

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE CEFALEXINA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* EN SUERO Y ORINA DE CANINO

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

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de cefalexina y la actividad bactericida intrínseca de suero y orina de canino sobre seis cepas de *Escherichia coli*, utilizando un modelo *in vitro* de dilución simulando las concentraciones de cefalexina en estos fluidos biológicos durante la fase de eliminación tras la administración de una dosis por vía intravenosa. La concentración inhibitoria mínima de cefalexina en todas las cepas fue de 16 µg/ml a pH estándar de 7,4 y a valores de 6,5 y 5,5. El valor de la CIM no se modificó en presencia de suero u orina. En el modelo dinámico *in vitro*, la eficacia de cefalexina en medio de cultivo estándar fue de  $57,2 \pm 3,95\%$ , mientras que en presencia de suero ésta se incrementó a  $74,3 \pm 8,59\%$ , aunque a concentraciones mayores a las presentes en suero, la eficacia de cefalexina en orina fue de  $68,7 \pm 4,19\%$ . En conclusión, nuestro ensayo destaca el importante papel de la actividad bactericida de estos fluidos biológicos en el éxito de la terapéutica antibiótica y propone el concepto de efecto bactericida total o global.

*Palabras clave:* actividad antibacteriana, cefalexina, *Escherichia coli*, suero canino, orina canina.

### SUMMARY

#### ***In vitro* antibacterial activity of cephalexin on *Escherichia coli* in serum and urine from dogs.**

The aim of this study was to evaluate the activity of cephalexin and the intrinsic antibacterial activity of dog serum and urine on six strains of *Escherichia coli*, using a dynamic one step dilution *in vitro* one compartmental model, simulating cephalexin concentrations in these biological fluids during its elimination phase after the intravenous administration. The minimum inhibitory concentration of cephalexin for all strains was 16 µg/mL at standard pH value of 7.4 and at values of 6.5 and 5.5. The CIM was not modified by serum or urine. In the dynamic *in vitro* model, the efficacy of cephalexin

---

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 5 de marzo de 2012 y aceptado para su publicación el 28 de noviembre de 2012.

in standard culture medium was  $57.2 \pm 3.95\%$ , while in presence of serum this increased to  $74.3 \pm 8.59\%$ , although at higher concentrations than those present in serum, the efficacy of cephalexin in urine was  $68.7 \pm 4.19\%$ . In conclusion, our study emphasizes the important role of the antibacterial activity of these biological fluids in the success of the antibiotic therapy and proposes the concept of total or global bactericidal effect.

*Key words:* antibacterial activity, cephalexin, *Escherichia coli*, dog serum, dog urine.

## INTRODUCCIÓN

La cuantificación de la actividad de los agentes antibacterianos es la base del empleo racional y seguro de los mismos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana. Si bien, desde su descubrimiento la concentración inhibitoria mínima (CIM) constituye el principal parámetro farmacodinámico en el que se basa el diseño de los regímenes terapéuticos antibacterianos (Mueller *et al.*, 2004), en las últimas tres décadas se han revalorizado ciertas propiedades *in vitro* de los antibióticos, cómo el efecto posantibiótico (PAE) y la actividad de éstos a concentraciones menores a la CIM (Efecto sub-CIM) (Odenholt, 2001), los que han arrojado luz sobre su farmacodinamia y han permitido optimizar la posología de los mismos y conducir a un empleo más racional de estos.

A los efectos, la construcción de curvas de muerte bacteriana constituye una herramienta útil para evaluar la actividad de diferentes concentraciones de estos agentes en función del tiempo (Liu *et al.*, 2002).

Sin embargo, estos ensayos *in vitro* presentan una limitante y es que evalúan la actividad de un antibiótico en función de concentraciones fijas del mismo, mientras que en un organismo viviente, estas son fluctuantes en el tiempo a causa de los procesos farmacocinéticos de absorción, distribución y eliminación (Sabath, 1978; Toutain *et al.*, 2002).

Un modelo *in vitro* de concentraciones fijas diseñado para superar esta limitación es el ensayo para determinar el efecto posantibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM). Este modelo se basa en exponer a las bacterias a una concentración suprainhibitoria ( $>$ CIM) del antibiótico durante un período de 2 o 4 horas y luego a concentraciones subinhibitorias ( $<$ CIM) durante un período prolongado de tiempo. De esta manera se simula la exposición de las bacterias durante el pico de concentración plasmática (fase de absorción), seguido de la exposición a concentraciones decrecientes que se producen durante la fase de eliminación del fármaco en un organismo viviente (Odenholt, 2001; Mueller *et al.*, 2004).

En los últimos años se han propuesto modelos dinámicos *in vitro* que reproducen fielmente las curvas de disposición de un antibiótico en función del tiempo en los fluidos biológicos de un organismo viviente. Estos modelos permiten describir con mayor precisión la relación entre la evolución de las concentraciones del antibiótico y la evolución de la población bacteriana en función del tiempo (Chambers *et al.*, 1991; Begg *et al.*, 1992). Sin embargo, estas condiciones experimentales difieren respecto de lo que ocurre en un organismo viviente debido a la ausencia de la actividad antibacteriana de los componentes del sistema inmune del organismo (DeLeo *et al.*, 2009).

