

Influencia del tiempo de contacto y de la concentración en la valoración del efecto posantibiótico de diclofenac frente a una cepa de *Staphylococcus aureus*.

Mostafá, M.M.; Diaz David, D.C. Delgado, A.; Picco, E.J.

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
ejpicco@fcv.unl.edu.ar

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”.

Diclofenac es un conocido agente antiinflamatorio no esteroide ampliamente utilizado en medicina humana así como en medicina veterinaria, que además posee cierta acción antibacteriana frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, entre ellas *S. aureus*⁽¹⁾. Si bien no está completamente dilucidado, se postula que este accionar se debería a que reprime la expresión de genes que participan de la estabilidad y reparación del ADN bacteriano⁽³⁾. Desde los orígenes de la era antibiótica hasta nuestros días, la concentración inhibitoria mínima (CIM) ha sido el principal parámetro farmacodinámico en el que se han basado los diseños de regímenes posológicos de agentes antibacterianos, no obstante, en los últimos años, los ensayos *in vitro* basados en la construcción de curvas de muerte bacteriana y la evaluación de los efectos de persistencia como el efecto posantibiótico (EPA), constituyen herramientas útiles para generar más información acerca de la actividad y la eficacia de varios grupos de antibióticos sobre cepas bacterianas sensibles a los mismos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el tiempo de contacto y la concentración de diclofenac influían en la presentación de EPA para el citado fármaco frente a una cepa de *S. aureus*.

Este estudio se desarrolló empleando como microorganismo de referencia a la cepa de *S. aureus* ATCC 29740 (*Newbould 305*), por haber sido originalmente aislada a partir de un caso de mastitis, y un estándar de diclofenac sódico (97,6%). La CIM de diclofenac sobre esta cepa bacteriana (256 µg/mL) se determinó por el método de macrodilución en tubo, en tanto que el ensayo de EPA se realizó a partir de una modificación de la técnica reportada por Wang & Zhang⁽⁴⁾. Para ello se emplearon inóculos bacterianos ($0,5 \times 10^6$ UFC/mL), que fueron expuestos a concentraciones de diclofenac equivalentes a 0,25, 1 y 4 veces la CIM incubándose a 35° C durante 1 o 2 horas, en tanto que un inóculo se utilizó como testigo, no exponiéndose al fármaco en cuestión. Al cabo de ese tiempo todos los cultivos se diluyeron a razón de 1/1000 con caldo Mueller-Hinton (CMH) a fin de eliminar la actividad del antibacteriano, para luego volver a mantenerse en estufa por 8 horas. Los conteos de bacterias viables se realizaron por extensión de una alícuota del medio de cultivo al inicio del ensayo (hora -1 o -2), inmediatamente luego de haber realizado la dilución (hora 0), y posteriormente a intervalos de una o dos horas hasta transcurridas ocho horas de iniciado el ensayo. En todos los casos el estudio se realizó por duplicado. El EPA fue definido como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano. Para el cálculo de la duración del EPA se utilizó la siguiente ecuación: $EPA = T - C$, donde T es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar el número de bacterias viables en 1 log₁₀ respecto del conteo realizado al momento de haber removido el antibacteriano por dilución y C es el tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 log₁₀ el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo⁽²⁾.

La evolución temporal de la población bacteriana de esta cepa luego de haber sido expuesta a diferentes concentraciones de diclofenac durante una o dos horas respecto al crecimiento control se muestran representadas gráficamente en la Figura 1.

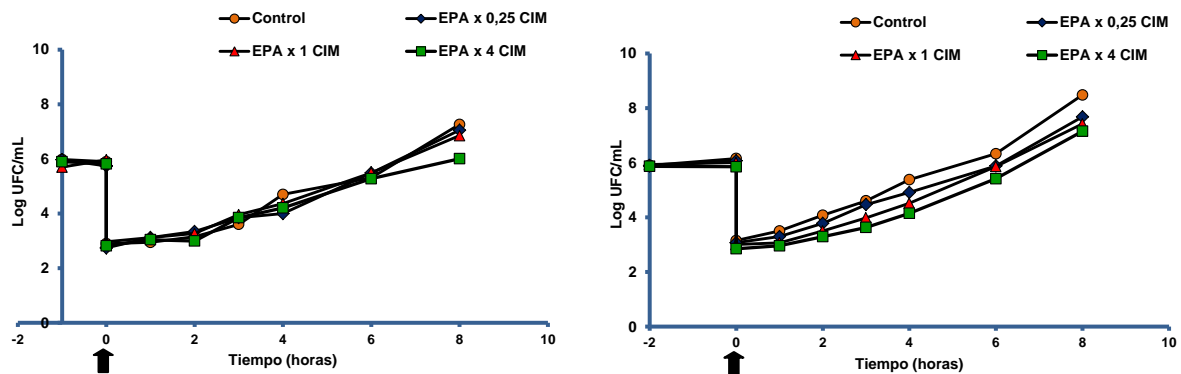


Figura 1. Evolución de la masa bacteriana de *S. aureus* en ensayo de EPA. La flecha negra indica el tiempo en el que se realizó la dilución del antibiótico. Los valores se hallan expresados como \log_{10} UFC/mL.

En el ensayo en el cual el microorganismo fue expuesto a distintas concentraciones de diclofenac durante una hora no se encontraron diferencias significativas en el tiempo requerido para incrementar el número de bacterias viables en 1 \log_{10} , mientras que en el ensayo en el cual el tiempo de exposición fue de dos horas se evidenció que el EPA se incrementaba en forma directamente proporcional a la concentración a la que era expuesta la bacteria. Así paso de $0,284 \pm 0,054$ a $0,905 \pm 0,326$ horas cuando se incrementó la concentración de diclofenac de 0,25 x CIM a 1 x CIM, mientras que a concentraciones de 4 x CIM el tiempo de EPA fue de $1,285 \pm 0,402$ horas.

A pesar que el EPA de diclofenac fue breve y por lo tanto con pocas posibilidades de considerar que este efecto de persistencia pudiese llegar a tener impacto en el diseño de un esquema terapéutico dirigido a tratar una infección provocada por *S. aureus*, debemos tener en cuenta que se trata de un fármaco empleado clínicamente por sus propiedades antiinflamatorias y analgésica. Por otra parte cabe consignar que si bien las concentraciones a las cuales el diclofenac ejerce actividad antibacteriana son altas, las mismas podrían alcanzarse cuando el medicamento es aplicado en forma local mediante preparados de uso tópico. Por todo ello, este trabajo pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios complementarios tendientes a valorar si el EPA de diclofenac condiciona el accionar de fármacos antimicrobianos que se aplican en forma conjunta con este antiinflamatorio, práctica sumamente habitual en la terapéutica veterinaria actual.

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-Craig, W.A. & S. Gudmundsson. (1996). *Postantibiotic effect*, In Antibiotics in laboratory medicine. Ed. Lorian, V. pp. 296-329. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 3- 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
- 4-Wang, I. & Zhang, Y. (2009). Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin, and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. Braz. J. Microb. 40:980-987.