

## ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRINSECA DE SUERO BOVINO SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

GIACOMINO, N.<sup>1</sup>; CERRA, M.<sup>1</sup>; STIEFEL, S.<sup>1</sup>; GUMIY, D.<sup>1</sup>; NOTARO, U.<sup>1</sup>;  
BUFFA, E.<sup>1</sup>; BARONI, E.<sup>1</sup>; PICCO, E.<sup>1</sup> & FORMENTINI, E.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se evaluó la actividad bactericida intrínseca del suero de bovinos adultos sobre inóculos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* empleando un modelo *in vitro* modificado de curva de crecimiento bacteriano. El suero de bovinos adultos presentó actividad hemolítica mediada por complemento y anticuerpos naturales, la cual estuvo ausente en el suero de los terneros que no calostraron. El crecimiento bacteriano en presencia de suero de terneros adultos fue significativamente menor a lo observado en presencia de suero de terneros sin calstrar. Estos resultados destacan la actividad antibacteriana intrínseca del suero mediada por complemento y anticuerpos naturales. Se propone esta metodología como un complemento de los ensayos de velocidad bactericida de suero con el fin de discriminar y cuantificar la actividad bactericida de los factores de respuesta inmune innata presentes en el suero y la actividad bactericida del agente antibiótico.

*Palabras clave:* Complemento, anticuerpos naturales, curva de crecimiento bacteriano, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

### SUMMARY

#### **Intrinsic antibacterial activity of bovine serum against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.**

The intrinsic antibacterial activity of adult bovine serum against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains was evaluated using a modified *in vitro* growth kinetic curve. The serum of adult bovines presented a hemolytic activity mediated by complement and natural antibodies which was absent in serum from newborn calves with no colostrum ingestion. The bacterial growth in the

---

1.- Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Tel. (03496) 420639. Email: eforment@fcv.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 12 de noviembre de 2011 y aceptado para su publicación el 21 de mayo de 2012

presence of adult bovine serum was lower than the observed in presence of serum from calves which did not received colostrum. These results highlight the intrinsic antibacterial activity of serum of adult bovines mediated by complement and natural antibodies. This methodology is proposed as a complementary assay of the determination of bactericidal-rate of serum, in order to discriminate and quantify the bactericidal activity of the innate immune response factors present in serum and the antibacterial activity of the antibiotic.

Key words: Complement, Natural antibodies, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Growth bacterial curve.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años los ensayos *in vitro* basados en la construcción de curvas de muerte bacteriana (kill-curves) (Mueller *et al.*, 2004) 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). Si bien los ensayos de eficacia antibacteriana *in vitro* generan información que se utiliza para el diseño de los regímenes terapéuticos, la correlación entre esta actividad y la resolución de un cuadro clínico no es del 100%, ya que en el ejercicio de la clínica se observa que muchas infecciones bacterianas que son tratadas con el antibiótico al cual el microorganismo ha mostrado ser susceptible *in vitro*, no responden a la terapéutica (Blondeau, 2009).

Esto se explica porque la cura de una infección bacteriana depende de la magnitud y la calidad de la respuesta inmune innata y adaptativa del individuo, al punto que se considera que esta respuesta es indispensable para la resolución clínica exitosa de una enfermedad infecciosa, considerando a los antibióticos como una terapia coadyuvante de las defensas naturales del organismo (Blondeau, 2009).

La actividad bactericida intrínseca del suero está determinada mayoritariamente por dos componentes; los anticuerpos naturales (AcN) y el complemento (Matson *et al.*, 2005). Los AcN son un tipo particular de inmunoglobulinas cuya presencia no requiere una exposición previa a un antígeno en particular (Van Kneysel *et al.*, 2007) y que reaccionan con diferente afinidad con una amplia variedad de epitopes presentes en antígenos macromoleculares y particulados incluyendo glóbulos rojos extraños, bacterias, virus y toxinas. Una alta proporción de AcN se une a los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales representan antígenos que son compartidos con una amplia variedad de microorganismos. Entre los PAMP más importantes se encuentran los lipopolisacáricos (LPS) presentes en las enterobacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli* o *Salmonella* spp., el ácido lipoteicoico (LTA) presente en las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y peptidoglicano (PGN) presente tanto en bacterias Gram negativas y Gram positivas (Ploegaert *et al.*, 2011).

