucocitos, y en particular en macrófagos y polimorfonucleares. Estas células al constituir la primera línea de defensa y migrar al sitio de la injuria, conducirían a las FQs al sitio de infección. La actividad de las bombas de eflujo presentes en la membrana citoplasmática, provocan la extrusión de las FQs al espacio periplasmático favoreciendo el incremento de las concentraciones de estos agentes antibacterianos en el sitio de infección.

La pérdida de actividad provocada por el descenso del pH tanto en el interior de la célula (macrófagos) y como en el sitio de la injuria (inflamación) se vería compensada por un aumento de las concentraciones a causa del fenómeno de atrapamiento iónico. Por otra parte, los leucocitos actuarían como un sistema de transporte fisiológico de las FQs (EFX y CFX) al sitio de la injuria.

Bibliografía

- 1- Catarsini, O.; Balbo, S.M.; Pugliese, A. & Prato, F. 1995. Experiences with Baytril® in sheep. Vet Med Rev.; 61: 10-12.
- 2-Endorgan-Yildrin, Z, Burian, A., Manafi, M. & Zeitlinger, M. 2011. Impact of pH on bacterial growth and activity of recent fluoroquinolones in pooled urine. Res in Microbiol. 162: 249-252.
- 3- 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.