En la actualidad, la evaluación *in vitro* de la actividad de los antibióticos pretende

simular condiciones presentes en el escenario *in vivo*, estudiando la interacción entre la droga, las bacterias y el organismo viviente (farmacocinética y respuesta inmune), ya que la experiencia clínica indica que el éxito de la terapéutica antimicrobiana depende de la función normal de los sistemas de defensa del paciente (Kristian *et al.*, 2007; Mehrzad *et al.*, 2009).

El objetivo de este estudio fue el de evaluar la interacción entre cefalexina y la actividad antibacteriana intrínseca de suero y orina de caninos (SC y OC) sobre seis cepas de *Escherichia coli*, utilizando un modelo *in vitro* de dilución de un compartimiento, simulando las concentraciones de cefalexina en estos fluidos biológicos durante la fase de eliminación, luego de la administración de una dosis terapéutica a un canino por vía intravenosa. Este antibiótico posee actividad antibacteriana tiempo dependiente, es activo sobre *Escherichia coli*, en caninos presenta una semivida de eliminación de aproximadamente 1,5 horas (Baggot, 2001) y es considerado como antibiótico de primera elección para el tratamiento de la infección no complicada del tracto urinario.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MICROORGANISMOS Y ANTIBIÓTICO

Se emplearon seis cepas de *Escherichia coli*, cinco de las cuales eran autóctonas; EC-017, EC-018, EC-019, EC-023a y EC-023b, las que fueron aisladas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral a partir de muestras de secreciones uterinas de vacas con signos clínicos de endometritis puerperal aguda en la zona rural de Esperanza, Departamento Las Colonias,

Provincia de Santa Fe, Argentina, en tanto que como control se empleó la cepa ATCC 29522.

El antibiótico utilizado fue un estándar de cefalexina monohidrato de pureza conocida (Sigma-Aldrich, Chemical Company, St. Louis, USA).

### SUERO Y ORINA DE CANINO

Todas las muestras biológicas fueron obtenidas a partir de caninos sanos ( $n = 6$ ) que no presentaron historial de terapia antibiótica en los tres meses previos a la realización de los ensayos. El suero canino (SC) se aisló de muestras de sangre que se obtuvieron por punción venosa. Las muestras de orina (OC) se obtuvieron por medio de punción vesical. El pH del pool de suero fue 7,8 y el pH del pool de orina fue 7,2. La esterilidad del suero y de la orina fue corroborada por ausencia de desarrollo bacteriano mediante pruebas bacteriológicas clásicas. Las muestras biológicas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### INÓCULO BACTERIANO

Los inóculos bacterianos de las seis cepas de *Escherichia coli* consistieron en una suspensión en solución salina isotónica de bacterias provenientes de colonias en fase de crecimiento. Cada suspensión presentó 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 colonia/ml (UFC/ml). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta lograr para cada cepa una suspensión bacteriana madre con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml.

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cefalexina

sobre las cepas de *Escherichia coli* se realizó por el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008) en caldo Müller-Hinton (MH); Britania, Buenos Aires, Argentina, a pH estándar de 7,4 y a valores de 6,5 y 5,5. 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, presentando un pH de 7,4. El pH inicial del medio fue modificado con ácido fosfórico hasta ajustar los valores a 6,5 y 5,5.

Posteriormente se determinó la CIM en dos medios de cultivo adicionales constituidos por MH al cual se incorporó SC en proporción 50:50 (MH/SC) con un pH final de 7,3 y MH más OC en proporción 50:50 (MH/OC) con un pH final de 7,4.

Brevemente, la metodología para la determinación de la CIM consistió en diluciones aritméticas 1:1 de cefalexina en un rango de 0,5 a 64 µg/ml, las que 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. Cada ensayo se realizó por duplicado y las diluciones fueron incubadas a  $35 \pm 0,5$  °C, la lectura de los resultados se realizó luego de 20 horas de incubación. La CIM fue estimada como la menor dilución de cefalexina que evitó el desarrollo bacteriano visible.

### **CURVAS DE CRECIMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI***

Los inóculos de las cepas de *Escherichia coli*; ATCC 29522, EC-017, EC-018, EC-019, EC-023a y EC-023b en MH, MH/SC y MH/OC con una densidad bacteriana equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC/ml, se incubaron a  $35 \pm 0,5$  °C en ausencia de antibiótico. Para cada una de las cepas de *Escherichia coli* en cada medio de cultivo las curvas de crecimiento fueron construidas por triplicado.

Para la construcción de las curvas de crecimiento, se tomaron alícuotas (100 µl) de cada uno de los inóculos a intervalos de tiempo equivalentes a la semivida de cefalexina (1,5 h) durante 10,5 horas.

