

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE TULATROMICINA SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN PRESENCIA DE SUERO Y LEUCOCITOS BOVINOS

CERRA, M.¹; FUCHS, A.¹; STIEFEL, S.¹; GUMIY, D.¹;
NOTARO, U.¹; DIAZ, P.¹; BARONI, E.¹; PICCO, E.¹ & FORMENTINI, E.¹

RESUMEN

Tulathromicina es un antibiótico que presenta actividad sobre *Staphylococcus aureus*, pero su potencia bactericida es baja en ensayos *in vitro*. Un modelo *in vitro* de curva de muerte bacteriana que incorporó elementos de inmunidad innata presentes en el suero bovino junto con la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares, mostró que la eficacia de este antibiótico se incrementó a concentraciones subinhibitorias. Los resultados obtenidos muestran que un modelo *in vitro* de curva de muerte bacteriana que incorpora elementos de inmunidad innata, puede generar información más confiable acerca de la actividad *in vivo* de un antibiótico.

Palabras clave: Tulathromicina, *Staphylococcus aureus*, Farmacodinamia, Suero bovino, Leucocitos polimorfonucleares.

SUMMARY

***In vitro* activity of tulathromycin against *Staphylococcus aureus* strains in presence of bovine serum and bovine leukocytes.**

Tulathromycin is an antibiotic that exhibits activity against *Staphylococcus aureus*, but its bactericidal potency is low in *in vitro* assays. An *in vitro* model of concentration-killing curve incorporating elements of innate immunity present in bovine serum in conjunction with the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes, shown that the efficacy of this antibiotic increased at sub-inhibitory concentrations. The obtained results shown that an *in vitro* pharmacodynamic model of concentration-killing curve which incorporate elements of innate immunity, can generate more reliable information about the *in vivo* activity of an antibiotic.

Key words: Tulathromycin, *Staphylococcus aureus*, Pharmacodynamic, Bovine serum, Polymorphonuclear leukocytes.

Trabajo realizado dentro del proyecto Tipo II PI-33-164, CAI+D 2009

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: eforment@fcv.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 5 de abril de 2011 y aceptado para su publicación el 18 de agosto de 2011.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la evaluación de la actividad de los antibióticos *in vitro*, pretende simular condiciones presentes en el escenario *in vivo*, estudiando la interacción entre el antibiótico, las bacterias y el organismo vivo, para que esa información pueda ser empleada en el diseño y la optimización de esquemas posológicos más eficaces.

Muchas veces, la actividad *in vivo* de un antibiótico es mayor a la observada *in vitro*; esto es así, porque en un organismo vivo interactúan además de antibióticos y bacterias muchos otros factores. Cuando se administra un antibiótico a un individuo, hay que considerar además de la farmacocinética, las relaciones que se establecen con la respuesta del sistema inmune del mismo (DeLeo *et al.*, 2009). Al respecto, la experiencia clínica indica que la eficacia de la terapéutica antimicrobiana, depende de la función normal de los sistemas de defensa del paciente (Kristian *et al.*, 2007; Mehrzad *et al.*, 2009).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones. Entre sus componentes se hallan moléculas de reconocimiento como la familia de receptores toll-like, la lectina fijadora de manosa y las ficolinas, cuya función es la de reconocer estructuras microbianas. Por otra parte, la respuesta inmune innata cuenta con tres tipos de mecanismos efectores que permiten destruir a las bacterias; los péptidos antimicrobianos, el sistema de complemento y las células fagocíticas (Beutler, 2004).

La participación de células fagocíticas como neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos es fundamental en esta primera línea de defensa, ya que éstas células capturan y destruyen una enorme variedad de patógenos (Janeway & Medzhitov, 2002) y constituyen el elemento clave de las defensas de un organismo sobre las infecciones

bacterianas (Kantari *et al.*, 2008). Se han descrito dos tipos de fagocitosis; opsonina dependiente y opsonina independiente. La fagocitosis opsonina dependiente consiste en la unión de las moléculas de complemento e inmunoglobulinas a la pared de los microorganismos, promoviendo la adherencia y la fagocitosis por parte de los leucocitos (Annemick *et al.*, 2001). La fagocitosis opsonina independiente, se produce por reconocimiento de ligandos específicos presentes en la pared de de los microorganismos por parte de los receptores scavenger y toll like presentes en la membrana de las células fagocíticas (Ofek *et al.*, 1995).

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMNs), son la primera línea de defensa durante una infección aguda y son considerados los componentes más importantes de la respuesta inmune innata de base celular (Choi *et al.*, 2009). Los PMNs destruyen a los agentes infecciosos fagocitados mediante una amplia variedad de sistemas oxígeno dependiente y oxígeno independientes (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Los sistemas oxígeno dependientes se basan en la producción de compuestos con actividad oxidante, mientras que los sistemas oxígeno independiente involucran los procesos de quimiotaxis, fagocitosis, degranulación, liberación de enzimas líticas y péptidos con actividad bactericida (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

En base a lo expuesto, se asume que la fagocitosis y la muerte bacteriana por acción de los PMNs son factores esenciales para la resolución clínica de las infecciones bacterianas con o sin tratamiento antibiótico, por lo que la interacción entre PMNs y bacterias, va a marcar el equilibrio entre el estado de enfermedad y salud del individuo.