El sistema de complemento participa en la eliminación de bacterias mediante su acción lítica directa (Tosi, 2005), mediante la opsonización favoreciendo su ingestión por las células fagocíticas y originando productos quimiotácticos que reclutan células inmunes

al sitio de infección y que contribuyen al incremento de la permeabilidad capilar, permitiendo que las proteínas séricas ingresen desde la circulación general hacia el tejido infectado (Bolger *et al.*, 2007).

La activación de las fracciones séricas del complemento fue inicialmente descrita como una reacción secundaria o accesorio a la formación del complejo antígeno-anticuerpo (vía clásica), pero que puede activarse por la presencia de patógenos a través de la vía alternativa o la vía de las lectinas.

En el caso de la vía alternativa, la ausencia de galactosa y residuos de ácido siálico en la superficie de los patógenos, contribuyen a desencadenar la activación del complemento (Matsushita, 1996). En la vía de las lectinas, el complemento es activado por una proteína sérica llamada proteína fijadora de manosa (MBP), la cual tiene afinidad por carbohidratos tales como manosa y N-acetilglucosamina presentes en la superficie de los microorganismos (Kawasaki *et al.*, 1983; Turner, 1996). Estos dos componentes humorales interactúan en el proceso de eliminación de microorganismos invasores; los AcN actúan como moléculas de reconocimiento opsonizando a los microorganismos invasores e iniciando la cascada de activación del complemento.

Ya sea que el complemento se active por la vía alternativa o la vía de las lectinas, se produce la síntesis de la fracción C3b iniciando la cascada de activación que culmina con el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (CAM) sobre la superficie de los patógenos invasores, dando lugar a la formación de poros que a causa del desbalance electrolítico provocan la lisis de las bacterias o las partículas virales (Tosi, 2005). De esta manera, los AcN y el complemento presentes en el suero constituyen componentes de la respuesta inmune innata

autosuficientes para reducir la carga bacteriana sin necesidad de la participación de los componentes del sistema inmune adaptativo.

Los ensayos de eficacia antibiótica *in vitro* se caracterizan por la actividad antibacteriana del agente antibiótico en ausencia de los factores relacionados a la respuesta inmune del individuo en condiciones que se asemejan a las encontradas en un paciente inmunodeprimido (White, 2001). Si bien se han reportado algunas metodologías para evaluar la actividad de un antibiótico en presencia de suero (Riera *et al.*, 1996; García Rodríguez *et al.*, 2001), éstos no permiten evaluar la magnitud de la actividad bactericida intrínseca del suero del paciente, considerando que ésta puede variar en función del status de su respuesta inmune.

En este ensayo se empleó un modelo *in vitro* modificado de curva de crecimiento bacteriano adicionando al medio de cultivo suero de bovinos adultos, a fin de evaluar el impacto de la actividad bactericida intrínseca mediada por los factores de respuesta inmune inespecífica de base humoral presentes en este fluido biológico (complemento y AcN) sobre la cinética de crecimiento de dos cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación *in vitro* de la actividad bactericida intrínseca del suero bovino se usó una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), suero bovino de animales adultos (SBA) y suero de terneros sin calotrar (STSC).

El SBA, consistió en un pool de suero obtenido a partir de sangre venosa de bovi-

nos adultos sanos ( $n = 6$ ) de seis meses a un año de edad, que no habían recibido tratamiento antibiótico durante los últimos tres meses, mientras que pool de STSC se obtuvo a partir de sangre venosa de terneros recién nacidos ( $n = 6$ ) que no habían calostrado.

