

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

Enrofloxacin; ¿una quinolona con actividad antibacteriana concentración dependiente o mixta?

Rebelindo M.; Lapolla L.; Cusit C.; Aguirre S.; Lindt C.; Ramirez E.; Piani E; Russi N.; Formentini, E.

rebe416@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 con actividad concentración dependiente y la eficacia de los regímenes posológicos de estos antibióticos se basa en que la relación entre el área bajo la curva (ABC) estimada en 24 h y la concentración inhibitoria mínima (CIM) debe ser ≥ 125 para bacilos Gram (-), o que la relación entre la máxima concentración observada (Cmax) y la CIM para los patógenos sensibles sea $>10^{(1)}$. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre diferentes concentraciones de enrofloxacin (EFX) y las velocidades bactericidas de éstas sobre una cepa de *E. coli*, con un ensayo de curva de muerte bacteriana (CMB). Se utilizó un cepa de *E. coli* (ATCC 25922) y un estándar de EFX (Sigma-Aldrich® Argentina). La CIM se determinó por el método de macrodilución en tubo⁽²⁾. La CMB se realizó a concentraciones equivalentes a 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 y 32 veces la CIM⁽³⁾. La muestras se tomaron a tiempo cero y a las 0,5 - 1 - 2 - 3,5 - 5- 10 y 24 h y se cuantificó el número de unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml). La velocidad bactericida de cada concentración de EFX se determinó por ajuste del ln de las UFC/ml en cada tiempo mediante regresión lineal simple sin ponderación: $y = a + (b.x)$, donde y corresponde al número de bacterias viables expresado como UFC/ml, a es el \log_{10} del número inicial de bacterias viables (N_0), b es la constante de primer orden aparente de eliminación bacteriana (k_{elb}) y x es el tiempo. La semivida de eliminación bacteriana ($t_{1/2elb}$) para cada concentración se calculó como $\ln 2/k_{elb}$. La CIM de EFX fue de 0,0312 $\mu\text{g/ml}$. La velocidad bactericida de EFX se incrementó a medida que se incrementaron sus concentraciones y cuando el número de bacterias viables decreció un $93,7 \pm 6,15$ respecto de N_0 , (2 y 5 horas de inicio del ensayo) la velocidad bactericida disminuyó y se volvió similar para todas las concentraciones (Figura 1A). Para estimar la k_{elb} de cada concentración de EFX debieron descartarse del análisis de regresión lineal todos los valores de UFC/ml cercanos y menores al 0,23 % del valor de N_0 . Los resultados del ajuste de los datos experimentales se presentan en la Figura 1B.

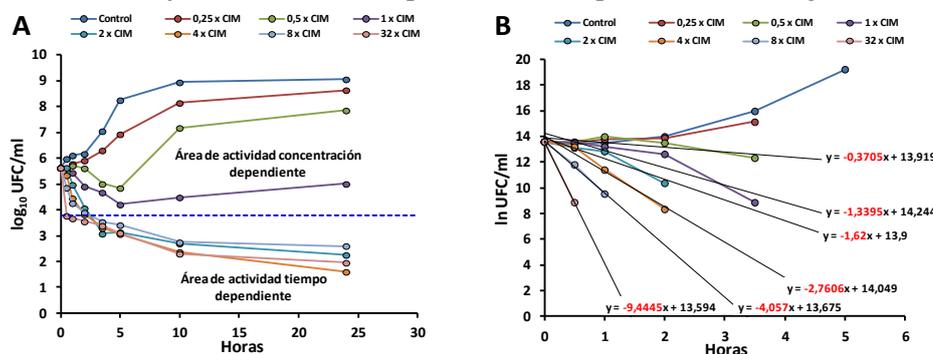


Figura 1. (A) Curvas de muerte de *E. coli* (ATCC 25922) en presencia de concentraciones constantes de enrofloxacin. Las líneas de puntos horizontales delimitan el área de transición entre la actividad concentración dependiente (área superior) y tiempo dependiente (área inferior). (B) Ajuste del ln de las unidades formadoras de colonia por ml obtenidas en cada tiempo de muestreo con un modelo de regresión lineal simple sin ponderación.

AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

Para realizar el ajuste se descartaron los conteos de bacterias viables menores al 0,23% del conteo bacteriano inicial.

Los valores estimados de k_{elb} y sus correspondientes valores de $t_{1/2elb}$ de las concentraciones de EFX se presentan en la Tabla 1.

Enrofloxacin ($\mu\text{g/ml}$)	k_{elb} (h^{-1})	$t_{1/2elb}$ (min)
0,0000 Control	-	-
0,0078 0,25 x CIM	-	-
0,0156 0,5 x CIM	0,37	112,3
0,0312 1 x CIM	1,34	31,0
0,125 2 x CIM	1,62	25,7
0,25 4 x CIM	2,76	15,1
0,5 8 x CIM	4,06	10,3
2 32 x CIM	9,44	4,4

Tabla 1. Valores de las constantes de eliminación bacteriana de primer orden aparente (k_{elb}) obtenida con diferentes concentraciones de enrofloxacin sobre *E. coli* (ATCC 25922) con su correspondiente semivida de eliminación bacteriana ($t_{1/2elb}$).

Los resultados obtenidos muestran que dentro del intervalo de concentraciones testeadas, EFX presentó actividad antibacteriana concentración dependiente ya que el incremento de velocidad bactericida sobre *E. coli* (ATCC 25922) expresada como k_{elb} fue paralelo al incremento de las concentraciones ensayadas. Por definición el índice PK-PD predictor de su eficacia debería ser C_{max}/CIM (>10). Sin embargo, como EFX presenta una semivida de eliminación de aproximadamente 3 horas, se utiliza el índice ABC/CIM (≥ 125) que considera también el efecto del tiempo de exposición de las bacterias al antibiótico.

No obstante las elevadas velocidades de eliminación bacteriana observadas para la mayoría de las concentraciones de EFX (Tabla 2), solo las comprendidas entre 2 x CIM y 64 x CIM lograron eliminar el 99,9% de N_0 luego de 24 horas de exposición al antibiótico, sin embargo ese tiempo no fue suficiente para eliminación del 99,99% de N_0 (erradicación bacteriana), excepto para 4 x CIM.

Un hallazgo interesante lo constituye el quiebre en la cinética de eliminación bacteriana que se observa entre las 2 y 5 horas de iniciado el ensayo. Esto ocurre cuando el número de bacterias viables se reduce a menos del 0,23% de N_0 . Este fenómeno fue definido como resistencia adaptativa y puede ser explicado por la selección de subpoblaciones bacterianas con menor velocidad de crecimiento, que se tornan menos sensibles a los antibióticos como EFX, que actúan durante la fase replicación bacteriana.

Otro hallazgo interesante, es que una vez que la velocidad bactericida se redujo, esta se tornó similar para todas las concentraciones testeadas y la eficacia pasó a depender del tiempo de contacto del antibiótico con las bacterias. Esto haría suponer que EFX es un antibiótico con actividad mixta (concentración y tiempo dependiente).

De lo hallado surgen dos interrogantes:

- ¿Es EFX un antibiótico con actividad concentración dependiente o mixta?
- ¿Será necesario proponer otro tipo de índice PK-PD predictor de su eficacia?

Estos interrogantes plantean nuevos objetivos de investigación para proyectos futuros.

Bibliografía

- 1- Levison, M. 2004. Pharmacodynamic of antimicrobial drugs. Infect Dis Clin North Am. 18: 451-465.
- 2- 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.
- 3- 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.