Los primeros en estudiar el efecto de la respuesta inmune en la eliminación de bacterias expuestas previamente a la penicilina fueron Rammelkamp & Keefer (1943). Poste-

riormente, se reportó que la exposición de bacterias a concentraciones efectivas de antibióticos con diferentes mecanismos de acción produce alteraciones en la estructura externa de éstas (Greenwood & O'Grady, 1973; Klainer & Roussel, 1974) alterando la estructura de sus antígenos de superficie (Schultz *et al.*, 1969; Milatovic *et al.*, 1983) y disminuyendo el grosor de la pared bacteriana (Efrati *et al.*, 1976; Lorian & Waluschka, 1972). Como consecuencia de estos cambios estructurales, las bacterias se tornan más sensibles a la fagocitosis por los PMNs con posterior muerte intracelular, llamándose a este fenómeno efecto posantibiótico estimulador de leucocitos (PALE) (Mc Donald *et al.*, 1981; Pruul *et al.*, 1981, 1986; Pruul & Mc Donald, 1990). Este efecto de persistencia da lugar a que la actividad fagocítica leucocitaria complete la actividad del antibiótico, aunque este se halle en bajas concentraciones o esté ausente en el sitio de localización bacteriana.

El grado de interacción entre leucocitos y bacterias va a marcar la diferencia entre el estado de salud y enfermedad, y esto se esto se ha demostrado porque muchas infecciones ocurren en períodos de neutropenia profunda y algunas infecciones crónicas tienen lugar en enfermos con defectos congénitos en las funciones de los neutrófilos, en los cuales no se produce la interacción bacteriana-neutrófilo (Mehrzad *et al.*, 2009).

La actividad fagocítica de los PMNs es potenciada por la acción bactericida inherente del complemento y los anticuerpos específicos (Cunnion *et al.*, 2003; Rooijakkers *et al.*, 2005; DeLeo *et al.*, 2009), a causa de los daños provocados a las bacterias por la acción de estos dos factores. (Mc Donald *et al.*, 1981).

La actividad conjunta de todos estos fenómenos constituye el efecto bactericida total, que es perfectamente observable en un individuo tratado con antibióticos.

La respuesta del organismo hospedador es entonces, de fundamental importancia para el éxito terapéutico y al mismo tiempo, representa un factor difícil de controlar, ya que el grado de la respuesta inmune puede variar de un individuo a otro o puede estar disminuido o ausente, ya sea en individuos de riesgo (neonatos, seniles), inmunocomprometidos o bien cuando la localización del foco infeccioso está a resguardo de la respuesta inmune, tal es el caso de endocarditis o sitios en los que se han formado biofilms (Rivas, 2006).

Tulatromicina es un antibiótico que pertenece a la familia de los macrólidos, y junto con la azitromicina es clasificado dentro del grupo de los macrólidos semisintéticos 15-membrados. Como todo el grupo, este antibiótico es una base débil, altamente lipofílica y por lo tanto con una limitada solubilidad en agua, que actúa uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, inhibiendo la síntesis proteica y afectando la división celular con una actividad antibacteriana mixta es decir bacteriostática y bactericida (Evans, 2005). Tulatromicina está indicada para el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina asociada a *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis*, y la enfermedad respiratoria porcina asociada a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Haemophilus parasuis*. (Evans, 2005; Godinho, 2008).

Sus concentraciones plasmáticas son relativamente bajas debido a su rápida y extensa distribución al compartimento tisular, donde se acumula dentro de las células eucariotas (Prescott, 2002; Mulazimoglu *et al.*, 2005). Como todos los antibióticos de su clase, tiene capacidad de concentrarse a nivel intracelular, principalmente en

macrófagos y PMNs, siendo este un fenómeno reversible. Este mecanismo de flujo explicaría las elevadas concentraciones encontradas en los sitios de infección a causa de la liberación de tulatromicina al medio extracelular por parte de las células inmunes que migraron al sitio de infección bacteriana (Evans, 2005).

En ensayos preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que tulatromicina presenta actividad sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (Picco y col., 2009), no obstante, no se ha hallado información respecto a la farmacodinamia *in vitro* de este antibiótico frente a esta bacteria.

Sin embargo, este resultado *in vitro* no puede ser extrapolado al escenario *in vivo*, ya que en un tratamiento antibiótico, la interacción entre antibiótico, bacteria y respuesta inmune, es fundamental para la resolución clínica del proceso infeccioso bacteriano. En ese sentido, la actividad de la tulatromicina sobre *Staphylococcus aureus* se sumaría a la actividad bactericida de los PMNs, lo que involucra la adhesión del complemento y los anticuerpos (Ac) a la superficie de la bacteria, facilitando la fagocitosis por parte de éstos (Cunnion et al., 2003; Rooijakkers et al., 2005; DeLeo et al., 2009).

No obstante es necesario considerar los mecanismos de defensa de *Staphylococcus aureus* para con la respuesta inmune del individuo. Ha sido documentado que esta bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune mediante la síntesis y liberación al medio de proteínas capaces de bloquear los receptores celulares, los péptidos antimicrobianos y los factores del complemento (Rooijakkers et al., 2005). Asimismo, se ha reportado que la misma puede sobrevivir dentro de los fagosomas de los PMNs (Gresham et al., 2000).

Considerando la complejidad de estas interacciones, el objetivo de este trabajo fue

adaptar un modelo *in vitro* de curva de muerte bacteriana a concentraciones fijas de antibiótico, para evaluar la actividad conjunta de tulatromicina, factores séricos de respuesta inmune y la actividad fagocítica de los PMNs bovinos sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los estudios farmacodinámicos *in vitro* se empleó un estándar de tulatromicina (97,4%) proporcionado por Pfizer Global Manufacturing, EEUU, seis cepas de *Staphylococcus aureus*: pool de suero bovino (SB) y leucocitos aislados de sangre bovina (L.B).