Con cada una de las alícuotas obtenidas en cada tiempo de muestreo, se hicieron diluciones seriadas en solución salina isotónica. Una alícuota (100 µl) de cada última dilución fue extendida sobre la superficie de una placa de agar con extensor de Digrafsky e incubada  $35 \pm 0,5$ °C durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de UFC por placa de agar.

### **MODELO FARMACODINÁMICO *IN VITRO***

Se utilizó un modelo farmacodinámico *in vitro* basado en la sustitución de concentraciones fijas de medio de cultivo sin bacterias a intervalos regulares (Picco *et al.*, 2011). Este modelo permitió simular las concentraciones plasmáticas y urinarias de cefalexina durante su fase de eliminación exponencial tras su administración intravenosa en caninos, e investigar su actividad antibacteriana en presencia de estos fluidos biológicos.

### **PROCEDIMIENTO**

Considerando la actividad tiempo dependiente de cefalexina, se extrajeron de los inóculos de cada una de las cepas de *Escherichia coli* en MH y en MH/SC alícuotas de 1 ml, las que fueron expuestas a una concentración máxima del antibiótico equivalente a 4 veces el valor de la CIM estimada en este ensayo. A fin de simular las elevadas concentraciones de este antibiótico en orina, debido a que el 90% de la dosis administrada es eliminada en forma inalterada por esta vía (Baggot, 2001), es que alícuotas de 1 ml se extrajeron de los inóculos de cada una de las cepas de *Escherichia coli* en MH/OC y fueron expuestas a una concentración de cefalexina equivalente

a 16 veces el valor de la CIM estimada en este ensayo.

Para cada cepa bacteriana en cada medio de cultivo (MH, MH/SC y MH/OC), las curvas de muerte fueron construidas por triplicado y en todos los casos, éstos presentaron una densidad bacteriana inicial equivalente a  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml.

Una vez que los inóculos de cada uno de los medios de cultivo fueron expuestos a las concentraciones preestablecidas de cefalexina, estos se incubaron a  $35 \pm 0,5$  °C durante un período equivalente a la semivida del antibiótico (1,5 hs).

Luego de este período, con ayuda de una pipeta (Boeco, Germany), 1 ml del medio de cultivo (MH, MH/SC o MH/OC) sin antibiótico fue agregado a cada uno de los inóculos iniciales a fin de diluir la concentración de cefalexina al 50% de la concentración inicial.

Los tubos fueron suavemente agitados en vórtex (Thermolyne, Mixer, Iowa, USA) y 1 ml de medio de cultivo de cada uno de los tubos fue descartado. El tiempo que tomó realizar este procedimiento para cada medio de cultivo fue menor a 3 minutos. Todo el procedimiento fue repetido sistemáticamente durante un tiempo equivalente a 7 semividas de eliminación.

De cada ml de medio de cultivo descartado en cada uno de los tiempos de muestreo, se obtuvo una alícuota (100  $\mu$ l) que se utilizó para la cuantificación bacteriana. El proceso de dilución seriada, extensión en placa de agar, incubación y conteo de UFC/placa fue idéntico al utilizado en la construcción de las curvas de crecimiento.

### CONSTRUCCIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO Y MUERTE

Los valores de UFC/ml a cada tiempo de muestreo 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 fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada réplica ( $n = 3$ ). Para facilitar la construcción y la interpretación de las curvas de crecimiento y muerte bacteriana, los valores de UFC/ml se expresaron como porcentaje del número inicial de bacterias viables al inicio del ensayo ( $N_0$ ).

### CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CEFALEXINA Y LOS FACTORES DE RESPUESTA INMUNE

Para evaluar la eficacia de cefalexina sobre las seis cepas de *Escherichia coli* se utilizaron parámetros farmacodinámicos descriptivos e integrados basados en el trabajo de Firsov *et al.*, (1997), los cuales se describen a continuación.

#### PARÁMETROS DESCRIPTIVOS

$C_0$ /CIM: cociente entre la concentración inicial de cefalexina y la CIM de *Escherichia coli*.

$N_0$ : tamaño inicial del inóculo (UFC/ml) expresado como porcentaje del total de bacterias viables (100%).

$t > \text{CIM}$ : tiempo en el que las concentraciones de cefalexina fueron mayores a la CIM.

$N_{\min}$ : mínimo número de bacterias viables en presencia de cefalexina expresado como porcentaje de  $N_0$ .

$t_{\min}$ : tiempo en el que se observó el mínimo número de bacterias viables en presencia de cefalexina.

TRB: tiempo de recuperación bacteriana o tiempo en el que el número de bacterias viables en presencia de cefalexina llega a ser igual a  $N_0$ .

### PARÁMETROS INTEGRADOS

ABCC: área bajo la curva del número de bacterias viables en ausencia de cefalexina en función del tiempo desde tiempo cero ( $t_0$ ) hasta el tiempo en el que se realizó la última cuantificación ( $t_z$ ) estimada a partir de los valores de UFC/ml expresadas como porcentaje del valor observado a  $t_0$ .