La esterilidad de las muestras de suero fue corroborada por ausencia de desarrollo bacteriano mediante pruebas bacteriológicas clásicas y la presencia de inmunoglobulinas en los pools de SBA y STSC se corroboró mediante proteingrama por electroforesis.

La presencia de complemento y AcN se determinó valorando la actividad hemolítica de éste sobre glóbulos rojos de conejo (GRC) según la técnica reportada por Sirosky *et al.* (2010). Como controles negativos se utilizó SBA tratado con 50mM de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), ya que este compuesto se comporta como inactivador del complemento y STSC ya que este es hipo o agamaglobulinémico (Stott *et al.*, 1976), y las concentraciones plasmáticas de los componentes del complemento están disminuidas y sólo se hallan en un 12-60% respecto de los niveles hallados en los individuos que ya han alcanzado la madurez (Hein, 1994). La técnica se basa en la activación del complemento a partir de la unión del AcN a los GRC, produciendo la hemólisis de los mismos. La hemoglobina liberada se cuantifica por medio de la lectura de la densidad óptica a 540 nm. La valoración de la actividad hemolítica del complemento se realizó según el método propuesto por Mayer (1967) y las unidades hemolíticas al 50% ( $CH_{50}$ ) se interpretan como la concentración de suero necesaria para producir el 50% de hemólisis de una suspensión de GRC. Todos los ensayos de valoración de actividad hemolítica de complemento en presencia de AcN sobre GRC se realizaron por sextuplicado.

## CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO CONTROL

Las curvas de crecimiento control para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se construyeron por sextuplicado. Para la construcción del inóculo inicial, los microorganismos en fase de crecimiento logarítmico fueron suspendidos en solución fisiológica estéril a una concentración que resultó en una turbidez equivalente al grado 0,5 de la escala de McFarland, lo que equivale a una densidad bacteriana de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Posteriormente, se realizaron diluciones del inóculo inicial en caldo Muller Hinton (MHB) hasta lograr una concentración de bacterias equivalente a  $0,5-1 \times 10^6$  UFC/ml. Los inóculos finales fueron incubados en estufa a 35°C durante 10 horas.

Durante ese período se tomaron de cada inóculo alícuotas a tiempo cero y a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Con cada una se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril con el objeto de reducir la densidad bacteriana. Posteriormente una alícuota (100  $\mu$ l) de la última dilución se extendió sobre una placa de agar con espátula de Digralky. 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.

## CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO EN SBA Y STSC

La construcción de las curvas de crecimiento para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en SBA y STSC se realizaron por sextuplicado siguiendo el procedimiento descrito en la construcción de las curvas de crecimiento testigo en MHB,

modificando solamente el medio de cultivo de los inóculos finales que estuvo compuesto por MHB/SBA 50:50 y MHB/STSC 50:50.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA INTRÍNSECA DEL SBA Y EL STSC

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:

- $N_{MHB}$ ; número de bacterias viables en MHB
- $N_{SBA}$ ; número de bacterias viables en MHB/SBA 50:50
- $N_{STSC}$ ; número de bacterias viables en MHB/STSC 50:50
- $t_0$ ; tiempo de inicio del ensayo (0 horas)
- $t_z$ ; tiempo de la finalización del ensayo (10 horas)

Como estimadores de la masa bacteriana viable se utilizó la integral de UFC/ml en función del tiempo (ABC) (Firsov *et al.*, 1997). Este parámetro, considera dos dimensiones del ensayo en forma simultánea; el tiempo y la evolución del número de bacterias viables en función de éste. Para las curvas de crecimiento, las integrales estimadas desde  $t_0$  hasta  $t_z$  fueron calculadas por el método trapezoidal (Baggot, 2001) y la nomenclatura utilizada para las mismas fue la siguiente:

- $ABC_{MHB}$ ; área bajo la curva de los valores de  $N_{MHB}$  en función del tiempo desde  $t_0$  hasta  $t_z$ .
- $ABC_{SBA}$ ; área bajo la curva de los valores de  $N_{SBA}$  en función del tiempo desde  $t_0$  hasta  $t_z$ .