Las seis cepas de *Staphylococcus aureus* consistieron en una cepa testigo ATCC 29213 y cinco cepas autóctonas, SA-5507, SA-5476, SA-001, SA-007 y SA-008 aisladas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, a partir 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.

El SB fue obtenido a partir de sangre venosa de bovinos adultos (n=6) que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los últimos seis meses. La esterilidad de las muestras de suero fue corroborada por ausencia de desarrollo bacteriano mediante pruebas bacteriológicas clásicas.

Para cada una de las cepas bacterianas, la concentración inhibitoria mínima (CIM) de tulatromicina fue estimada por el método de macrodilución (CLSI, 2008) en caldo Müller-Hinton (MH) y en MH y SB en proporción 50:50 (MH-SB). Previamente a la realización de cada ensayo se procedió a corroborar el

pH de los medios de cultivo utilizados (MH, MH-SB).

El aislamiento de LB se realizó con el método modificado de Eggleton, Gargan y Fisher (1989), que consistió en la hemólisis de los eritrocitos con solución isotónica de cloruro de amonio y posterior lavado sucesivo de los LB con solución salina balanceada de Hank.

La suspensión final de LB fue realizada en un pool de SB y la viabilidad de éstos se determinó durante cuatro horas posaislamiento por exclusión de tinción con azul de tripano al 4%. El número de LB viables se determinó por conteo directo en cámara de Neubauer. Un ml de la suspensión de LB en SB se adicionó a un ml de MH con concentraciones fijas de tulatromicina, logrando una relación MH-SB 50:50. La suspensión final de LB/ml garantizó un conteo globular semejante al hallado en un ml de sangre fresca.

Para todas las cepas se construyeron curvas testigos de crecimiento en ausencia de antibiótico en MH y MH-SB. Las curvas de muerte bacteriana fueron construidas, según el método de concentraciones fijas de antibiótico descripto por García Rodríguez y col., (2001).

Para cada una de las cepas bacterianas, las curvas se construyeron enfrentando un inóculo de $0,5-1 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) a concentraciones de tulatromicina equivalentes a 0,5 x CIM; 1 x CIM; 2 x CIM y 4 x CIM.

Cuando las curvas de muerte se realizaron en MH, el valor de referencia de CIM fue el estimado en MH, mientras que cuando las curvas de muerte se realizaron en MH-SB+LB, el valor de referencia de CIM fue el estimado en MH-SB.

Las curvas de muerte bacteriana se construyeron por triplicado para cada una de las cepas. De cada inóculo se tomaron alícuotas a tiempo cero y a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas, y

con las mismas se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril con el objeto de lisar los PMNs y reducir la densidad bacteriana. Posteriormente una alícuota (100 μ l) de la última dilución se extendió sobre una placa de agar con extensor de Digralsky. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de las UFC/placa. El número de UFC/ml se obtuvo multiplicando el número de UFC/placa por un factor de corrección originado a partir del número de diluciones seriadas realizadas.

Evaluación de la evolución de la población bacteriana en función del tiempo

Para armonizar los valores de bacterias viables en cada tiempo de muestreo, los datos fueron expresados como porcentaje del número de UFC/ml a tiempo cero. La nomenclatura utilizada se presenta a continuación.

- NMH; número de bacterias viables en ausencia de antibiótico en MH (crecimiento control).

- NSB; número de bacterias viables en ausencia de antibiótico en SB (crecimiento control).

- NA; número de bacterias viables en presencia de antibiótico.

- NASL; número de bacterias viables en presencia de antibiótico, suero y leucocitos.

- t_0 ; tiempo de inicio del ensayo (0 horas).

- t_f ; tiempo de la finalización del ensayo (10 horas).

Como estimadores de la masa bacteriana viable se utilizaron parámetros integrados, los que consideran dos dimensiones del ensayo en forma simultánea; el tiempo y la evolución del número de bacterias viables en función de éste (White & Toothaker, 1985).

Las integrales de UFC/ml en función del tiempo (UFC.h/ml), desde t_0 hasta t_f fueron calculadas por el método trapezoidal (Baggot,

2001), y la nomenclatura utilizada para las mismas fue la propuesta por Firsov *et al.*, 1997, la cual se presenta a continuación.

- $ABBC_{MH}$: área bajo la curva de los valores de NMH en función del tiempo desde t_0 hasta t_c .

- $ABBC_{SB}$: área bajo la curva de los valores de NSB en función del tiempo desde t_0 hasta t_c .

- $AUBC_A$: área bajo la curva de los valores de NA en función del tiempo desde t_0 hasta t_c .

- $AUBC_{ASL}$: área bajo la curva de los valores de NASL en función del tiempo desde t_0 hasta t_c .

Evaluación de la actividad sinérgica de tulatromicina, SB y LB (PMNs)

Los parámetros de eficacia para cada concentración de tulatromicina fueron los siguientes:

- % Eficacia total del suero bovino (ET_s): $[1 - (ABBC_{SB}/ABBC_{MH})] \times 100$

- % Eficacia total del antibiótico (ET_A): $[1 - (AUBC_A/ABBC_{MH})] \times 100$

- % Eficacia total de antibiótico suero y leucocitos (ET_{SL}): $[1 - (AUBC_{ASL}/ABBC_{MH})] \times 100$

- % Eficacia total de suero y leucocitos (ET_{SL}): $[1 - (AUBC_{ASL}/AUBC_A)] \times 100$

Análisis estadístico

La comparación de los resultados obtenidos se realizó mediante el test estadístico de ANOVA. Cuando se compararon más de dos grupos entre sí, las diferencias significativas entre estos fueron determinadas con el test de Bonferroni. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

RESULTADOS

El pH de los medios de cultivo al inicio de cada experimento fue de $7,41 \pm 0,1$ para MH y de $7,44 \pm 0,2$ para MH-SB. La CIM de tulatromicina en MH-SB ($0,25 \mu\text{g/ml}$) fue 8-16 veces menor a la obtenida en MH ($2-4 \mu\text{g/ml}$) tal y como se presenta en el Cuadro 1.