ABCT: área bajo la curva del número teórico de bacterias en estado estacionario ( $N_0$ ) desde  $t_0$  hasta TRB estimada a partir de los valores de UFC/ml expresadas como porcentaje del valor observado a  $t_0$ .

ABCA: área bajo la curva del número de bacterias en presencia de cefalexina desde  $t_0$  hasta TRB estimada a partir de los valores de UFC/ml expresadas como porcentaje del valor observado a  $t_0$ .

### PARÁMETROS DE EFICACIA

% Eficacia antibacteriana intrínseca de MH/SC ( $E_{SC}$ ):  $[1 - (ABCC_{SC}/ABCC_{MH})] \times 100$ .

% Eficacia antibacteriana intrínseca de MH/OC ( $E_{OC}$ ):  $[1 - (ABCC_{OC}/ABCC_{MH})] \times 100$ .

% Eficacia antibacteriana observada a  $t_{min}$  ( $Et_{min}$ ):  $N_0 - N_{min}$ .

% Eficacia global de cefalexina en MH/SC ( $EG_{SC}$ ):  $[1 - (ABCA_{SC}/ABCT_{SC})] \times 100$ .

% Eficacia global de cefalexina en MH/SC ( $EG_{OC}$ ):  $[1 - (ABCA_{OC}/ABCT_{OC})] \times 100$ .

La explicación de los parámetros descriptivos ( $N_0$ ,  $N_{min}$ ,  $t_{min}$ , TRB) e integrados (ABCT y ABCA) para evaluar la eficacia de cefalexina en presencia de suero y orina de canino se presentan en la Fig. 1.

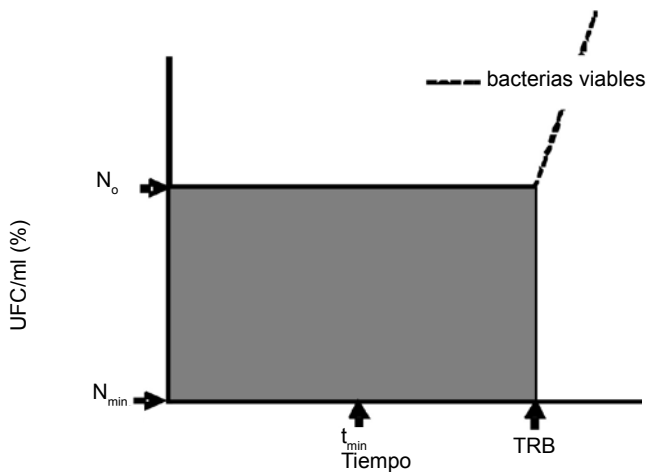


Fig. 1: Representación de una curva de evolución de una población bacteriana expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en función del tiempo, en donde los valores se expresan como porcentaje del tamaño inicial del inóculo. En la gráfica se hallan representados cuatro parámetros farmacodinámicos descriptivos;  $N_0$  indica el número de bacterias viables a tiempo cero,  $N_{min}$  indica el menor número de bacterias viables observado,  $t_{min}$  indica el tiempo al cual se observa el menor número de bacterias viables, TRB indica el tiempo que tomó a la población bacteriana volver a incrementar el número de bacterias viables al valor observado a tiempo cero. La zona sombreada comprendida entre  $N_0$  y TRB, corresponde al área bajo la curva del total teórico de bacterias viables en estado estacionario en ausencia de cefalexina (ABCT). La región que se halla por debajo de los valores de bacterias viables (línea de puntos) corresponde al área bajo la curva de bacterias viables en presencia de cefalexina (ABCA).

## 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 entre éstos fueron determinadas con el test de Bonferroni. En todos los casos el límite de significación fue fijado en 5% ( $p = 0,05$ ).

## RESULTADOS

La CIM de cefalexina sobre las seis cepas de *Escherichia coli* en MH a los valores de pH de 7,4 - 6,5 y 5,5 y en MH/SC y MH/OC fue de 16 µg/ml.

La evolución temporal de seis inóculos de *Escherichia coli* en ausencia de cefalexina en MH, MH/SC y MH/OC se encuentra representada gráficamente en la Fig. 2.

El mayor desarrollo bacteriano luego de 10,5 hs de cultivo se observó en MH. En el medio de cultivo que incorporó SC, el

desarrollo bacteriano se redujo en un  $59,7 \pm 18,5\%$ , mientras que en el medio de cultivo que incorporó OC, este desarrollo se redujo un  $99,2 \pm 0,47\%$  (Cuadro 1).

La disposición real y teórica de cefalexina lograda con el modelo farmacodinámico de dilución aritmética a intervalos equivalentes a la semivida del antibiótico (1,5 h) se presenta gráficamente en la Fig. 3.

