

## PERSISTENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE CEFQUINOMA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

FUCHS, A.<sup>1,3</sup>, GUMIY, D.<sup>1,3</sup>, CERRA, M.<sup>1,3</sup>, PICCIOCHI, N.<sup>1,3</sup>, CARO OBEID, M.<sup>1,3</sup>, RUBIO, M.<sup>2</sup>, BARONI, E.<sup>1,4</sup>, PICCO, E.<sup>1,5</sup> & FORMENTINI, E.<sup>1,5</sup>

### RESUMEN

En este estudio la actividad de cefquinoma sobre *Staphylococcus aureus* fue evaluada por estimación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), construcción de curvas de muerte bacteriana, ensayos de efecto posantibiótico (EPA) y efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM). Los valores de CIM se hallaron entre 0,5 µg/ml y 1,0 µg/ml y las curvas de muerte bacteriana mostraron que una concentración equivalente a 4 x CIM no presentó mayor eficacia que una concentración equivalente a 2 x CIM. Cefquinoma presentó un insignificante EPA (0,55 ± 0,70 h), por el contrario, el EPA sub-CIM fue significativamente mayor (3,55 ± 0,60 h). En conclusión, la información generada por el ensayo de EPA sub-CIM acerca de la actividad persistente de cefquinoma sobre *Staphylococcus aureus* a concentraciones subinhibitorias es clínicamente más relevante que la actividad persistente observada en el ensayo de EPA.

*Palabras clave:* Cefquinoma, *Staphylococcus aureus*, Curva de muerte bacteriana, Efecto posantibiótico, Efecto posantibiótico sub-CIM.

### SUMMARY

#### **Persistence activity of subinhibitory concentrations of cefquinome against *Staphylococcus aureus*.**

In this study the antibacterial activity of cefquinome on *Staphylococcus aureus* strains was evaluated by estimation of minimum inhibitory concentration (MIC), construction of concentration-killing curves and postantibiotic effect (PAE) and postantibiotic sub-MIC effect (PA SME) assays. The MIC values were 0.5 µg/mL to 1.0 µg/mL and concentration-killing curves showed that antibiotic concentration of 4 x MIC did not shown bactericidal effect for a longer period of 2 x MIC. Cefquinome presented a negligible PAE (0.55 ± 0.70 h), on the contrary, the PA SME was significantly longer

---

1.- Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Kreder 2805 (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe, Argentina. Telefax: (03496) 426400. Email: eformentini@fcv.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 5 de abril de 2011 y aceptado para su publicación el 25 de julio de 2011.

(3.55 ± 0.60 h). In conclusion, the information generated by PA SME assay about the persistent activity of ceftquinome on *Staphylococcus aureus* strains at subinhibitory concentrations is clinically more relevant than the persistent activity observed in PAE assay.

**Key words:** Cefquinome, *Staphylococcus aureus*, Concentration-Killing curve, Postantibiotic effect, Postantibiotic sub-MIC effect.

## INTRODUCCIÓN

La actividad de los agentes antibacterianos debe ser cuantificada a fin de emplear a éstos en el tratamiento de enfermedades infecciosas de una manera segura y racional. En base a esta necesidad, varios índices de eficacia antibacteriana que combinan información farmacocinética y farmacodinámica han sido definidos y usados por diferentes autores para cuantificar y predecir la eficacia de los agentes antibacterianos (Schentag, 1999; Sanchez-Recio *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2004).

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 ha basado los diseños de regímenes posológicos de agentes antibacterianos (Mueller *et al.*, 2004).

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) (Odenholt, 2001), han llegado a ser 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 (Liu *et al.*, 2002).

No obstante la utilidad de estas metodologías, todas presentan una limitante y es que en todos los casos la actividad antibacteriana se evalúa mediante la exposición de

un inóculo bacteriano de densidad conocida a concentraciones fijas de antibiótico, lo cual es una situación que no se presenta en un organismo vivo, donde las concentraciones del antibiótico en el sitio de localización bacteriana varían en el tiempo a causa de los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolización y/o excreción (Toutain *et al.*, 2002), por lo que se deduce que la magnitud de la actividad de este, tampoco permanece constante en el tiempo.