A partir de muestras de sangre bovina, se pudo aislar el 65,3% del total de LB al inicio del experimento y el 40,3% a las cuatro horas postaislamiento. La relación entre LB viables y no viables, se mantuvo constante durante este período, siendo la viabilidad del $84,7 \pm 2,9\%$ (Cuadro 2). La fórmula leucocitaria relativa tampoco sufrió modificaciones durante el mismo período.

Cuadro 1: Valores de CIM de tulatromicina para seis cepas de *Staphylococcus aureus* realizadas en MH y MH-SB 50:50

ID Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
	MH (pH $7,41 \pm 0,1$)	MH-SB 50:50 (pH $7,44 \pm 0,2$)
ATCC 29213	4,00	0,25
SA 5507	4,00	0,25
SA 5476	2,00	0,25
SA 001	2,00	0,25
SA 007	2,00	0,25
SA 008	4,00	0,25

En las curvas de crecimiento el desarrollo de la masa bacteriana de *Staphylococcus aureus* fue menor en MH-SB respecto de lo observado en MH (Fig. 1) y la eficacia antibacteriana intrínseca del SB expresada como % de reducción del desarrollo de la masa bacteriana fue del $91,9 \pm 1,95$ (Cuadro 3).

Cuadro 2: Evolución de la viabilidad de leucocitos recuperados de sangre bovina durante las cuatro primeras horas posaislamiento.

Leucocitos aislados de sangre bovina	Horas desde el inicio del aislamiento				
	0	1	2	3	4
Totales (mm^3)	13525				
Recuperados (mm^3)	8830	5940	6579	6850	5450
Viables (mm^3)	7050	5120	5670	5970	4600
No viables (mm^3)	1780	820	910	880	850
% Leucocitos recuperados	65,3	43,9	48,6	50,6	40,3
% Recuperados viables	79,8	86,2	86,2	87,2	84,4
% Recuperados no viables	20,2	13,8	13,8	12,8	15,6

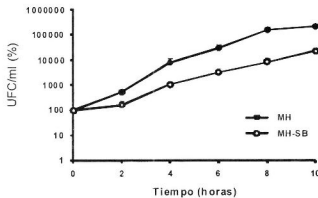


Fig 1: Evolución temporal de la masa bacteriana (UFC/ml) de seis cepas de *Staphylococcus aureus* en MH y MH-SB 50:50 durante 10 horas. En cada tiempo de muestreo los datos están expresados como porcentaje del número de UFC/ml a tiempo cero. Los valores se presentan en escala semilogarítmica como promedio \pm desvío estándar.

Cuadro 3: Valores de los parámetros integrados utilizados para cuantificar la masa bacteriana viable (ABBC) obtenidas en las curvas de crecimiento realizadas en MH ($ABBC_{MH}$) y MH-SB ($ABBC_{SB}$) y % de eficacia antibacteriana total del suero bovino (ET_S). Los valores se presentan como promedio \pm desvío estándar.

Parámetros	Promedio \pm DE
$ABBC_{MH}$	$611168 \pm 153311^{(*)}$
$ABBC_{SB}$	$49279 \pm 15239^{(*)}$
ET_S (%)	$91,9 \pm 1,95$

(*) indica valores diferentes entre sí.

En las curvas de muerte realizadas en MH, se observó que con una concentración de tulatromicina equivalente a 0,5 x CIM, se presentó al final del ensayo un marcado incremento en la masa bacteriana respecto de la reducción observada en el resto de las concentraciones (Fig. 2 y Cuadro 4).

En las curvas de muerte realizadas en MH-SB+LB, se observó un patrón de acti-

vidad similar, en donde con la concentración equivalente a 0,5 x CIM se presentó el mayor desarrollo de masa bacteriana. Sin embargo, el desarrollo bacteriano en MH-SB+LB fue menor al observado en MH en todas las concentraciones de tulatromicina (Fig. 3 y Cuadro 4).

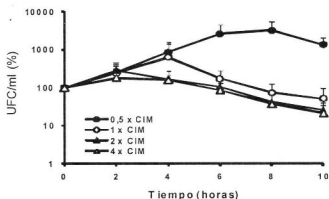


Fig. 2: Evolución temporal de la masa bacteriana (UFC/ml) de seis cepas de *Staphylococcus aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de tulatromicina equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 10 horas en MH. En cada tiempo de muestreo los datos están expresados como porcentaje del número de UFC/ml a tiempo cero. Los valores se presentan en escala semilogarítmica como promedio \pm desvío estándar.

Cuadro 4: Valores de los parámetros integrados utilizados para cuantificar la masa bacteriana viable obtenidas en las curvas de muerte realizadas en MH en presencia de antibiótico (AUBC_A) y las obtenidas en las curvas de muerte realizada en MH-SB 50:50+LB (AUBC_{ASL}). Los valores se presentan como promedio \pm desvío estándar.

CIM	AUBC _A	AUBC _{ASL}
	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE
0,5	15188 \pm 10265 ^(*)	1320 \pm 263 ^(*)
1	2361 \pm 2055	928 \pm 229 ^(*)
2	1306 \pm 505	619 \pm 87 ^(*)
4	1038 \pm 601	469 \pm 74 ^(*)

(*) indica valores diferentes al resto de los presentes en la misma columna.

