

EFFECTO DEL TAMAÑO DEL INOCULO BACTERIANO EN LA ACTIVIDAD DE CEFQUINOMA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE VACAS AFECTADAS POR MASTITIS

Melgares, Francisco

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral

Director: Picco, Eduardo Jesús

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: Cefquinoma - *Staphylococcus aureus* - Inóculo bacteriano

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es uno de los problemas más importantes de la producción lechera, ocasionando enormes pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con producción intensiva. Si bien los programas efectivos y económicos para el control de la mastitis bovina se basan fundamentalmente en la prevención, la intervención terapéutica es una parte importante del programa de control de este cuadro clínico infeccioso. Por otra parte, a pesar de que en la actualidad el profesional veterinario dispone de un verdadero arsenal terapéutico, las infecciones recidivantes provocadas por *Staphylococcus aureus* generan difíciles problemas sanitarios, obligando a un replanteo de las estrategias terapéuticas. Al respecto, el principal criterio de base científica empleado para seleccionar al agente antibacteriano es la susceptibilidad del microorganismo al fármaco en cuestión, lo cual se efectúa a través de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), ya que los patrones de susceptibilidad pueden variar no solamente de acuerdo con la región geográfica, sino también de un rodeo a otro (Hossain *et al.*, 2017).

Es importante remarcar que los estudios de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante el empleo de la CIM se realizan sobre un inóculo bacteriano de 1×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL). Ahora bien, en muchas afecciones la densidad bacteriana es superior, así, en un estudio desarrollado en terneros con bronconeumonía donde se evaluaron tejidos de pulmón, amígdalas y tráquea se reportó que el 12% de las muestras tenía más de 10^8 UFC/g y el 50% de las muestras tenía más de 10^5 UFC/g (Griffin *et al.*, 2010). En el caso de mastitis se ha visto que las muestras de leche en las primeras etapas de la infección puede contener hasta 1×10^8 UFC/mL (Constable *et al.*, 2017). Dado este hecho, donde la densidad bacteriana es sustancialmente mayor en la infección que las probadas en un ensayo de CIM, surge el interrogante respecto a la verdadera dinámica de interacciones microorganismo / fármaco cuando se encuentran densidades bacterianas superiores, por lo que en este caso se plantea evaluar si el tamaño del inóculo bacteriano afecta el accionar de cefquinoma, una cefalosporina de cuarta generación de uso veterinario, tal como se ha reportado ya para otros betalactámicos (Lenhard and Bulman, 2019).

Proyecto: Determinación de la ventana de selección de mutantes para antimicrobianos frente a cepas autóctonas causantes de mastitis bovina.

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Eduardo J. Picco

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue determinar si el tamaño del inóculo bacteriano afecta el accionar de cefquinoma frente a cepas de *S. aureus* aisladas de vacas afectadas de mastitis.

METODOLOGÍA

Se emplearon tres cepas de campo de *S. aureus*, aisladas a partir de muestras de leche provenientes de vacas afectadas de mastitis. La mismas fueron identificadas fenotípicamente por caracterización basada en las pruebas de catalasa y coagulasa, la capacidad de hidrolizar manitol en agar manitol salado, la presencia de DNAsa y pirrolidonicarilamidasa, y la producción de acetoina a partir de piruvato por la prueba de Voges-Proskauer. Además, se empleó una cepa de referencia, *S. aureus* ATCC 29740 (Newbould 305), la cual se eligió por ser una cepa ATCC aislada a partir de un caso de mastitis.

Para todos los ensayos farmacodinámicos se utilizó un estándar de sulfato de cefquinoma, con un título de 801 mg/g de cefquinoma, el cual se conservó refrigerado a -20°C .

En una primera etapa se estimó la CIM mediante la técnica de macrodilución en caldo siguiendo las recomendaciones establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), donde un inóculo de densidad estándar (DE) conteniendo $0,5 \times 10^6$ UFC/mL, y otro de alta densidad (DA) conteniendo 1×10^8 UFC/mL de cada una de las cepas de *S. aureus* se enfrentó a diluciones aritméticas 1:1 de cefquinoma en un rango concentraciones de entre 0,256 y 8,192 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos se realizaron por duplicado incubándose en estufa a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. La CIM fue definida como la menor dilución de cefquinoma que evitó el desarrollo bacteriano visible.