Un procedimiento alternativo para evaluar *in vitro* la actividad y la eficacia de los agentes antibacterianos es el estudio del efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM). La ventaja de este modelo consiste en simular la variación temporal de las concentraciones de antibiótico tal y como ocurriría luego de la administración de una dosis del mismo a un organismo vivo.

En el ensayo de EPA sub-CIM, las bacterias luego de haber sido expuestas a concentraciones suprainhibitorias (>CIM) del antibiótico durante un corto período de tiempo (normalmente 1 a 2 horas), son seguidamente expuestas a concentraciones subinhibitorias (<CIM) durante un período de tiempo variable (4 horas o más), simulando la breve exposición de las bacterias a concentraciones suprainhibitorias durante el pico de concentración plasmática y seguidas de la exposición más o menos prolongada a bajas concentraciones del antibiótico, similares a las que se presentan durante la fase de elimi-

nación de la curva de disposición plasmática, tal y como sucede en un escenario *in vivo* (Odenholt, 2001; Mueller *et al.*, 2004).

Las cefalosporinas son antibióticos que pertenecen al grupo de los betalactámicos y que presentan un amplio rango de actividad antibacteriana y se clasifican según su desarrollo histórico en cefalosporinas de primera a cuarta generación.

Cefquinoma es una cefalosporina de cuarta generación, resistente a la betalactamasa codificada por plásmidos (Murphy *et al.*, 1994), y que es empleada en bovinos para el tratamiento de neumonía y mastitis provocadas por agentes bacterianos sensibles a la misma (Bishop, 2001).

Muchos antibióticos presentan persistencia de su actividad antibacteriana cuando sus concentraciones se hallan por debajo de la CIM. Se ha demostrado que los antibióticos betalactámicos exhiben un EPA clínicamente significativo sobre bacterias Gram positivas como en el caso *Staphylococcus aureus* (Craig & Gudmundsson, 1996). Sin embargo, existe poca información acerca del EPA sub-CIM de las cefalosporinas de cuarta generación sobre bacterias Gram positivas, por lo que la propuesta de este ensayo fue investigar la actividad antibacteriana de cefquinoma sobre cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* mediante la estimación de la CIM; la construcción de curvas de muerte bacteriana y la estimación del EPA y del EPA sub-CIM.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Las bacterias usadas en este ensayo fueron cuatro cepas de *Staphylococcus aureus*. Tres de ellas; SA-5507, SA-007 y SA-008 fueron cepas autóctonas provenientes de muestras de leche de vacas en lactación con signos clínicos de mastitis en la zona rural de

Esperanza, Departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe, Argentina, en tanto que como testigo fue usada la cepa ATCC 29213. Las cepas autóctonas fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.

### Antibiótico

Como referencia, se empleó la actividad de un estándar de sulfato de cefquinoma de pureza conocida (94,68%) proporcionado gentilmente por Intervet Argentina S.A.

### Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Los inóculos bacterianos fueron suspensiones en solución salina isotónica de bacterias provenientes de colonias en fase de crecimiento. Las suspensiones presentaron una turbidez equivalente al grado 0,5 de la escala McFarland, la que se correlaciona con un número de bacterias viables equivalente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en caldo Müller-Hinton (CMH; Britania, Buenos Aires, Argentina) hasta lograr la suspensión bacteriana madre con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

La determinación de la CIM de cefquinoma sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* se realizó por el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008). El medio de cultivo fue preparado según las instrucciones del fabricante, esterilizado en autoclave y almacenado en refrigerador a 7°C, no trascurriendo más de doce horas desde su preparación hasta su uso.

Diluciones aritméticas 1:1 de cefquinoma en un rango de 0,016 a 4 µg/ml fueron inoculadas con 1 ml de suspensión bacteriana madre ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) logrando una concentración bacteriana final de  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml. Las diluciones fueron incubadas a  $35 \pm 1$  °C y la

lectura de los resultados se realizó luego de 20 horas de incubación. La CIM fue definida como la menor dilución de cefquinoma que evitó el desarrollo bacteriano visible.