(*) indica valores diferentes a su homólogo.

Los valores de eficacia total de tulatromicina en MH-SB+LB observados en cada una de las concentraciones fijas fueron mayores a los valores de eficacia total observados en MH, mientras que la eficacia antibacteriana estimada para SB y LB interpretada como % de participación de los factores de inmunidad de base humoral y celu-

lar en presencia del antibiótico, fue mayor en la menor concentración de tulatromicina ($83,52 \pm 12,96\%$), mientras que para el resto de las concentraciones esta participación disminuyó sensiblemente y la eficacia se situó entre valores de $47,07 \pm 24,12\%$ y $42,66 \pm 26,59\%$ (Cuadro 5).

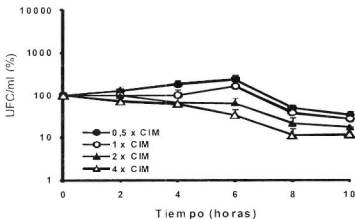


Fig. 3: Evolución temporal de la masa bacteriana (UFC/ml) de seis cepas de *Staphylococcus aureus* enfrentadas a concentraciones fijas de tulatromicina equivalentes a 0,5 x CIM, 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM durante 10 horas en MH-SB 50:50+LB. En cada tiempo de muestreo los datos están expresados como porcentaje del número de UFC/ml a tiempo cero. Los valores se presentan como promedio \pm desvío estándar.

Cuadro 5. Eficacia total estimada para cada concentración de tulatromicina en MH (ET_A) y en MH-SB+LB (ET_{ASL}). La eficacia antibacteriana de SB y LB (ET_{SL}) se presenta en la columna de la derecha. La eficacia se expresa como % de eliminación de bacterias y los valores se presentan como promedio \pm desvío estándar.

CIM	ET_A (%)	ET_{ASL} (%)	ET_{SL} (%)
	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE
0,5	$97,67 \pm 1,20^{(*)}$	$99,77 \pm 0,10^{(*)}$	$83,52 \pm 12,96^{(*)}$
1	$99,63 \pm 0,26^{(*)}$	$99,84 \pm 0,07^{(*)}$	$47,07 \pm 24,12$
2	$99,79 \pm 0,06^{(*)}$	$99,89 \pm 0,03^{(*)}$	$40,59 \pm 25,93$
4	$99,84 \pm 0,06^{(*)}$	$99,92 \pm 0,02^{(*)}$	$42,66 \pm 26,59$

(*) indica valores diferentes a su homólogo entre ET_A y ET_{ASL} .

(**) indica valores diferentes al resto de los prescutes en la misma columna.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, describen muchos aspectos de la farmacodinamia de tulatromicina sobre *Staphylococcus aureus*, especialmente en lo que respecta a la interacción entre el antibiótico, la bacteria y algunos componentes del sistema inmune del individuo. Entre estos tres elementos se establecen una serie de interacciones que se observan en la conocida tríada propuesta por Davis (Fig. 4) y que son las responsables de la mayor o menor eficacia de un tratamiento antibiótico entre distintos individuos (Davis *et al.*, 1969).

Por lo tanto, a fin de evaluar la actividad antibacteriana de tulatromicina sobre *Staphylococcus aureus* en un ambiente similar al que se presentaría en un organismo que padece una infección, es que se adicionó SB y PMNs al modelo de curva de muerte bacteriana, a fin de incorporar factores de respuesta inmune de base humoral y celular.

La primera evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del SB se realizó estimando la velocidad de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo estandarizado y en medio de cultivo al que se le adicionó SB.

En los estudios de cinética de crecimiento bacteriano, el concepto de velocidad se

interpreta como la variación del número de bacterias en un intervalo de tiempo determinado. Cuando esta variación es un incremento en el número de bacterias viables se habla de velocidad de crecimiento. Por el contrario, cuando esta variación es una disminución del número de éstas entonces se habla de velocidad de muerte.

En una población bacteriana coexisten los dos procesos en forma simultánea, y el balance entre estos va a determinar la evolución en el tiempo de la población bacteriana. En el caso de las bacterias en ausencia de antibiótico, el crecimiento predomina sobre la muerte, por lo que el balance es positivo, dando lugar a las curvas de crecimiento bacteriano, tal y como las que se realizaron con cepas de *Staphylococcus aureus* cultivados en MH y en MH-SB (Fig. 1).

La curva de crecimiento realizada en MH, nos proporcionó información sobre la velocidad de desarrollo de referencia, ya que en este medio de cultivo, las condiciones ambientales de nutrientes y pH, y la ausencia de los factores de respuesta inmune, permitieron el crecimiento bacteriano sin interferencias tal y como podría suceder en un paciente inmunodeprimido (White, 2001).

El balance entre el crecimiento y la muerte bacteriana en MH-SB no fue negativo, ya que el número de bacterias viables al final



Fig. 4: Relación conocida como tríada de Davis (1969), entre los factores relacionados a la respuesta inmune del huésped, las bacterias infectantes y la actividad de un antibiótico en la resolución de una infección de origen bacteriano.

del ensayo (UFC/ml) fue mayor al observado al inicio del mismo (Fig. 1). Sin embargo, el retraso en el desarrollo bacteriano en el medio de cultivo que contenía SB, determinó que la masa bacteriana se redujera en diez horas en un $91,9 \pm 1,95$ respecto de la masa bacteriana de referencia obtenida en el cultivo bacteriano en MH (Cuadro 3). Este resultado puede ser explicado por la actividad de los factores de la respuesta inmune específica e inespecífica presentes en el SB. Entre los posibles factores de respuesta inmune específica podemos considerar la actividad de anticuerpos contra *Staphylococcus aureus* que pudieron estar presentes en el SB, y entre los factores de respuesta inmune inespecífica podemos citar la presencia de complemento y péptidos endógenos con actividad antibacteriana, los que pudieron actuar neutralizando, lisando y dañando a las bacterias sobrevivientes afectando el desarrollo de las mismas.