La evolución temporal de la masa bacteriana de las seis cepas de *Escherichia coli* en función de concentraciones de cefalexina que simulan una fase de eliminación de orden uno en MH, MH/SC y MH/OC se presentan en las Figs. 4, 5 y 6 respectivamente.

Las concentraciones de cefalexina logradas en intervalos de 1,5 horas en MH, MH/SC y MH/OC se presentan en el Cuadro 2.

En todos los medios de cultivo, el mínimo número de bacterias viables se observó a las 4,5 horas y el menor porcentaje de reducción se observó en MH ( $80,7 \pm 5,15\%$ ), no observándose diferencias en los porcentajes de reducción observados entre MH/SC que

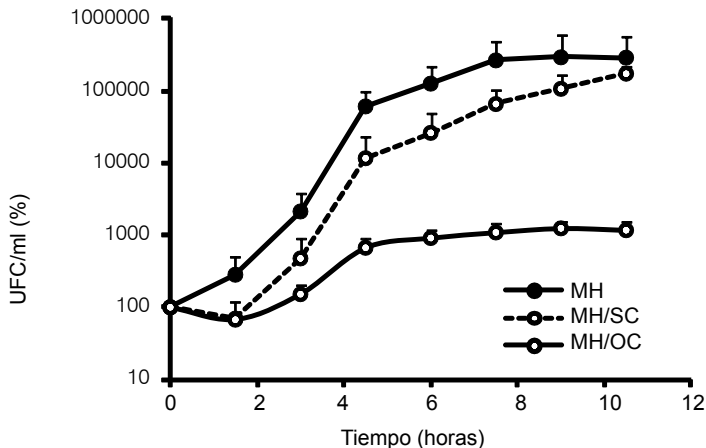


Fig. 2: Evolución temporal de inóculos de *Escherichia coli* ( $n = 6$ ) en MH, MH/SC 50:50 y MH/OC 50:50 en ausencia de cefalexina durante 10,5 horas. En cada tiempo de muestreo los datos están expresados como porcentaje de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) respecto del valor observado a tiempo cero. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desvío estándar

presentó una reducción de  $91,1 \pm 6,43\%$  y MH/OC cuyo porcentaje de reducción fue de  $89,5 \pm 2,56\%$  (Cuadro 3).

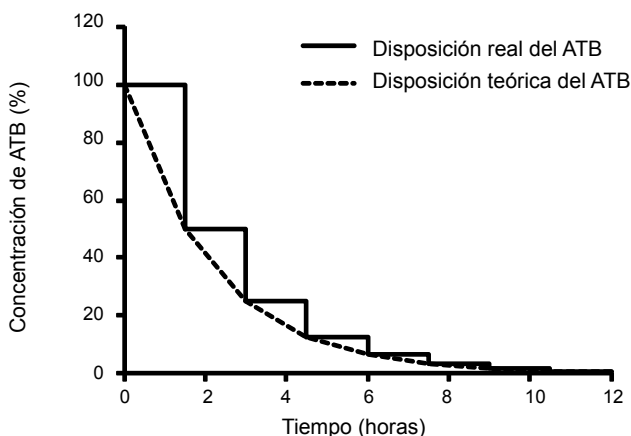
El tiempo de recuperación bacteriana (TRB) en presencia de cefalexina llegó a ser igual al número inicial (TRB); fue menor en MH ( $7,20 \pm 0,62$  hs) respecto del observado en MH/SC y MH/OC, donde estos tiempos

presentaron valores de  $8,46 \pm 0,87$  h y  $8,62 \pm 0,78$  h respectivamente. La eficacia global de cefalexina sobre las seis cepas de *Escherichia coli* en MH fue de  $57,2 \pm 3,95\%$ , mientras que este valor se incrementó con la incorporación de SC al medio de cultivo estándar ( $74,3 \pm 8,59\%$ ).

*Cuadro 1: Valores de los parámetros integrados utilizados para cuantificar el número de bacterias viables (ABCC) obtenidas en las curvas de crecimiento de Escherichia coli (n = 6) realizadas en MH, MH/SC y MH/OC y la eficacia antibacteriana intrínseca de los medios de cultivo que incorporaron SC y OC. Los valores se presentan como promedio ± desvío estándar.*

Parámetros	Medios de cultivo		
	MH	MH/SC	MH/OC
ABCC (UFC.h/ml)	$1329951 \pm 1067633^*$	$511644 \pm 213880^*$	$7148 \pm 2039^*$
E(%)	-	$59,7 \pm 18,5^*$	$99,2 \pm 0,47^*$

ABCC: área bajo la curva del número de bacterias viables en ausencia de ATB en función del tiempo desde tiempo cero ( $t_0$ ) hasta el tiempo en el que se realizó la última medición ( $t_1$ ) estimada a partir de los valores de unidades formadoras de colonia por mililitro expresadas como porcentaje del valor observado a tiempo cero. E: eficacia antibacteriana intrínseca en MH/SC y MH/OC expresada como % de reducción de bacterias viables respecto del crecimiento control (MH). (\*) indica diferencias entre valores de la misma fila.