- $ABC_{STSC}$ ; área bajo la curva de los valores de  $N_{SBA}$  en función del tiempo desde  $t_0$  hasta  $t_z$ .

La magnitud del desarrollo bacteriano en MHB/SBI 50:50 y MHB/SBA 50:50, respecto del crecimiento en medio de cultivo estándar (MHB), se expresó como porcentaje de sobrevida bacteriana al final del experimento. Los parámetros de sobrevida bacteriana para cada uno de los sueros fueron los siguientes:

- % Sobrevida bacteriana en MHB/SBA 50:50 =  $(ABC_{SBA}/ABC_{MHB}) \times 100$
- % Sobrevida bacteriana MHB/STSC 50:50 =  $(ABC_{STSC}/ABC_{MHB}) \times 100$

La actividad bactericida intrínseca de MHB/SBA 50:50 y MHB/STSC 50:50, respecto del crecimiento en medio de cultivo estándar (MHB), se expresó como porcentaje de bacterias eliminadas al final del experimento. Los parámetros de eficacia antibacteriana intrínseca para cada uno de los sueros fueron los siguientes:

- % Eficacia antibacteriana de MHB/SBA 50:50;  $[1 - (ABC_{SBA}/ABC_{MHB})] \times 100$ .
- % Eficacia antibacteriana de MHB/STSC 50:50;  $[1 - (ABC_{STSC}/ABC_{MHB})] \times 100$ .

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de los resultados obtenidos (masa bacteriana viable, % de eficacia antibacteriana, % de hemólisis y  $CH_{50}$ ), se realizó mediante el test estadístico de ANOVA.

Cuando se compararon más de dos grupos entre sí, las diferencias 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

Los resultados del proteinograma por electroforesis de los pools de SBA y STSC se presentan en la figura 1 y el cuadro 1. El pool de STSC presentó bajos niveles de globulinas totales a causa de la baja concentración de gamma globulinas respecto del suero proveniente de un animal adulto (SBA).

La actividad hemolítica asociada al complemento y a la presencia de AcN en el SBA se manifestó por un elevado porcentaje de hemólisis de GRC. Los porcentajes de hemólisis observados en SBA+EDTA ( $5,63 \pm 1,71\%$ ) y STSC ( $5,51 \pm 0,73\%$ ) fueron menores ( $p < 0,05$ ) a lo observado en SBA ( $89,5 \pm 4,16\%$ ) tal como se presenta en la figura 2A.

La actividad hemolítica de SBA, SBA+EDTA y STSC en función de diferentes

concentraciones de suero se presentan en la figura 2B.

El valor estimado de  $CH_{50}$  para SBA fue de  $13,1 \pm 4,16$ , lo que equivale a decir que una dilución de suero 1/13,1 (0,076 mL) es necesaria para producir el 50% de la hemólisis de GRC.

La evolución temporal de las masas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) en MHB, MHB/SBA 50:50 y MHB/STSC 50:50 durante 10 horas se presentan en la figura 3 y el cuadro 2.

En el caso de *Escherichia coli*, no se observaron diferencias en el desarrollo bacteriano en MHB y MHB/STSC 50:50, mientras que la masa bacteriana que se desarrolló en el medio de cultivo compuesto por MHB/SBA 50:50 resultó significativa-

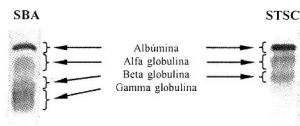


Fig. 1: Fracciones proteicas separadas por electroforesis de pool de sueros proveniente de bovinos adultos (SBA) y de pool de sueros de terneros sin calostroar (STSC).