Por otra parte, se construyeron curvas de crecimiento bacteriano, donde las 4 cepas, con diferentes densidad de bacteria, fueron expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM, 4 x CIM, 8 x CIM y 16 x CIM tomando como referencia el valor de CIM estimado para cada cepa y densidad del inóculo, incubándose en estufa a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$. De cada cultivo se obtuvieron alícuotas de 0,1 mL a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas, las que fueron sometidas a diluciones seriadas en solución salina isotónica a 4°C . Una alícuota de cada última dilución fue extendida sobre la superficie de una placa de agar e incubada a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Todo el procedimiento se realizó por duplicado. Los valores de UFC/mL fueron estimados multiplicando el número de UFC/placa por el factor de corrección que derivó de la dilución seriada correspondiente a cada muestra en particular. En cada curva de muerte y crecimiento, el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

La actividad antibacteriana de cada concentración de cefquinoma a cada tiempo de muestreo se evaluó como bactericida cuando se evidenciaba una reducción superior a 3 logaritmos decimales en el número inicial de bacterias viables (CLSI, 2015), lo que equivale a una reducción del 99,9 % del tamaño inicial del inóculo. Cuando la reducción era inferior a 3 logaritmos, el efecto se consideró bacteriostático.

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas con el test de Mann-Whitney. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

RESULTADOS / CONCLUSIONES

La CIM de cefquinoma frente a los inóculos de densidad estándar fue de 0,512 a 1,024 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que cuando el estudio se efectuó empleando el inóculo de alta densidad, la misma fue de entre 2 y 4 veces más alta, aunque no arrojó diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 1).

Tabla 1: Valores de concentración inhibitoria mínima ($\mu\text{g/mL}$) de cefquinoma sobre 4 cepas de *S. aureus* determinada con diferentes densidades de inóculo.

Cepa	0,5 x 10 ⁶ UFC/mL	1 x 10 ⁸ UFC/mL
ATCC 29740	0,512	1,024
SA-01	0,512	1,024
SA-02	0,512	2,048
SA-03	1,024	2,048

En la figura 1 podemos ver la evolución de la masa bacteriana luego de ser expuesta a diferentes concentraciones de cefquinoma.