*Fig. 3: Curva de concentraciones de cefalexina simulada con un modelo farmacodinámico in vitro de un compartimiento. La línea llena escalonada representa las concentraciones reales simuladas por el modelo, mientras que la línea de puntos representa la disposición teórica del ATB siguiendo una cinética de eliminación de orden uno con una semivida de 1,5 horas.*



Cuadro 2: Valores de concentraciones reales de cefalexina y múltiplos de CIM en función del tiempo en los tres medios de cultivo; MH, MH/SC y MH/OC. El símbolo (\*) indica el tiempo al cual se observó el menor conteo de bacterias viables en cada uno de los ensayos. Las concentraciones en negrita corresponden al valor de la CIM estimada para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 29522, EC-017, EC-018, EC-019, EC-023a y EC-023b.

Tiempo (horas)	MH + cefalexina		MH/SC + cefalexina		MH/OC + cefalexina	
	µg/ml	CIM x	µg/ml	CIM x	µg/ml	CIM x
0,0	64	4	64	4	256	16
1,5	32	2	32	2	128	8
3,0	<b>16</b>	1	<b>16</b>	1	64	4
4,5 (*)	8	0,5	8	0,5	32	2
6,0	4	0,25	4	0,25	<b>16</b>	1
7,5	2	0,125	2	0,125	8	0,5
9,0	1	0,0625	1	0,0625	4	0,25
10,5	0,5	0,03125	0,5	0,03125	2	0,125

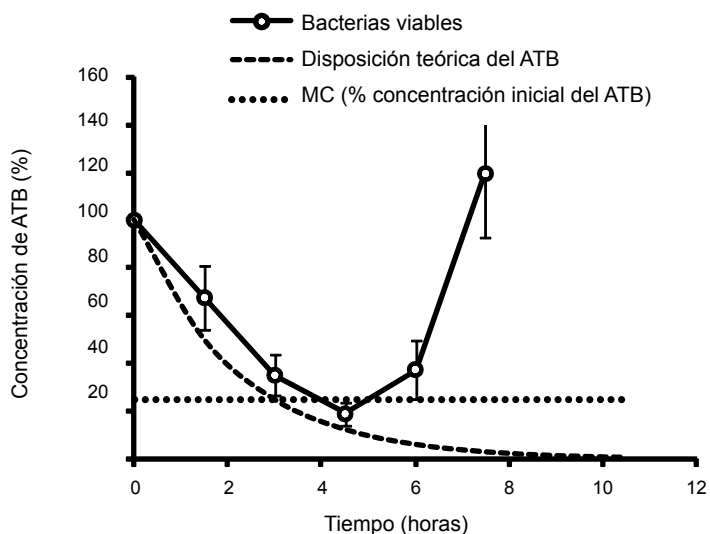


Fig. 4: Evolución temporal del tamaño de seis inóculos de *Escherichia coli* en MH en presencia de concentraciones de cefalexina simulando una fase de eliminación de orden uno con una semivida de 1,5 horas. Los valores de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y las concentraciones del ATB están expresados como porcentaje del valor inicial de los mismos a tiempo cero. El valor de la CIM (16 µg/ml) está representado como una línea de puntos horizontal, cuyo valor equivale al 25% de la concentración inicial de cefalexina (CIM x 4).

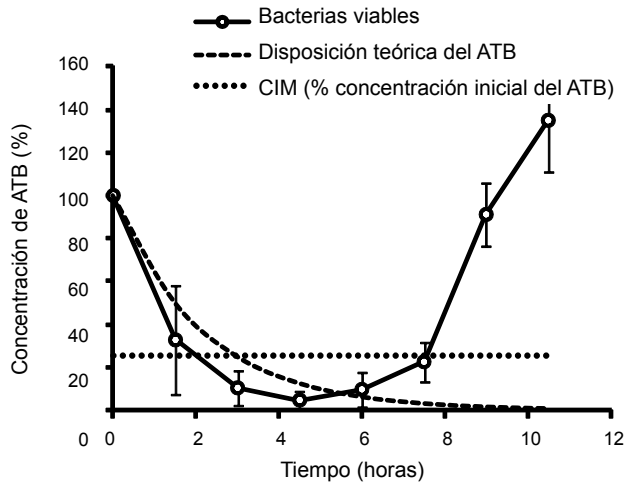


Fig. 5: Evolución temporal del tamaño de seis inóculos de *Escherichia coli* en MH/SC 50:50 en presencia de concentraciones de cefalexina simulando una fase de eliminación de orden uno con una semivida de 1,5 horas. Los valores de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y las concentraciones del ATB están expresados como porcentaje del valor inicial de los mismos a tiempo cero. El valor de la CIM (16  $\mu\text{g/ml}$ ) está representado como una línea de puntos horizontal, cuyo valor equivale al 25% de la concentración inicial de cefalexina (CIM x 4).