En el estudio de la actividad de un antibiótico, la CIM es el parámetro farmacodinámico que establece la relación concentración-efecto de referencia, que se tiene en cuenta para la estimación de los parámetros farmacodinámicos predictivos de eficacia antibiótica, y para el desarrollo de los esquemas terapéuticos (Toutain *et al.*, 2002). Sin embargo, las condiciones estandarizadas *in vitro* en el cual se realiza su determinación, difieren del ambiente en el cual el antibiótico deberá actuar en el sitio de localización bacteriana en un organismo vivo. Al respecto, el valor de la CIM de tulatromicina sobre *Staphylococcus aureus* estimado en MH-SB fue entre 8 y 16 veces menor al valor obtenido en un medio de cultivo estandarizado (Cuadro 1).

Los ensayos de curva de muerte bacteriana se realizan para evaluar la actividad en el tiempo de concentraciones fijas de un antibiótico sobre la bacteria sensible al

mismo, y estas diferentes concentraciones se establecen tomando como referencia el valor estimado de la CIM para con esa bacteria. Las curvas de muerte bacteriana de tulatromicina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* en MH se realizaron tomando como referencia los valores de CIM que se estimaron en ese medio de cultivo (2-4 $\mu\text{g/ml}$). En nuestro ensayo, tulatromicina presentó una actividad antibacteriana lenta, y el incremento de sus concentraciones tuvo poco efecto sobre su actividad, ya que tras diez horas de exposición al antibiótico, el % de eficacia observado a la concentración de 4 x CIM no presentó diferencias con los % de eficacia observados a 2 x CIM y 1 x CIM (Figs. 2-3 y Cuadro 5).

Las curvas de muerte bacteriana construidas en MH-SB+LB se realizaron tomando como referencia la CIM estimada en ese medio de cultivo, cuyo valor fue de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ para todas las cepas de *Staphylococcus aureus*. Es importante destacar que aunque en estas curvas los inóculos fueron expuestos a menores concentraciones de tulatromicina, la eficacia antibacteriana obtenida en cada una de ellas fue mayor a su homóloga obtenida en MH (Cuadro 5), en la que se utilizaron concentraciones 8-16 veces mayores.

Los resultados obtenidos con este modelo de curva de muerte bacteriana modificado por la incorporación de factores de respuesta inmune permiten realizar importantes consideraciones. La respuesta inmune innata sobre *Staphylococcus aureus* es altamente dependiente tanto de la activación del sistema del complemento como de la muerte mediada por acción de los neutrófilos (Rooijackers *et al.*, 2005). En este sentido, debemos considerar que en este estudio *in vitro*, el sistema de complemento contó con las condiciones óptimas para activarse en sus tres vías. La vía clásica pudo ser activada por la eventual presencia de Ac contra

Staphylococcus aureus que pudieron estar presentes en el SB, la vía alternativa pudo ser activada por el peptidoglicano (PG) presente en la superficie de la bacteria, mientras que la lectina fijadora de manosa y las ficolinas pudieron reconocer al PG y activar la vía de la lectina.

Este proceso de opsonización bacteriana por parte de las proteínas séricas presentes en el suero, pudo haber facilitado el proceso de fagocitosis por parte de los PMNs (DeLeo, 2009), los que acumulan elevados niveles de superóxidos que matan a las bacterias ingeridas. Asimismo, una vez formado el fagosoma se produciría la fusión de éste con los granos azurófilos, quienes vertirían al interior de éste elevadas concentraciones de péptidos y proteínas antimicrobianas que contribuirían a la muerte intracelular de la bacteria ingerida (Quinn *et al.*, 2006). Otro factor a considerar, está relacionado con las propiedades farmacocinéticas de tulatromicina y su capacidad para difundir a través de membranas biológicas, ya que como todos los macrólidos, ésta se acumula dentro de las células procariotas, especialmente los macrófagos y los PMNs. El sitio específico de ubicación es el interior de los lisosomas, dentro de los cuales se ioniza y acumula por un fenómeno de trampa iónica (Mulazimoglu *et al.*, 2005). Sin embargo, solo la forma no ionizada es farmacológicamente activa, y se sabe que los macrólidos pierden aproximadamente un 90% de eficacia por cada unidad de pH que disminuye, por lo que las elevadas concentraciones intralisosomales de tulatromicina, no garantizan una elevada actividad antibacteriana. También es posible que *Staphylococcus aureus* haya evadido parcialmente la respuesta inmune de los factores incorporados al modelo, o que haya sobrevivido dentro de los fagosomas de los PMNs. Sin embargo, en este ensayo no pudo discriminarse el grado de participación de

estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

Dentro de un contexto de actividad bactericida global, hemos observado que la actividad de tulatromicina fue potenciada por la presencia de los factores de respuesta inmune adicionados al modelo, y este hallazgo, puede ser explicado porque las bacterias que han sido expuestas a concentraciones inhibitorias que no han muerto, son más sensibles a la fagocitosis. Este fenómeno ha sido claramente observado en los antibióticos que como tulatromicina, inhiben la síntesis proteica, y que producen alteraciones en los componentes estructurales de la superficie de las bacterias. De esta manera, las bacterias que luego de haber sido expuestas a los antibióticos son fagocitadas, podrían ser más sensibles a la destrucción dentro de la célula fagocítica (Ramadan *et al.*, 1995).

