

### Actividad sinérgica *in vitro* de marbofloxacina y suero de cabra adulta sobre *Escherichia coli*

Patricelli, P.<sup>1</sup>; Dell'Elce, A.<sup>1</sup>; Weidmann, C.<sup>1</sup>; Menseguez, S.<sup>1</sup>; Anadon, A.<sup>1</sup>; Albornoz, E.<sup>1</sup>; Bertero, J.<sup>3</sup>; Picco, E.<sup>2</sup>; Formentini, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL

<sup>2</sup>Cátedra de Farmacología, FCV-UNL

<sup>3</sup>Cátedra de Semiología, FCV-UNL

[p.patricelli@hotmail.com](mailto:p.patricelli@hotmail.com)

Los ensayos de laboratorio utilizados para evaluar *in vitro* la eficacia de los antibióticos no permiten valorar el impacto de la respuesta inmune del individuo, siendo que esta es necesaria para la resolución exitosa de cualquier enfermedad infecciosa. Por lo tanto, la eficacia observada en estos ensayos equivale a la que se observaría en individuos inmuno suprimidos como el caso de equinos que padecen anemia infecciosa o inmuno comprometidos como en el caso de terneros que no han calostrado<sup>3</sup>. En este estudio se evaluó *in vitro* el efecto sinérgico de suero de cabras y marbofloxacina (MFX) sobre una cepa de *Escherichia coli*. Se utilizó una cepa estandarizada de *Escherichia coli* (ATCC 25922), un estándar de MFX de pureza conocida, suero de cabras adultas estéril (SC) y caldo Mueller Hinton (MH). Se determinó la CIM de MFX en MH y MH-SC al 50% v/v mediante el método de macrodilución en tubo<sup>1</sup> dentro de un intervalo de concentraciones de MFX comprendido entre 0,0078 y 1 µg/mL. El recuento de bacterias viables en placa del tanto del crecimiento control como en el resto de las concentraciones de MFX se realizó al inicio del ensayo y al final del mismo, transcurridas 24h de incubación a 25°C. La CIM se determinó por inspección visual como la menor concentración de MFX que impidió el crecimiento bacteriano visible. Para cada concentración de MFX la eficacia fue terminada por diferencia entre el log del conteo bacteriano al final del ensayo (log N<sub>24</sub>) y del conteo bacteriano al inicio del ensayo (log N<sub>0</sub>), siendo tres los puntos de corte a) acción bacteriostática sin modificación del conteo bacteriano inicial (log N<sub>0</sub>), b) acción bactericida, con reducción de 3 log respecto del log N<sub>0</sub> (eficacia del 99,9%) y c) erradicación bacteriana con reducción de 4 log respecto del log N<sub>0</sub> (Eficacia del 99,99%)<sup>2</sup>. Para estimar las concentraciones necesarias para obtener los tres niveles de eficacia, los datos de eficacia antibacteriana (log N<sub>24</sub>-log N<sub>0</sub>) obtenidos en cada concentración de MFX fueron ajustados mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con el modelo de respuesta máxima que se presenta en la ecuación 1.

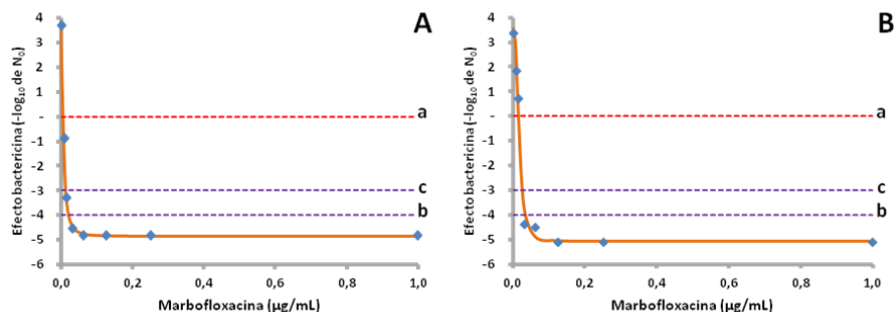
$$E = E_0 + \frac{E_{max} \cdot C^\alpha}{CE_{50}^\alpha + C^\alpha} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde  $E$  es la eficacia antibacteriana expresada como (log N<sub>24</sub>-log N<sub>0</sub>),  $E_0$  es la eficacia basal,  $E_{max}$  es la máxima eficacia esperable,  $CE_{50}$  es la concentración de MFX que logra el 50% de la eficacia máxima,  $C$  es la concentración de MFX y  $\alpha$  es el coeficiente de sigmoidicidad. Las concentraciones de MFX capaces de lograr los tres niveles de eficacia CIM, CBM y CEBM se estimaron con la ecuación 2.