### **Construcción de curvas de muerte bacteriana**

La actividad y la eficacia de concentraciones fijas de cefquinoma sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* se evaluaron mediante curvas de muerte bacteriana durante 24 horas, las que se realizaron según modificación de la técnica reportada por García Rodríguez y col., (2001). Brevemente, en el ensayo se usaron los inóculos de cada cepa bacteriana con una densidad aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. La densidad bacteriana fue verificada mediante el conteo de UFC/placa. Para la construcción de las curvas de muerte bacteriana, todas las cepas fueron expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM, logrando una concentración bacteriana final de  $0,5 \times 10^8$  UFC/ml e incubadas en estufa a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . A su vez, cada una de ellas fue cultivada en ausencia de antibiótico e incubada en estufa bajo idénticas condiciones para la construcción de las curvas de crecimiento testigo.

De cada cultivo se obtuvieron alícuotas de 0,1 ml a los siguientes tiempos; 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, las que fueron sometidas a diluciones seriadas en solución salina isotónica a  $4^\circ\text{C}$ . 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. Las curvas de crecimiento y muerte de cada cepa bacteriana fueron construidas por triplicado. 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 bactericida de cada concentración de cefquinoma a cada tiempo se estimó considerando como punto de corte una reducción de 3 logaritmos decimales en el número inicial de bacterias viables (CLSI, 1999), lo que equivale a una reducción del 99,9 % del tamaño inicial del inóculo.

### **Determinación del efecto posantibiótico (EPA)**

Los ensayos de EPA se realizaron mediante modificación de la técnica reportada por Wang & Zhang (2009). Brevemente, para cada una de las cepas bacterianas, un cultivo en medio líquido con una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/ml fue expuesto a una concentración de cefquinoma equivalente a 4 x CIM. Para cada cepa fue realizado un cultivo bacteriano sin antibiótico para que sirviera de testigo. El medio de cultivo en presencia de cefquinoma fue incubado durante 2 horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , posteriormente el antibiótico fue removido del medio mediante dilución 1:1000 con medio de cultivo sin antibiótico. A fin de estandarizar el conteo de bacterias viables en el cultivo control, éste también fue diluido 1:1000 con medio de cultivo sin antibiótico.

Los conteos de bacterias viables se realizaron por extensión de una alícuota del medio de cultivo, incubación y posterior conteo de UFC/placa según el método descripto anteriormente a los siguientes tiempos: al inicio del ensayo (hora 0), inmediatamente luego de haber realizado la dilución (hora 2), y posteriormente a intervalos de una hora hasta transcurridas diez horas de iniciado el ensayo.

El EPA es 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 y minutos) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar el número de bacterias viables en  $1 \log_{10}$  respecto del conteo realizado al momento de haber removido el antibiótico por dilución y  $C$  es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo control en incrementar  $1 \log_{10}$  el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo (Craig & Gudmundsson, 1996).

Los ensayos de EPA y de crecimiento testigo de cada cepa bacteriana fueron realizados por triplicado, y el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

#### **Determinación del efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM)**

Los ensayos de EPA sub-CIM se realizaron mediante modificación de la técnica reportada por Wang & Zhang (2009). Brevemente, para cada una de las cepas bacterianas los cultivos en medio líquido (CMH) con una densidad de  $1 \times 10^6$  UFC/ml fueron expuestos a una concentración de ceftinoma equivalente a  $4 \times$  CIM. Para cada cepa fue realizado un cultivo bacteriano sin antibiótico para que sirviera de testigo.

Luego de incubar los medios de cultivo en presencia de ceftinoma durante 2 horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , las concentraciones del antibiótico fueron reducidas a un nivel equivalente a  $0,25 \times$  CIM por dilución 1:16 con medio de cultivo sin antibiótico. A fin de estandarizar el conteo de bacterias viables en el cultivo control, éste también fue diluido 1:16 con

medio de cultivo sin antibiótico.