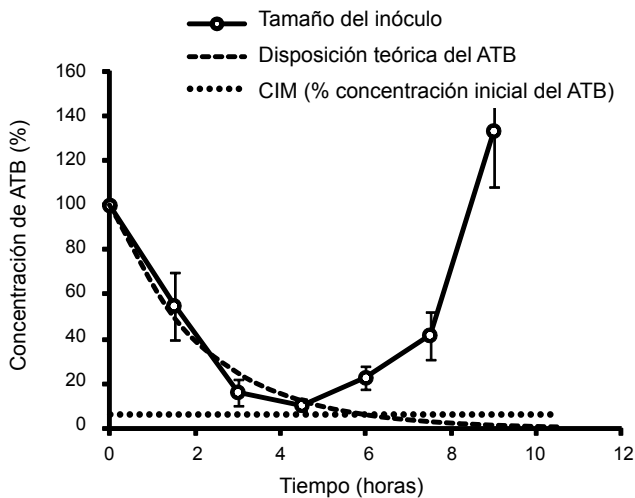


Fig. 6: Evolución temporal del tamaño de seis inóculos de *Escherichia coli* en MH/OC 50:50 en presencia de concentraciones de cefalexina simulando una fase de eliminación de orden uno con una semivida de 1,5 horas. Los valores de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y las concentraciones del ATB están expresados como porcentaje del valor inicial de los mismos a tiempo cero. El valor de la CIM (16  $\mu\text{g/mL}$ ) está representado como una línea de puntos horizontal, cuyo valor equivale al 6,25% de la concentración inicial de cefalexina (CIM x 16).

La eficacia de cefalexina en MH/OC, aunque presente en concentraciones 16 veces mayores que las encontradas en MH y MH/SC, presentó un valor de  $68,7 \pm 4,19\%$ . No se observaron diferencias entre los valores de eficacia de cefalexina observadas en los medios que incorporaron SC y OC respectivamente (Cuadro 3).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, describen muchos aspectos de actividad antibacteriana de cefalexina sobre *Escherichia coli*, especialmente en lo que respecta a la interacción entre el antibiótico, la bacteria

y los constituyentes del suero y la orina de caninos.

Cefalexina es una cefalosporina de primera generación con un amplio espectro de actividad sobre bacterias gram positivas y gram negativas. Estos compuestos son excretados en grandes proporciones por orina en forma inalterada y muchos son empleadas como antibióticos de primera elección para el tratamiento de la infección del tracto urinario (ITU) presentando una excelente actividad frente estafilococos, estreptococos, *Escherichia coli* y *Proteus* sp. (Dowling, 1996; Sumirtapura *et al.*, 2004).

Cefalexina es un ácido débil con dos valores de pKa (5,3 y 7,3), lo que le confiere un carácter anfótero (Charalabopoulos, 2003),

*Cuadro 3: Valores de los parámetros farmacodinámicos utilizados para evaluar la eficacia antibacteriana de cefalexina (ATB) sobre Escherichia coli (n = 6) en tres medios de cultivo; MH, MH/SC y MH/OC. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  desvío estándar.*

Parámetros	Medios de cultivo		
	MH + ATB	MH/SC + ATB	MH/OC + ATB
$C_0/CIM$ (h)	4	4	16
$t > CIM$ (h)	3	3	6
$t_{min}$ (hs)	4,5	4,5	4,5
$N_{min}$ (%)	$18,3 \pm 5,16$	$8,90 \pm 6,43$	$10,5 \pm 2,56$
$Et_{min}$ (%)	$80,7 \pm 5,16^*$	$91,1 \pm 6,43$	$89,5 \pm 2,56$
TRB (h)	$7,20 \pm 0,62^*$	$8,46 \pm 0,87$	$8,62 \pm 0,78$
ABCT (UFC.h/ml)	$719,7 \pm 61,5^*$	$846,2 \pm 86,5$	$862,3 \pm 78,2$
ABCA (UFC.h/ml)	$309,1 \pm 49,8^*$	$212,8 \pm 58,9$	$269,0 \pm 34,1$
EG (%)	$57,2 \pm 3,95^*$	$74,3 \pm 8,59$	$68,7 \pm 4,19$

$C_0/CIM$ : cociente entre la concentración inicial de cefalexina y la CIM de *Escherichia coli* ATCC.  $t > CIM$ : tiempo en que las concentraciones de cefalexina fueron mayores a la CIM.  $N_{min}$ : mínimo número de bacterias viables expresado como % del número inicial de bacterias ( $N_0$ ).  $t_{min}$ : tiempo en el que se observó la mínima concentración de bacterias viables.

$Et_{min}$ : eficacia observada a  $t_{min}$  expresada como % de reducción del número inicial de bacterias ( $N_0$ ).