Cuadro 1: Proteinogramas de pool de sueros proveniente de bovinos adultos (SBA) y de pool de sueros de terneros sin calostroar (STSC) obtenidos por electroforesis.

Fracciones proteicas	SBA	STSC
Proteínas totales	5,69 g%	4,59 g%
Albúmina	2,48 g%	2,86 g%
Globulinas totales	3,21 g%	1,73 g%
Alfa globulinas	0,48 g%	0,86 g%
Beta globulinas	0,52 g%	0,71 g%
Gamma globulinas	2,21 g%	0,16 g%
Relación albúminas/globulinas	0,80 g%	1,70 g%



mente menor respecto de los otros dos medios de cultivo utilizados en el ensayo.

Con respecto a *Staphylococcus aureus*, esta bacteria presentó en presencia de STSC un desarrollo superior a lo observado en MHB, tal como se presenta en la figura 3 y el cuadro 2. Por otra parte, al igual que lo observado con *Escherichia coli*, el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue significativamente menor en MHB/SBA 50:50 respecto de lo observado en MHB.

La eficacia antibacteriana del medio de cultivo que incorporó el pool de STSC fue solamente del  $4,27 \pm 26,2\%$  para *Escherichia coli* (Cuadro 4), mientras que para *Staphylococcus aureus* ésta no pudo ser estimada debido a que la sobrevida de esta

bacteria en MHB/STSC 50:50 fue del  $347,5 \pm 204,3\%$  respecto de la observada en MHB (Cuadro 3).

La eficacia antibacteriana del medio de cultivo que incorporó el pool de SBA fue de  $92,5 \pm 4,55\%$  para *Escherichia coli* y  $74,7 \pm 20,5\%$  para *Staphylococcus aureus* (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

En un medio de cultivo estandarizado como MHB, las bacterias en suspensión se reproducen a una velocidad que está determinada por factores tales como la

Cuadro 2: Masas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) obtenidas en las curvas de crecimiento realizadas en MHB, MHB/STSC 50:50 y MHB/SBA 50:50. Los valores están expresados como la integral de las UFC/ml en función del tiempo (ABC) desde tiempo cero hasta las diez horas.

Parámetro	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ABC <sub>MHB</sub>	468.678 ± 108.159	269.810 ± 208.360**
ABC <sub>STSC</sub>	442.816 ± 149.177	600.961 ± 374.022**
ABC <sub>SBA</sub>	38.143 ± 26.577*	40.627 ± 20.884**

\* indica un valor diferente a los demás dentro de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

\*\* indica valores diferentes entre sí dentro de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

Cuadro 3. Sobrevida bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) en las curvas de crecimiento realizadas, MHB/STSC 50:50 y MHB/SBA 50:50. Los valores están expresados porcentaje de bacterias sobrevivientes al final del ensayo respecto del crecimiento observado en MHB.

Medio de cultivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MHB/STSC 50:50	95,7 ± 26,2%*#	347,5 ± 204,3%#
MHB/SBA 50:50	7,51 ± 4,55%*#	25,3 ± 20,5%#

\* indica valores diferentes dentro de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

# indica valores diferentes entre las columnas ( $p < 0,05$ ).



Cuadro 4: Eficacia bactericida intrínseca de STSC y SBA sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) observada en las curvas de crecimiento bacteriano realizadas en MHB/STSC 50:50 y MHB/SBA 50:50. Los valores están expresados porcentaje de bacterias eliminadas al final del ensayo respecto del crecimiento bacteriano observado en MHB.

Medio de cultivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
MHB/STSC 50:50	4,27 ± 26,2%*	NC
MHB/SBA 50:50	92,5 ± 4,55%*	74,7 ± 20,5%

NC = valor no calculado.

\* indica valores diferentes dentro de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

disponibilidad de los nutrientes, y condiciones estandarizadas de pH y temperatura. El incremento de la densidad bacteriana asociada a la escasez de nutrientes y la acumulación de productos metabólicos en el medio, da lugar a una disminución de la velocidad de desarrollo tal y como se observa en las curvas de crecimiento bacteriano *in vitro*.