Los conteos de bacterias viables se realizaron según el método descrito anteriormente en el ensayo de EPA. El EPA sub-CIM fue definido por Odenholt-Tornqvist *et al.* (1992) mediante la siguiente ecuación:

$$EPA \text{ sub-CIM} = T_{pa} - C$$

donde  $T_{pa}$  es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo de microorganismos tratados con el antibiótico y luego reexpuestos a concentraciones subinhibitorias ( $<$ CIM) en incrementar  $1 \log_{10}$  el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo y  $C$  es el tiempo (en horas y minutos) que tarda el cultivo control en incrementar en  $1 \log_{10}$  el número de bacterias viables respecto del conteo realizado al momento de la dilución del medio de cultivo (Odenholt-Tornqvist *et al.*, 1992).

Los ensayos de EPA sub-CIM de cada cepa bacteriana fueron realizados por triplicado, y el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica.

#### **Análisis estadístico**

Debido a que la manipulación física de los inóculos durante el ensayo puede provocar un retraso en el inicio de la fase de crecimiento, se optó por utilizar el criterio de corte propuesto por Aldridge (2002), considerando como efecto positivo de persistencia de actividad antibiótica a un valor de EPA o EPA sub-CIM mayor a una hora respecto del tiempo en el cual se realizó la remoción del antibiótico por dilución.

La comparación estadística entre los valores estimados de EPA y EPA sub-CIM se realizó mediante el test de  $t$  de diferencia de medias de Student de dos colas, fijando el nivel de significancia en un 5% ( $p = 0,05$ ).

## RESULTADOS

El valor estimado de CIM de cefquinoma para las cepas ATCC 29213, SA-5507, y SA-008 fue de 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , en tanto que para la cepa SA-007 este valor fue de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ .

La evolución temporal de la población bacteriana de las cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* expuestas a concentraciones fijas de cefquinoma se muestran representadas gráficamente en la Figura 1.

La actividad antibiótica de cefquinoma se evaluó teniendo en cuenta la eficacia acumulativa de las concentraciones en el medio de cultivo, entendiéndose ésta como el

porcentaje de bacterias eliminadas respecto del número de bacterias inicial (hora 0) al final del experimento (hora 24).

La actividad antibiótica de cefquinoma se hizo manifiesta en todas las concentraciones investigadas, sin embargo en todos los casos las concentración equivalentes a 4 x CIM no presentaron mayor eficacia que la observada a concentraciones equivalentes a 2 x CIM (Fig. 1), las que al final del ensayo (24 horas) exhibieron una reducción del 99,9% del número inicial de bacterias viables (Cuadro 1).

La evolución temporal de la población bacteriana de las cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* luego de haber sido

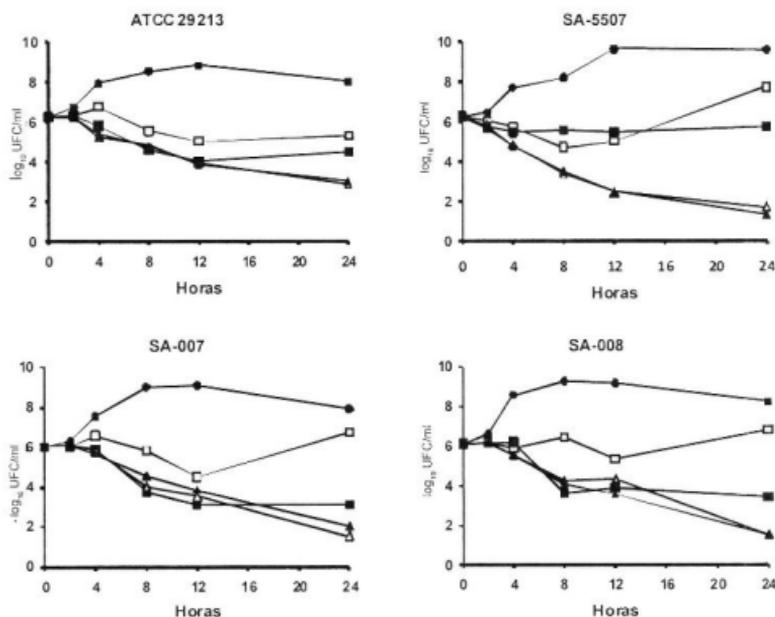


Figura 1. Evolución temporal de la masa bacteriana (UFC/ml) de cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de cefquinoma durante 24 horas. En cada tiempo de muestreo los valores se hallan expresados en  $\log_{10}$  UFC/ml. Símbolos: ● crecimiento control; ■ 0,5 x CIM; ▲ 1 x CIM; □ 4 x CIM.