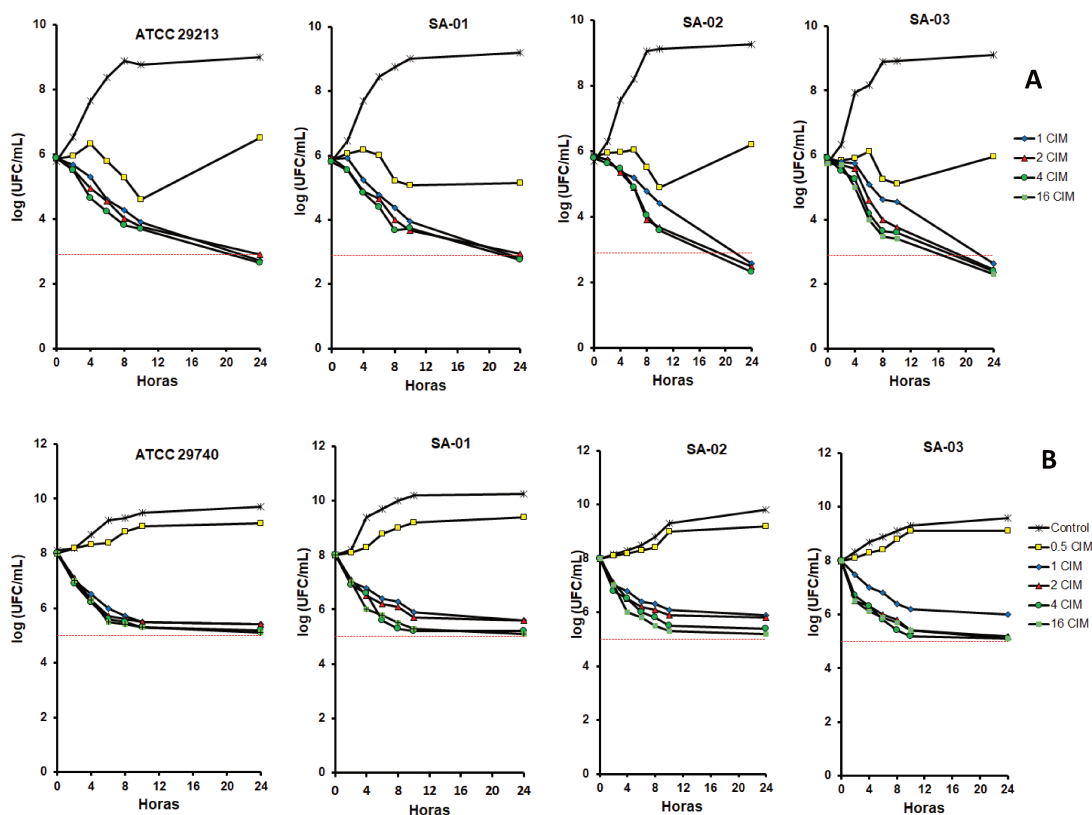


Figura 1. Evolución temporal de la masa bacteriana con distintas densidades del inóculo inicial de cuatro cepas de *S. aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas. **A:** 0,5 x 10⁶ UFC/mL, **B:** 1 x 10⁸ UFC/mL. En cada tiempo de muestreo los valores se

hallan expresados en \log_{10} UFC/mL. Símbolos: * crecimiento control; ■ 0,5 x CIM; ◆ 1 x CIM; ▲ 2 x CIM; ● 4 x CIM, ■ 4 x CIM. La línea punteada horizontal corresponde a una reducción de 3 \log_{10} respecto del número inicial de bacterias viable.

Cuando se empleó el inóculo con DE la actividad de la cefquinoma fue bacteriostática a 0,5 x CIM, en tanto que 24 horas de exposición de una concentración de cefquinoma equivalente a 1 x CIM redujo la carga bacteriana inicial en un $91,0 \pm 16,5\%$. La mayor eficacia de cefquinoma se manifestó ya a concentraciones de 2 x CIM, siendo similar a la registrada a 4 y 16 x CIM, las cuales luego de 24 horas de contacto lograron una reducción del 99,9% sobre el número inicial de bacterias viables. Finalmente, como se mencionara, los resultados muestran la importancia que tiene el tiempo de exposición de las bacterias a cefquinoma para garantizar su eficacia. Por otra parte, cuando se empleó el inóculo a DA podemos ver que se registró un crecimiento de la población bacteriana a concentraciones sub inhibitorias. Del mismo modo puede verse que ni las concentraciones mas altas (16 x CIM) consiguieron un efecto bactericida, ya que en ninguna de las cepas se produjo una reducción en la masa bacteriana de al menos 3 logaritmos. Estos resultados son similares a los reportados por Guo y colaboradores (2016), quienes indican que luego de enfrentar un inóculo de alta densidad de *Streptococcus suis* a cefquinoma no consiguieron lograr efecto bactericida aún a concentraciones 32 veces superiores a la CIM. Estos autores atribuyeron este fenómeno a que los betalactámicos son agentes activos contra la pared celular, y por lo tanto sus efectos letales dependen de que el patógeno se encuentre en una fase de crecimiento activo. En este estudio nosotros también evidenciamos una menor tasa de crecimiento del patógeno en el grupo de DA ($1,81 \pm 0,31 \log_{10}$ UFC/mL) versus en el grupo de DE ($3,36 \pm 0,13 \log_{10}$ UFC/mL), por lo que muy probablemente este también sea el causante de la menor eficacia letal de cefquinoma en el grupo DA de *S. aureus*, donde los altos requerimientos nutricionales, así como las sustancias de desechos limitan el crecimiento del microorganismo en la curva control.

Estos resultados sugieren que cuando nos encontremos en presencia de una masitits por *S. aureus* con alta carga bacteriana, sería necesario incrementar la concentración de cefquinoma para conseguir el efecto bactericida característico de este grupo antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10.

Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H., Gruenberg, W. 2017. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 11° Ed. Chapter 20, Diseases of the Mammary Gland. (pp. 1904–2001) St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.

Griffin, D., Chengappa, M.M., Kuszak, J., McVey, D.S. 2010. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 26 (2): 381-394

Guo, C., Liao, X., Wang, M., Wang, F., Yan, C., Xiao, X., Sun, J., Liu, Y. 2016. *In vivo* pharmacodynamics of cefquinome in a neutropenic mouse thigh model of *Streptococcus suis* Serotype 2 at varied initial inoculum sizes. Antimicrob. Agents. Chemother, 60(2): 1114–1120.

Hossain, M.K., Paul, S., Hossain, M., Islam, M., Alam, M. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. Austin J Vet Sci & Anim Husband, 4 (1): 1-12.

Lenhard, J., Bulman, Z. 2019. Inoculum effect of β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother., 74 (10): 2825-2843