

## Sinergismo potenciativo entre enrofloxacin y ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922

Ramírez E.; Aguirre S.; Piani E.; Lindt C.; Presa Rossa C.; Russi N.; Formentini E.  
Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL  
[egram88@gmail.com](mailto:egram88@gmail.com)

“Actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*; influencia del pH, tamaño del inóculo y actividad antibacteriana intrínseca de suero de bovinos y búfalos” n° 501 201101 00068 LI CAI+D 2011. Resolución C.S. n° 481/13.

Enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) son antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) que son ampliamente usados en Medicina Veterinaria. Como todas las FQs presentan gran actividad sobre *E. coli*. Tras la administración parenteral de EFX a bovinos a una dosis de 5 mg/kg, esta es transformada parcialmente a CFX en hígado en glándula mamaria y en macrófagos. La máxima concentración observada de EFX en suero bovino (SBO) es de 0,60 µg/ml y la relación entre las concentraciones plasmáticas de CFX y EFX (CFX/EFX) es de aproximadamente 0,7.

El objetivo de este estudio fue evaluar mediante curvas de muerte bacteriana (CMB) la actividad antibacteriana de EFX y CFX por separado y juntas (EFX-CFX) con una relación CFX/EFX de 0,7 para determinar la existencia de sinergismo entre los dos antibióticos.

Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). Los valores de CIM de EFX y CFX se estimaron previamente con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008)<sup>1</sup>, siendo de 0,0312 µg/ml para EFX y de 0,0156 µg/ml para CFX. Las CBM se realizaron según el procedimiento descrito por García Rodríguez y col., (2001)<sup>2</sup>. La concentración de cada antibiótico se expresó en referencia al valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX-CFX se expresaron como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico tal como se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Concentraciones mixtas de EFX-CFX donde la relación CFX/EFX es 0,7. La concentración de cada antibiótico se expresa en referencia al valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX-CFX se expresan como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico.

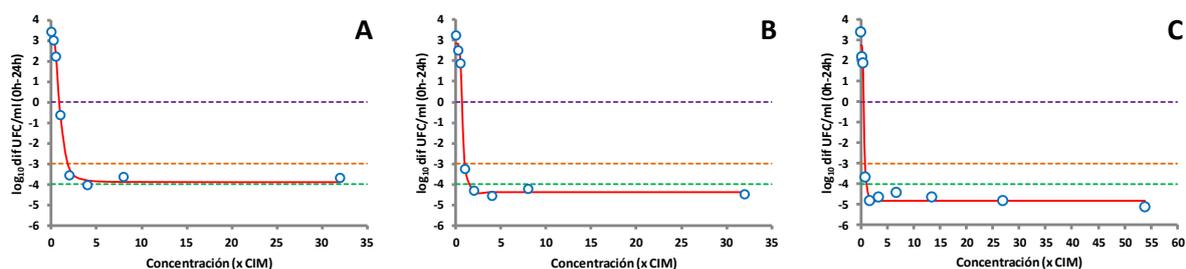
Concentración	EFX (µg/ml)	CFX (µg/ml)	EFX (x CIM)	CFX (x CIM)	Suma (x CIM)
1	0,7	0,49	22,44	31,41	53,85
2	0,35	0,245	11,22	15,71	29,92
3	0,175	0,123	5,61	7,85	13,46
4	0,088	0,061	2,80	3,93	6,73
5	0,044	0,031	1,40	1,96	3,37
6	0,022	0,015	0,70	0,98	1,68
7	0,011	0,008	0,35	0,49	0,84
8	0,005	0,004	0,18	0,25	0,42
9	0,0025	0,002	0,09	0,12	0,21

Los recuentos de bacterias viables se realizaron a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h y éstos se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). El límite de detección de la técnica fue de 5 UFC/ml. Tanto en las CMB individuales (EFX y CFX) como en la CMB mixta (EFX-CFX), la eficacia de cada concentración sobre *E. coli* ATCC 25922 fue evaluada a las 24 horas de exposición como la diferencia entre el log<sub>10</sub> del conteo bacteriano a las 24 h. de exposición (N<sub>z</sub>) y el log<sub>10</sub> del conteo bacteriano inicial (N<sub>0</sub>). Los valores de eficacia obtenidos fueron ajustados con el siguiente modelo sigmoideo de respuesta máxima:  $E = E_0 - [(E_{max} \cdot C^n)/(C_{50}^n + C^n)]$ ; donde E es el efecto bactericida expresado como N<sub>z</sub>-N<sub>0</sub>, E<sub>0</sub> es el efecto bactericida basal, E<sub>max</sub> es el efecto bactericida máximo, C<sub>50</sub> es la concentración de antimicrobiano que logra el 50% del E<sub>max</sub>, C es la concentración del antibiótico y n es el coeficiente de sigmoidicidad. El ajuste se realizó por regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con el software de regresión no lineal ADAPT II (BMSR,