*Cuadro 1: Evolución temporal del tamaño del inóculo (UFC/ml) de cuatro cepas de Staphylococcus aureus expuestas a concentraciones constantes de cefquinoma (0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM) durante 24 horas. Los valores positivos deben interpretarse como porcentaje de reducción del número inicial de bacterias y los valores negativos deben ser interpretados como porcentaje de incremento del número inicial de bacterias. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desvío estándar.*

Horas	0,5 x CIM	1 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2	-2,34 $\pm$ 26,7	1,34 $\pm$ 43,8	8,44 $\pm$ 38,1	16,0 $\pm$ 37,1
4	-85,9 $\pm$ 62,2	36,3 $\pm$ 46,8	74,3 $\pm$ 22,4	78,6 $\pm$ 18,4
8	26,7 $\pm$ 92,2	93,4 $\pm$ 11,1	98,6 $\pm$ 1,31	97,9 $\pm$ 1,85
12	92,2 $\pm$ 6,05	95,3 $\pm$ 8,52	99,4 $\pm$ 0,70	99,7 $\pm$ 0,28
24	-951,7 $\pm$ 478	91,0 $\pm$ 16,5	99,9 $\pm$ 0,02	99,9 $\pm$ 0,03

expuestas a concentraciones suprainhedoras de cefquinoma (4 x CIM) durante dos horas (EPA) y la evolución temporal de la población bacteriana de las cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* luego de haber sido expuestas a concentraciones suprainhedoras de cefquinoma (4 x CIM) durante dos horas y reexpuesta a concentraciones subinhibitorias (0,25 x CIM) durante ocho horas (EPA sub-CIM) se muestran representadas gráficamente en la Figura 2.

Los valores estimados de EPA y EPA sub-CIM se presentan resumidos en el Cuadro 2.

Los resultados obtenidos, muestran que el EPA de cefquinoma sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* fue de corta duración (0,55  $\pm$  0,70 horas). Por el contrario, el EPA sub-CIM inducido por la reexposición de las bacterias a una concentración equivalente a 0,25 x CIM presentó valores de 3,55  $\pm$  0,60 horas, los que fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos en el EPA.

Un hallazgo importante observado en el ensayo de EPA sub-CIM, es que en los inóculos que fueron reexpuestos a concentraciones subinhibitorias (0,25 x CIM), el recuento de bacterias viables continuó decreciendo durante un periodo de 1 a 2 horas luego de realizada la dilución del antibiótico,

lo cual indica que la actividad antibacteriana no fue completamente suprimida durante el ensayo de EPA sub-CIM.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio describen muchos aspectos de la farmacodinamia de cefquinoma sobre *Staphylococcus aureus*, especialmente en lo que respecta a la persistencia de su actividad a concentraciones subinhibitorias.

Los valores estimados de CIM para cefquinoma sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en este ensayo se hallaron en un rango de 0,5 a 1  $\mu\text{g/ml}$ . Estos valores presentan similitud respecto de lo informado por otros autores como Limbert *et al.*, (1991) quienes reportaron un valor de CIM<sub>50</sub> de 0,781  $\mu\text{g/ml}$  y una CIM<sub>90</sub> de 1,563  $\mu\text{g/ml}$ . Posteriormente Guérin-Faubleé *et al.* (2003) reportaron valores de CIM entre 0,25 a 1  $\mu\text{g/ml}$ , los que concuerdan con los valores hallados en este estudio.