En un sentido mecanicista, la evolución en el tiempo de una población de bacterias en un sistema *in vitro* puede ser interpretada como el resultado de dos procesos competitivos: un proceso de continuo crecimiento por parte de una fracción de la población y la muerte de la porción restante (Firsov *et al.*, 1997). Por lo tanto la velocidad de crecimiento bacteriano es aparente, ya que es la resultante de la diferencia entre la velocidad de crecimiento real menos la velocidad de muerte bacteriana, tal como se expresa a continuación:

$$VCB_A = VCB_R - VMB$$

dónde  $VCB_A$  es la velocidad de crecimiento bacteriano observada o aparente,  $VCB_R$  es la velocidad de crecimiento bacteriano real y VMB es la velocidad de muerte bacteriana.

Para la optimización de los regímenes terapéuticos de los antibióticos, se necesita conocer con qué grado éstos pueden modificar la dinámica del desarrollo bacteriano, hasta el punto que la magnitud del proceso de muerte bacteriana predomine sobre la magnitud del proceso de crecimiento.

Muchas técnicas de laboratorio se utilizan para evaluar de manera objetiva la eficacia de un antibiótico seleccionado considerando la respuesta inmune inespecífica de base humoral de un individuo. En este sentido, el ensayo del poder bactericida del suero (García Rodríguez *et al.*, 2001) proporciona información acerca de la menor concentración de un antibiótico capaz de inhibir el desarrollo bacteriano visible en presencia de suero obtenido de un paciente tras la administración de una dosis terapéutica de un antibiótico. Sin embargo, esta metodología presenta la limitación de cuantificar la actividad del antibiótico al final de un tiempo de exposición de 18 a 24 horas, lo que solamente refleja la actividad acumulada al final de ese período sin tener en cuenta la evolución del efecto bactericida en el tiempo, al momento que no permite discriminar entre un efecto bacteriostático o bactericida.

Por otra parte, el modelo de velocidad bactericida del suero propuesto por Riera *et al.* (1996), se basa en un modelo *in vitro* de curva de muerte bacteriana, y fue diseñado para seleccionar el agente antibiótico según la rapidez con que se reducía la masa bacteriana en las primeras seis horas de contacto de ésta con el suero obtenido de un paciente, tras la administración de una dosis terapéutica de un antibiótico. Al igual que el ensayo propuesto por García Rodríguez *et al.* (2001) tampoco permite discriminar la actividad de cada uno de los componentes del sistema.

El modelo propuesto en este trabajo constituye una primera instancia para evaluar la magnitud del efecto bactericida intrínseco del suero (complemento y AcN) según la velocidad de desarrollo de cada bacteria en particular. En nuestro ensayo, la presencia de complemento y los AcN fue puesta de manifiesto mediante el test de hemólisis de GRC en presencia de SBA donde la fracción sérica del complemento fue activada por el complejo formado entre los AcN y los carbohidratos presentes en la superficie de los GRC, dando como resultado una elevada actividad hemolítica sobre los GRC ( $89,5 \pm 4,16\%$ ). La presencia de estos factores en el SBA fue corroborado por la baja actividad hemolítica del SBA+EDTA ( $5,63 \pm 1,71\%$ ) y del STSC ( $5,51 \pm 0,73\%$ ) (Figura 2).

La actividad conjunta de los AcN y del complemento presentes en el SBA, produjo un incremento en la magnitud de la VMB, lo que resultó una disminución de la VCB<sub>R</sub> en las dos cepas bacterianas (Figura 3 y Cuadro 2). La consecuencia de este proceso dio como resultado una disminución en el conteo de bacterias viables en el MHB/SBA que se tradujo en una eficacia antibacteriana del  $92,5 \pm 4,55\%$  para *Escherichia coli* y de  $74,7 \pm 20,5\%$  para *Staphylococcus aureus* (Cuadro 4).