$$C = \left[ \frac{(E - E_0) \cdot CE_{50}^\alpha}{E_{max} + E_0 - E} \right]^{\frac{1}{\alpha}} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde  $C$  es la concentración de MFX necesaria para obtener un efecto antibacteriano determinado. El resto de los símbolos fueron explicados al pie de la ecuación 1. Los resultados del ajuste del log<sub>10</sub> de

bacterias sobrevivientes a las concentraciones de MFX en MH y MH-SC se presentan en la figura 1 y los valores estimados de CIM, CBM y CEBM se presentan en la tabla 1.



**Figura 1.** Valores de eficacia de concentraciones crecientes de marbofloxacina sobre *E. coli* ATCC 29213 en MH (A) y MH-SC (B) ajustados con el modelo sigmoideo de respuesta máxima descrito en la ecuación 1. Las líneas de puntos horizontales representan: a) actividad bacteriostática (CIM), b) actividad bactericida (CBM) y c) actividad de erradicación bacteriana (CEBM).

**Tabla 1.** Valores observados de CIM de marbofloxacina sobre *E. coli* ATCC 29213 en MH y MH-SC y Los valores de CIM, CBM y CEBM estimados con la ecuación 2 derivada del modelo sigmoideo de respuesta máxima (Ecuación 1).

Medio de cultivo	MH	MH+SC	MH/MH-SC
CIM obs.	0,03120	0,00780	4
CIM est.	0,01625	0,00660	2,46
CBM est.	0,02630	0,01398	1,88
CEBM est.	0,03391	0,02169	1,56

La actividad conjunta de los anticuerpos naturales y el complemento como primera línea de defensa inespecífica ante la invasión de microorganismos a la circulación general explicaría la actividad bactericida intrínseca del SC. Esta actividad antibacteriana adicional del SC a la actividad de MFX sobre *E. coli* (ATCC 29213), hace pensar en que el valor de la CIM estimada en MH estaría sobredimensionada respecto de lo que podría suceder en el escenario *in vivo*. Sin embargo, la magnitud de esta respuesta adicional es variable de un animal a otro y probablemente no sea representativa de la situación en la cual un individuo padece un cuadro infeccioso determinado, en el cual podría estar disminuida. Otra lectura de los resultados obtenidos es la necesidad de garantizar en una población adecuadas medidas sanitarias como vacunaciones, desparasitaciones y adecuado nivel nutricional entre otras, a fin de garantizar una adecuada respuesta inmune inespecífica ante el ingreso a la circulación de microorganismos indeseables, ya que el antibiótico ayuda y acompaña a la restauración de los procesos fisiológicos que fueran afectados por un cuadro infeccioso. La CIM de MFX estimada *in vitro* en MH representaría la actividad basal necesaria de este antibiótico, a partir de la cual diseñar un esquema posológico asumiendo la peor de las situaciones posibles, actuando como un factor de seguridad ante el variable status inmunológico de los individuos de una población.

- 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. 3<sup>rd</sup> Edition, Document M37-A3, Volume 28, Number 7. Wayne, Pennsylvania USA.
- 2- Patricelli, P.; Ramirez, E.; Presa Rossa, C.; Dell'Elce, A.; Formentini, E. (2017). Efecto de la persistencia bacteriana sobre la eficacia de la enrofloxacin y ciprofloxacina frente a una cepa de *Escherichia coli*. Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias 16: 30-38.
- 3- White, R. (2001). What *in vitro* models of infection can and cannot do?: potential drawbacks of *in vitro* pharmacodynamic studies. Pharmacotherapy. 21(11S).