Un hallazgo llamativo, lo constituye el hecho que el impacto de factores de respuesta inmune incorporados al modelo fue más notorio a una concentración baja, ya que la actividad antibacteriana que pudo asignarse a la participación de los factores de respuesta inmune humoral y celular observada en este ensayo *in vitro* superó el 80% cuando las concentraciones de tulatromicina fueron subinhibitorias (0,5 x CIM) y representó aproximadamente el 40% de la actividad total en presencia de concentraciones de tulatromicina equivalentes a 1 x CIM, 2 x CIM y 4 x CIM (Cuadro 5). Este hallazgo permite inferir la importancia de la participación de la respuesta inmune en presencia de las concentraciones subinhibitorias que se presentan en la fase terminal de disposición de un antibiótico tras su administración a un individuo tal y como se presentan en la Fig. 5. En la misma, está indicada la zona de concentraciones subinhibitorias en la que se expresarían los fenómenos de efecto posantibiótico

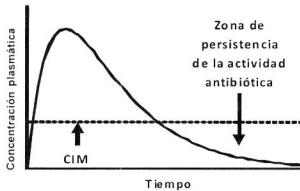


Fig 5: Representación gráfica de un perfil de concentración plasmática de un antibiótico tras la administración de una dosis por vía extravascular en donde se señala el valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) representada por una línea de puntos y el área de concentraciones subinhibitorias, donde los factores de respuesta inmune humoral y celular actuarían favoreciendo la persistencia de la actividad del antibiótico.

y PALE, que completarían y prolongarían la actividad del antibiótico administrado.

Los resultados obtenidos indican la aditividad entre la eficacia del antimicrobiano, la actividad bactericida de péptidos con actividad antimicrobiana, la actividad bactericida y opsonica del complemento y la actividad fagocítica y bactericida de los PMNs, lo que se refleja en una significativa disminución del número de bacterias viables en todas las concentraciones de tulatromicina ensayadas, respecto de la evolución de las poblaciones bacterianas solo en presencia de la misma aunque éstas fueron más elevadas. La corta supervivencia de los LB en las condiciones experimentales empleadas en este ensayo, impidieron evaluar la actividad fagocítica y bactericida de los mismos durante mucho más tiempo. No obstante, la notable reducción en el número de bacterias viables observada en este ensayo *in vitro* de diez horas, permite inferir que este modelo de cinética de muerte

bacteriana modificado, puede ser utilizado para evaluar la magnitud de la participación de la respuesta inmune no específica de base humoral y celular en la terapéutica antibiótica de otros agentes antibacterianos sobre otras especies bacterianas, simulando condiciones experimentales similares a las observadas en condiciones *in vivo*.

CONCLUSIÓN

Tulatromicina es un antibiótico que aunque efectivo sobre *Staphylococcus aureus*, ha demostrado ser poco potente en medios de cultivo estandarizados como MH, en el que presentó valores de CIM entre 2 y 4 µg/ml. Sin embargo la potencia de este antibiótico se incrementó al incorporarse SB al medio de cultivo, reduciendo el valor de la CIM a 0,25 µg/ml.

La actividad antibacteriana y opsonizante de los factores presentes en el SB involucrados en la respuesta inmune innata, pudieron ser los responsables del retraso del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aunque no presentaron actividad bactericida neta.

Los factores humorales presentes en SB, junto con los PMNs, actuaron en forma sinérgica con la tularomicina, potenciando su actividad, reduciendo la masa bacteriana con concentraciones 8-16 veces menores a lo obtenido en MH, y mejorando significativamente su eficacia a concentraciones menores a la CIM.

Los resultados obtenidos permiten inferir que un modelo farmacodinámico *in vitro*, que incorpora factores de respuesta inmune innata y específica, es capaz de generar información más confiable acerca de la actividad *in vivo* de los antibióticos, respecto de los ensayos *in vitro* realizados en medios de cultivo que no tienen en cuenta la respuesta inmune del individuo, la cual es indispensable para la resolución de las enfermedades infecciosas, en donde se acepta que los agentes antibacterianos son una terapéutica destinada a coadyuvar a las defensas naturales del individuo.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Biología Celular Molecular de la FCV-UNL por facilitar el instrumental necesario para el aislamiento de leucocitos bovinos.

A la Dra. Ana Canal y la Dra. Rocío Marini del Laboratorio de Cito e Histopatología de la FCV-UNL, por la colaboración prestada durante el control de la supervivencia de los leucocitos bovinos aislados.

BIBLIOGRAFÍA

- ANNEMICK, B.S. & H.W. JEANETTE. 2001. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*. 97:2478-86.
- BAGGOT, J.D. 2001. *The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology*. Blackwell Science, Oxford.
- BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40:845-859.
- CHOI, E.Y.; S. SANTOSO & T. CHAVAKIS 2009. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front. Biosci.* 14:1596-1605.
- 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. Volume 28, Number 7. Wayne, Pennsylvania USA.
- CUNNION, K.M.; H.M. ZHANG & M.M. FRANK. 2003. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. *Infect. Immun.* 71:656-62.
- DAVIS, B.D.; R. DULBECCO; H.N. EISEN; H.S. GEINBERG & W.H. WOOD. 1969. *En: Microbiology*. Herper and Row, New York and John Weatherhill, Inc. Tokyo. 654 pp.
- DeLEO, F.R.; B.A. DIEP & M. OTTO. 2009. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 23:17-34.
- EFRATI, C.; T. SACKS; N. NELEMAN; M. LAHAV & I. GINSBURG. 1976. The effect of leukocyte hydrolases on bacteria. The combined effect of leukocyte extracts,