La ausencia de actividad de complemento en STSC, explica por qué el desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922 en MHB/STSC fue similar al observado en MHB. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 que en presencia de STSC exhibió un desarrollo mayor a lo observado en MHB (Figura 3 y Cuadro 2). Aunque no disponemos de una explicación para este hallazgo, es posible que el STSC hubiese enriquecido el medio de cultivo aportando determinados factores que determinaron el incremento selectivo del desarrollo de *Staphylococcus aureus*. Esta hipótesis se basa en el conocido empleo del suero fetal bovino como aditivo para enriquecer los medios de cultivo. No obstante serán necesarios futuros estudios para determinar la causa de este fenómeno.

La metodología propuesta en este estudio consiste en cuantificar la actividad bactericida del SBA utilizando como parámetro integrado el ABC cuyo valor es proporcional a la masa bacteriana desarrollada en presencia de este. Si consideramos la magnitud de esta masa bacteriana y si dispusiéramos de datos de masa bacteriana desarrollada en presencia de antibiótico y SBA, entonces la masa bacteriana eliminada por acción del antibiótico podría ser fácilmente estimada y expresada como porcentaje de eficacia antibiótica en presencia de SBA, tal como se presenta a continuación:

$$ABC_A = ABC_{SBA} - ABC_{AB}$$

$$EA = [1 - (ABC_A / ABC_{AB})]$$

donde  $ABC_A$  es el ABC (masa bacteriana) eliminada por efecto del antibiótico,  $ABC_{SBA}$  es el ABC de la masa bacteriana desarrollada en presencia de SBA,  $ABC_{AB}$  es el ABC de la masa bacteriana desarrollada en presencia de

SBA y antibiótico y EA es la eficacia del antibiótico expresada como porcentaje de reducción de la masa bacteriana.

De esta manera se podría evaluar con mayor precisión la verdadera actividad de un antibiótico en presencia de factores de respuesta inmune inespecífica de base humoral presentes en el suero (complemento y AcN). Otro aspecto a tener en cuenta es que la evolución en el tiempo de las masas bacterianas se estimarían a partir de curvas de crecimiento y muerte construidas durante las 10 horas o más, lo que permitiría evaluar participación de los componentes del sistema inmune en la actividad de los antibióticos según su modo de acción, sean éstos bactericidas o bacteriostáticos, con actividad dependiente de su concentración o dependiente del tiempo de contacto con las bacterias.

## CONCLUSIÓN

Aunque los estudios *in vitro* no pueden reproducir con exactitud las condiciones presentes en un organismo viviente, éstos sin embargo proporcionan información acerca de la dinámica de una población bacteriana más cercana al escenario *in vivo*.

El complemento y los AcN presentes en el suero de los bovinos adultos son responsables de una actividad bactericida cuya magnitud potencia la actividad de las drogas antibacterianas en grado variable según la magnitud de respuesta inmune del individuo. Aunque este hecho ya fue demostrado por el empleo de otras metodologías, éstas sólo cuantifican una respuesta bactericida acumulativa del antibiótico y del suero en conjunto sin discriminar la actividad de cada uno de estos componentes.

La cinética bactericida del suero bovino se expresa como una disminución en la velocidad de crecimiento bacteriano que no ocurre de manera instantánea sino de forma gradual, y que podría tener un impacto diferente sobre la actividad de un antibiótico según su modo de acción.

En este trabajo proponemos un modelo alternativo para estudiar el impacto de los factores de respuesta inmune de base humoral presentes en el suero de bovinos adultos sobre la dinámica poblacional de un inóculo bacteriano, modificando un modelo *in vitro* de curva de crecimiento por incorporación al medio de cultivo suero de un individuo adulto con el fin de adicionar al modelo factores de respuesta inmune innata de base humoral, a fin de cuantificar la actividad bactericida intrínseca de éstos en ausencia de antibiótico.