El punto de corte para identificar resistencia a la actividad de cefquinoma por parte de cepas bacterianas aisladas en bovinos ha

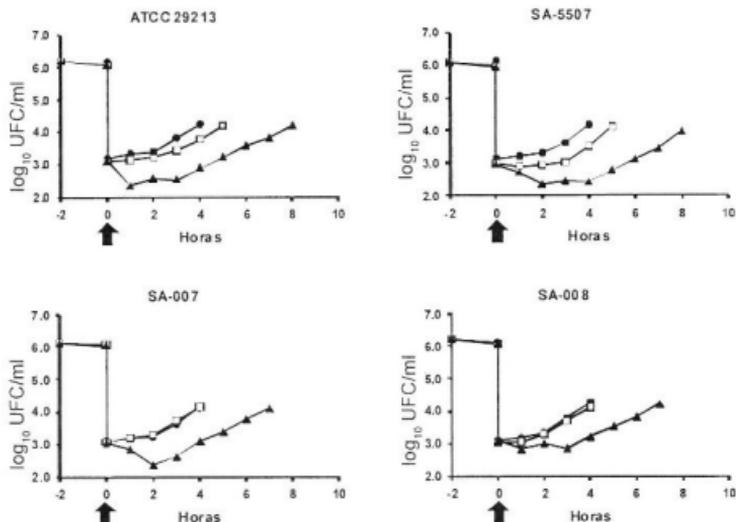


Figura 2. Evolución de la masa bacteriana de *Staphylococcus aureus* en ensayos de EPA y EPA sub-CIM. En el ensayo de EPA los inóculos se expusieron a concentraciones supra-inhíbitoras de cefquinoma ( $4 \times \text{CIM}$ ) durante 2 horas y posteriormente se eliminó al antibiótico del medio de cultivo. En el ensayo de EPA sub-CIM, los inóculos se expusieron a concentraciones supra-inhíbitoras ( $4 \times \text{CIM}$ ) y seguidamente éstas se redujeron a concentraciones sub-inhíbitoras ( $0,25 \times \text{CIM}$ ) mediante dilución. En cada gráfico, 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. Símbolos: ● control; □ EPA; ▲ EPA sub-CIM.

sido fijado en  $4 \mu\text{g/ml}$  (AVID, 1999), por lo que las tres cepas autóctonas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en este estudio pueden ser consideradas sensibles a la actividad de cefquinoma.

Los resultados obtenidos en las curvas de muerte bacteriana, muestran que cefquinoma presenta sobre *Staphylococcus aureus* un comportamiento farmacodinámico que se corresponde con un antibiótico cuya actividad es dependiente del tiempo de contacto con las bacterias sensibles.

La actividad de cefquinoma fue fluctuante en función de las concentraciones ensayadas, siendo bacteriostática o levemente

bactericida a una concentración de  $0,5 \times \text{CIM}$ . Esta actividad se incrementó con una concentración de  $1 \times \text{CIM}$ , con la cual a las 24 horas logró una reducción del  $91,0 \pm 16,5\%$  del número inicial de bacterias viables (Cuadro 1).

La eficacia de cefquinoma sobre *Staphylococcus aureus* sólo se manifestó a concentraciones de  $2 \times \text{CIM}$  y  $4 \times \text{CIM}$ , las cuales con un tiempo de exposición de 24 horas lograron una reducción del  $99,9\%$  del número de bacterias viables presentes al inicio del ensayo.

Los resultados obtenidos permiten inferir que probablemente no se podría lograr un

Cuadro 2: Efecto posantibiótico (EPA) y efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM) de cefquinoma sobre cuatro cepas de *Staphylococcus aureus*.

Parámetros	ATCC 29213	SA-5507	SA-007	SA-008	Promedio (n=4)	DE	CV%
EPA (horas)	1,11	1,18	0,09	-0,20	0,55*	0,70	128,5
EPA sub-CIM (horas)	4,11	4,02	3,04	3,02	3,55*	0,60	16,8

\* $p = 0.0006$  para un test de  $t$  de diferencia de medias de dos colas.

incremento mayor de eficacia de cefquinoma con concentraciones mayores a  $4 \times$  CIM. Por otra parte, los resultados muestran la importancia del tiempo de contacto entre este antibiótico y las bacterias para garantizar la eficacia antibacteriana.