- lysozyme, enzyme "cocktails", and penicillin on the lysis of *Staphylococcus aureus* and group A Streptococci "in vitro". *Inflammation*. 1:371-407.
- EGGLETON, P.; R. GARGAN & D. FISHER.** 1989. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran on density gradient polymers. *J. Immunol. Met.* 121:105-113.
- EVANS, N.A.** 2005. Tulathromycin: an overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Vet. Therap.* 6(2):83-95.
- FIRSOV, A.; S. VOSTROV; A. SHEVCHENKO & G. CORNAGLIA.** 1997. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(6):1281-1287.
- 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.
- GODINHO, K. S.** 2008. Susceptibility testing of tulathromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. *Am. J. Vet. Res.* 62:1870-1875.
- GREENWOOD, D. & F. O'GRADY.** 1973. Comparison of the responses of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* to seven betalactam antibiotics. *J. Infect. Dis.* 128: 211-222.
- GRESHAM, H.D.; J.H. LOWRANCE; T.E. CAYER; B.S. WILSON; A.L. CHEUNG & F.P. LINDBERG.** 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *The J. of Immunol.* 164: 3713-3722.
- JANEWAY, J. & R. MEDZHITOV.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- KANTARI, C.; M. PEDERZOLI & S.V. WITKO.** 2008. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol.* 15:118-146.
- KLAINER, A.S. & R.R.B. ROUSSELL.** 1974. Effect of the inhibition of protein synthesis on the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 6:216-224.
- KRISTIAN, S.A., A.M. TIMMER; G.Y. LIU; X. LAUTH; N. SAL-MAN; Y. ROSENFELD; Y. SHAI; R.I. GALLO & V. NIZET.** 2007. Impairment of innate killing mechanism by bacterisotatic antibiotics. *The FASEB J.* 21:1107-1116.
- LORIAN, V. & A. WALUSCHKA.** 1972. Blood culture showing aberrant forms of bacteria. *Am. J. Pathol.* 57: 406-409.
- 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. Infec. Dis.* 3:38-44.
- MEHRZAD, J.; L. DUCHATEAU & C. BURVENICH.** 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood of milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparus and multiparus cows during early lactation. *Vet. Microbiol.* 134:106-112.
- MILATOVIC, D.; L. BRABENY & J. VERHOEF.** 1983. Clindamycin enhances opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 24:413-417.
- MULAZIMOGLU, L., P.M. TULKENS, F. VAN BAMBEKE.** 2005. Macrolides. In: Yu, V.L., G. Edwards, P.S. McKinnon, C. Pelloquin and G.D. Morse (eds). *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volume II: Antimicrobial Agents* (2nd Ed) Pittsburg, Sun Technologies, p. 243-280.
- OFEK, I.; J. KEISARI & N. SHARON.** 1995.

- Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:239-276.
- PICCO, E.; E. BARONI; A. DELGADO; S. STIEFEL; P. NIMSI MICHEL & E. FORMENTINI.** 2009. *In vitro* activity of tulathromycin on *Staphylococcus aureus*: effect of pH, inoculum size and bovine serum. Póster aceptado y presentado en la XXI Reunión anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental, 24 al 26 de Noviembre 2009, Rosario, Argentina.
- PRESCOTT, J. F.** 2002. Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: Prescott J.F., Baggot, J.D., Walter, R.D. (eds): *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria* (3a Ed) Argentina, Ed. Intermédica, p 204-232.
- PRUUL, H. & P. J. Mc DONALD.** 1990. Lomelofloxacin-induced modification of the kinetics of growth of Gram-negative bacteria and susceptibility to phagocytic killing by human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 25:91-101.
- 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. Chemother.* 19:945-951.
- PRUUL, H.; B. WETHERALL & P. Mc DONALD.** 1986. "*In vitro*" killing of erythromycin-exposed group A streptococci by polymorphonuclear leukocytes. *E. J. Clin. Microb.* 5:405-410.
- QUINN, M.T.; M.C. AMMONS & F.R. DeLEO** 2006. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin. Sci* 111(1): 1-20.
- RAMADAN, M.A.; A.F. TAWKIK & S. ZINNER** 1995. Post-antibiotic effect of azithromycin and erythromycin on streptococcal susceptibility to phagocytosis. *J. Med. Microbiol.* 42:362-366.
- RAMMELKAMP, C.H. & C.S. KEEFER.** 1943. Penicillium: its antimicrobial effect in whole blood and serum for hemolytic streptococcus and *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 22:649-647.
- RIVAS, C. S.** 2006. ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana? *Quim. Viva* 2(5):63-77.
- ROOIJAKKERS, S.H.; K.P. VAN & S.J. VAN.** 2005. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends, Microbiol.* 13:596-601.
- SCHULTZ, R.D.; H.W. DONNE; C.E. HEIST.** 1969. Effects of sublethal concentrations of penicillin G on groups C, E, K and L Streptococci. *Am. J. Vet. Res.* 30:1451-1459.
- 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.
- WHITE, C.A. & R. TOOTHAKER** 1985. Influence of ampicillin elimination *half-life* on *in vitro* bactericidal effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 15(suppl. A):257-260.
- WHITE, R.L.** 2001. What *in vitro* models of infection can and cannot do?: potential drawbacks of *in vitro* pharmacodynamic studies. *Pharmacotherapy* 21(11S).
- WITKO-SARSAT, V.; P. RIEU; B. DESCAMPS-LATSCHA; P. LESAVRE & L. HALBWACHS-INVEST.** 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab.* 80:617-653.