Finalmente, la incorporación de esta metodología en los estudios *in vitro* de eficacia antibiótica en presencia de suero realizados con curvas de muerte bacteriana, permitirían evaluar con mayor precisión la eficacia real del antibiótico en presencia de la actividad de ciertos factores de respuesta inmune inespecífica de base humoral como el complemento y los AcN.

El análisis de los datos experimentales mediante la utilización de modelos matemáticos adecuados, permitirá simular y predecir con mayor exactitud la eficacia de diferentes esquemas terapéuticos simulando condiciones ambientales presentes en un escenario *in vivo*.

## BIBLIOGRAFIA

- BAGGOT, J. D. 2001. The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. Blackwell Science, Oxford.

- BLONDEAU, J.** 2009. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet Dermatol.* 20: 383-396.
- BOLGER, M. S.; ROSS, D.S.; JIANG, H.; FRANK, M. M.; GHIO, A. J.; SCHWARTZ, A. & WRIGHT, J. R.** 2007. Complement levels and activity in the normal and LPS-injured lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292: 748-759.
- FIRSOV, A. A.; VOSTROV, S. N.; SHEVCHENKO, A. A. & CORNAGLIA, G.** 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.* 34: 1312-1317.
- 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.
- HEIN, W. R.** 1994. Ontogeny of T cells, in Cell Mediated Immunity in Ruminants, Gooddeeris, B.M.L. and Morrison, W.I. ed. CRC press. pp 19-36.
- KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T. & YAMASHINA, I.** 1983. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J. Biochem. Tokyo.* 94, 937-947.
- 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.
- MAYER, M. M.** 1967. Complement and complement fixation. In EA Kabat, M.M. Mayer eds. *Experimental immunochemistry*, 2nd ed. Springfield, I.L. Charles Thomas: 133-240.
- MATSUSHITA, M.** 1996. The lectin pathway of the complement system. *Microbiol. Immunol.* 40, 887-893.
- MATSON, K. D.; RICKLEFS, R. E. & KLASING, K.C.** 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Dev Comp Immunol.* 29: 275-286.
- 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.
- ODENHOLT, I.** 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17: 1-8.
- PLOEGAERT, T.C.W.; TIJHAAR, E.; LAMB, T.J.G.M.; TAVERNE-THIELE, A.; VAN DEL POEL, J. J.; VAN ARENDONK, J. A. M.; SAVELKOUL, H. F. J. & PARMEN-TIER, H.K.** 2011. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: variability among cows, repeatability within cows, and relation between milk and plasma titers. *Vet Immunol Immunopathol.* 144: 88-94.
- RIERA, E. B.; ROLLETI, R. & ROSSI, M. A.** 1996. Velocidad bactericida del suero: propuesta metodológica para predecir la eficacia de la terapia antimicrobiana. *Medicina.* 56(2):115-118.
- SIROSKI, P. A.** 2010. Characterization of the serum complement activity of the broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Zool Stud* 49(1): 64-70.

- STOTT, G. H.; F. WIERSMA; B. E. MENEFEE & R. RADWANSKI.** 1976. Influence of environment on passive immunity in calves. *J. Dairy Sci.* 59:1306-1311.
- TURNER, M. W.** 1996. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today* 17, 532-540.
- TOSI, M. F.** 2005. Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin Immunol.* 116: 241-249.
- VAN KNEGSEL, A. T.; DE VRIES REILINGH, G.; MEULENBERG, S.; VAN DEN BRAND, H.; DIJKSTRA, J.; KEMP, B. & PARMENTIER, H. K.** 2007. Natural antibodies related to energy balance in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 5490-5498.
- WHITE, R. L.** 2001. What *in vitro* models of infection can and cannot do?: potential drawbacks of *in vitro* pharmacodynamic studies. *Pharmacotherapy* 21(11S).

---