El EPA de cefquinoma fue demasiado corto  $0,50 \pm 0,70$  horas (Cuadro 2), como para 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 *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en la evaluación de estos resultados, debe considerarse que un ensayo *in vitro* de EPA, constituye un procedimiento de laboratorio en el cual un inóculo bacteriano es expuesto a elevadas concentraciones de un antibiótico durante un periodo breve de tiempo, para posteriormente remover el mismo del medio de cultivo, constituyendo esto una situación que nunca se produce como tal en un organismo viviente, en donde las concentraciones de un antibiótico no desaparecen de un momento a otro, sino que fluctúan a causa de los procesos farmacocinéticos (Toutain *et al.*, 2002).

En vista de lo expuesto, el modelo *in vitro* empleado para determinar la existencia y evaluar el EPA sub-CIM, puede ser considerado como un modelo semidinámico, en donde las bacterias luego de ser expuestas a concentraciones elevadas de antibiótico ( $>$ CIM) durante un corto periodo de tiempo (1 a 2

horas), son seguidamente expuestas a bajas concentraciones ( $<$ CIM), imitando de esta manera la exposición dinámica al antibiótico tal y como ocurriría en el sitio de localización de las bacterias en un organismo viviente (Mueller *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la actividad de concentraciones subinhibitorias de cefquinoma sobre cepas de *Staphylococcus aureus* que habían sido previamente expuestas a concentraciones suprainhibitorias, lograron retrasar el inicio de la fase de crecimiento bacteriano por un periodo de tiempo equivalente a  $3,55 \pm 0,60$  horas, el cual fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al valor observado en el ensayo de EPA.

La actividad de cefquinoma demostrada en el ensayo de EPA sub-CIM sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, debe ser interpretada en función del impacto que esta actividad persistente tendría en un escenario *in vivo*. La mayoría de las veces la actividad de un antibiótico observada *in vivo* es mayor a la observada *in vitro*, y eso es así porque en los ensayos de laboratorio no se tiene en cuenta el papel que juega la respuesta inmune del individuo, la cual es indispensable para el éxito de la terapéutica antibiótica, por lo que debe considerarse a los antibióticos como una terapia adyuvante de las defensas naturales del individuo (Blondeau, 2009).

Desde hace mucho tiempo se ha observa-

do que las bacterias en fase posantibiótica son más sensibles a la fagocitosis y muerte por la acción de leucocitos y se llamó a esto; efecto posantibiótico estimulador de leucocitos (PALE) (Mc Donald *et al.*, 1981; Prul *et al.* 1981), y en un individuo que está recibiendo un tratamiento antibiótico, el PALE se adjunta al EPA sub-CIM prolongando la actividad del antibiótico aún en presencia de muy bajas concentraciones de este.

En este sentido, muchos autores han reconocido que el EPA sub-CIM es un parámetro farmacodinámico que puede llegar a tener gran impacto sobre el diseño de regímenes terapéuticos (Cars and Odenholt-Tornqvist, 1993; Lim and Yun, 2001; Odenholt, 2001), ya que en un tratamiento antibiótico, las concentraciones subinhibitorias siempre están presentes, ya sea durante la fase de eliminación terminal (dosis única) o entre dos administraciones (tratamiento a intervalos regulares), y el EPA sub-CIM probablemente refleje de manera más próxima la actividad *in vivo* de una antibiótico de lo que lo haría el EPA.

El significado clínico del EPA sub-CIM reside entonces en considerar que el retraso en el crecimiento bacteriano actúa a manera de "buffer" cuando durante la fase de eliminación la concentración del antibiótico cae a niveles subinhibitorios, al tiempo que las bacterias durante esta etapa parecen ser más susceptibles a la actividad antibacteriana de los sistemas de defensa del organismo.