University of Southern California, USA). En todos los casos el esquema de ponderación utilizado fue 1/y. La eficacia de las concentraciones mixtas de EFX-CFX se evaluó con tres criterios:

- Sin reducción del número de bacterias del conteo bacteriano inicial o efecto bacteriostático.
- Reducción de  $-3 \log_{10}$  del conteo bacteriano inicial ( $\log_{10}N_0$ ) o efecto bactericida.
- Reducción de  $-4 \log_{10}$  del conteo bacteriano inicial ( $\log_{10}N_0$ ) o erradicación bacteriana.

A partir de los parámetros estimados con el modelo sigmoideo de respuesta máxima y mediante interpolación se estimaron para EFX, CFX y EFX-CFX las concentraciones equivalentes a la CIM necesarias para obtener los efectos bacteriostáticos, bactericidas y de erradicación bacteriana. Los valores de bacterias viables a las 24 horas expresadas como  $\log_{10}N_z - \log_{10}N_0$  se presentan en la figura 1.



**Figura 1:** Eficacia antibacteriana de concentraciones de EFX (A), CFX (B) y EFX-CFX (C) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 tras 24 de exposición. La eficacia se expresa como  $\log_{10}N_0 - \log_{10}N_z$ . Las concentraciones se expresan en referencia al valor estimado de la CIM para cada antibiótico o la sumatoria en caso de EFX-CFX.

Los valores de los parámetros estimados por el modelo sigmoideo de respuesta máxima se presentan en la tabla 2 y las concentraciones de EFX, CFX y EFX-CFX referidas a la CIM para obtener un efecto bacteriostático, bactericida y de erradicación bacteriana se presentan en la tabla 3.

**Tabla 2:** Valores de los parámetros estimados por el modelo sigmoideo de respuesta máxima para EFX, CFX y EFX-CFX.

Parámetros	EFX	CFX	EFX-CFX
$E_0$ ( $\log_{10}N_0$ )	3,20	2,83	2,74
$E_{max}$ ( $\log_{10}N_z$ )	7,07	7,22	7,54
$\log_{10}N_0 - \log_{10}N_z$	-3,87	-4,39	-4,80
$C_{50}$ (x CIM)	0,95	0,72	0,66
n	3,06	5,10	5,10

**Tabla 2:** Concentraciones referidas a la CIM para obtener un efecto bacteriostático (0), bactericida ( $-3 \log_{10}$ ) y de erradicación bacteriana ( $-4 \log_{10}$ ).

Eficacia	x CIM		
	EFX	CFX	EFX-CFX
0	0,89	0,66	0,59
-3	1,96	0,96	0,83
-4	NC	1,27	1,00

Las concentraciones individuales y mixtas de EFX y CFX se expresaron en referencia al valor de la CIM para cada antibiótico, así se logró estandarizar la actividad de manera independiente de las concentraciones individuales o mixtas, permitiendo así identificar diferencias en la actividad antibacteriana debida a interacciones entre los antibióticos. La concentración mixta de EFX-CFX presenta mayor eficacia ( $E_{max}$ ) que cada antibiótico por separado, logrando una reducción de  $-4,8 \log_{10}$  respecto del  $\log_{10}N_0$ , al tiempo que presenta un menor valor de  $C_{50}$  respecto de EFX y CFX por separado. Las concentraciones referidas a la CIM de EFX-CFX para obtener los efectos bacteriostático, bactericida y de erradicación bacteriana fueron menores a los valores individuales de EFX y CFX. Estos resultados permiten inferir un efecto de sinergismo potenciativo de EFX y CFX actuando en conjunto, tal como sucedería en un organismo viviente.

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, vol. 28, third ed. Document M37-A3. Wayne, Pennsylvania, USA.

2-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.