No obstante la persistencia de la actividad de concentraciones subinhibitorias de cefquinoma sobre *Staphylococcus aureus* observada en este ensayo, son necesarios más estudios para obtener información que permita incorporar el EPA sub-CIM como parámetro farmacocinético-farmacodinámico en el diseño de los regímenes terapéuticos de este antibiótico.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio pudo realizarse gracias al soporte económico proporcionado por la Universidad Nacional del Litoral Argentina en el marco de la convocatoria de proyectos CAI+D 2006.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALDRIDGE, K. E. 2002. Comparison of the post-antibiotic effect (PAE) induced by ceftazoxime, ceftriaxone, cefoxitin, ampicillin-sulbactam, and ticarcillin-clavulanate against selected isolates of *Bacteroides fragilis* and *B. thetaiotaomicron*. *Anaerobe*. 8: 295-299.
- AVID (Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik). 1999. Appendix 40, 5.
- BISHOP, Y. 2001. The Veterinary Formulary, 5th edn. The Pharmaceutical Press, London.
- BLONDEAU, J. 2009. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet. Dermatol*. 20: 383-396.
- CARS, O. & I. ODENHOLT-TORNQVIST. 1993. The pos-antibiotic sub-MIC effect *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother*. 31: 159-166.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2008. Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; Approved guideline, 3rd Edition, Document M37-A3. Volume 28, Number 7. Wayne, Pennsylvania USA.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, formerly National Committee for Clinical

- Laboratory Standards) 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. M26-A. Wayne, Pennsylvania USA.
- CRAIG, W.A. & S. GUDMUNDSSON.** 1996. Postantibiotic effect. In *Antibiotics in laboratory medicine*. Ed. Lorian, V. pp. 296-329. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- GARCÍA RODRÍGUEZ, J.A.,<sup>†</sup>; R. CANTÓN; J.E. GARCÍA SÁNCHEZ; M.I. GÓMEZ-LUS; 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.
- GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; G. CARRET & P. HOUFFCHMITT.** 2003. *In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *The Vet. Record* 152: 466-471.
- Mc DONALD, P.J.; B. L. WETHERALL & H. PRULL.** 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev. Infect. Dis.* 3: 38-44.
- MURPHY, S.P.; M.E. ERWIN & N.R. JONES.** 1994. Cefquinome (HR 111V) - *in-vitro* evaluation of a broad spectrum cephalosporin indicated for infections in animals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 20:49-55.
- MUELLER, M.; A. DE LA PEÑA & H. DERENDORF.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 369-377.
- LIM, J. & H. YUM.** 2001. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of erythromycin, roxithromycin, tilmicosin, and tylosin on *Pasteurella multocida*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17: 471-476.
- LIMBERT, M.; D. ISERT; N. KLESEL; A. MARKUS; K. SEEGER; G. SEIBERT & E. SCHRINNER.** 1991. Antibacterial activities *in vitro* and *in vivo* and pharmacokinetic of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 14-19.
- LIU, P.; M. MULLER & H. DERENDORF.** 2002. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus time concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 19:285-290.
- ODENHOLT, I.** 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17: 1-8.
- ODENHOLT-TORNQVIST, I.; E. LÖWDIN & O. CARL.** 1992. Postantibiotic sub MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 36:1852-1858.
- PRUUL, H.; S. L. WETHERALL & P. J. Mc DONALD.** 1981. Enhanced susceptibility of *E. coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes after "*in vitro*" incubation with chloramphenicol. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 19: 945-951.
- SANCHEZ-RECIO, M.M.; C.I. COLINO & A. SANCHEZ-NAVARRO.** 2000. A retrospective analysis of pharmacokinetic-pharmacodynamic indices as indicators of the clinical efficacy of ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:321-328.
- SCHENTAG, J. J.** 1999. Pharmacokinetic and pharmacodynamic surrogate markers: studies with fluoroquinolones in patients. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 56:S21-S24.
- TOUTAIN, P.L.; J. R. E. DEL CASTILLO & A. BOUSQUET-MÉLOU.** 2002. The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res. Vet. Sci.* 73: 105-114.
- WANG, I. & Y. ZHANG.** 2009. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin, and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. *Braz. J. Microb.* 40:980-987.