TRB: tiempo de recuperación bacteriana o tiempo en el que el número de bacterias viables en presencia de ATB llega a ser igual al número inicial. ABCT: área bajo la curva del número teórico de bacterias en estado estacionario ( $N_0$ ) desde tiempo cero ( $t_0$ ) hasta TRB estimada a partir de los valores de unidades formadoras de colonia por mililitro expresadas como porcentaje del valor observado a tiempo cero. ABCA: área bajo la curva del número de bacterias en presencia de cefalexina desde  $t_0$  hasta TRB estimada a partir de los valores de unidades formadoras de colonia por mililitro expresadas como porcentaje del valor observado a tiempo cero. EG: eficacia bactericida global expresada como % del total de bacterias viables eliminadas. (\*) indica un valor diferente respecto a los demás de su fila.

lo que explicaría por qué su actividad *in vitro* (CIM) no fue afectada por el pH del medio de cultivo. Asimismo, este valor no se modificó por la presencia de suero y orina de caninos, lo que a primera instancia podría ser interpretado como la ausencia de una actividad bactericida intrínseca aditiva de estos fluidos biológicos. Sin embargo, debe considerarse que la CIM constituye un parámetro farmacodinámico estático y que no aporta información acerca de la dinámica de la población bacteriana en el tiempo. En una segunda instancia, la CIM constituye una concentración de antibiótico que inhibe el desarrollo bacteriano visible, por lo que es imposible poder distinguir entre actividad bactericida, bacteriostática, o retraso en el crecimiento bacteriano.

En tercer lugar, la CIM es determinada sobre diluciones aritméticas del antibiótico, por lo que la concentración inmediata menor constituye el 50% de su valor y la concentración inmediata superior presenta un valor 100% mayor al mismo, lo cual determina que la CIM se halle dentro un intervalo de concentraciones cuya eficacia se desconoce.

En vista de lo expuesto, la ausencia de una actividad adicional visible en los valores de la CIM de cefalexina a causa de la incorporación de SC y OC al medio de cultivo no excluye la presencia de una actividad antibacteriana sinérgica de los constituyentes de esos fluidos biológicos.

La evaluación de la actividad antibacteriana intrínseca del suero y orina de caninos se realizó mediante un modelo *in vitro* de crecimiento bacteriano en ausencia de cefalexina. En una población bacteriana coexisten los procesos de fisión binaria y muerte 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 y el balance es positivo, dando lugar a las curvas de crecimiento bacteriano, tal y como se presentan en la Fig. 2. Las curvas de crecimiento de las seis cepas de *Escherichia coli* realizadas 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/SC y MH/OC no fue negativo, ya que el número de bacterias viables al final del ensayo (UFC/ml) fue mayor al observado al inicio del mismo (Fig. 2). Sin embargo, el retraso en el desarrollo bacteriano en los medios de cultivo determinó que la masa bacteriana se redujera en un  $59,7 \pm 18,5\%$  en MH/SC y un  $99,2 \pm 0,47\%$  en MH/OC respecto de la masa bacteriana de referencia obtenida en el cultivo bacteriano en MH (Cuadro 1). Este retraso en el crecimiento bacteriano podría ser explicado por la actividad de los factores de la respuesta inmune específica e inespecífica presentes en el SC y la OC.

En el caso del SC, entre los posibles factores de respuesta inmune específica podemos considerar la actividad de anticuerpos específicos contra *Escherichia coli* que pudieron estar presentes en el SC, y entre los factores de respuesta inmune inespecífica podemos citar la presencia de complemento y péptidos endógenos con actividad antibacteriana. Ambos factores pueden actuar en forma sinérgica neutralizando, lisando y dañando a las bacterias sobrevivientes afectando el desarrollo de las mismas.

En el caso de OC, la osmolaridad puede inhibir el crecimiento bacteriano, además diversas sales, urea y ácidos orgánicos

pueden reducir la sobrevivencia bacteriana. Por otra parte, la presencia de lactoferrina puede secuestrar los iones de hierro indispensables para el metabolismo de muchas bacterias. Asimismo factores solubles tales como las proteínas de Tham-Horsfal, azúcares de bajo peso molecular, IgA y los uromucoides pueden presentar actividad opsonizante de los microorganismos (Mulvey *et al.*, 2000).

La velocidad bactericida observada hasta  $t_{\min}$  difiere entre el medio de cultivo estándar y los que incorporaron SC u OC. La inspección visual de las curvas de evolución de la población bacteriana en los diferentes medios de cultivo muestra que en el caso de MH los valores de bacterias viables se hallan por delante de los valores teóricos de concentración de cefalexina (Fig. 4), estos valores en MH/SC se hallan por detrás de estas concentraciones (Fig. 5) o sobre las mismas en el caso de MH/OC (Fig. 6). Sin embargo, el indicador objetivo de la eficacia bactericida inicial es el  $N_{\min}$  cuyos valores observados en MH ( $18,3 \pm 5,16$ ) son mayores a los observados en MH/SC ( $8,90 \pm 6,43$ ) y MH/OC ( $10,5 \pm 2,56$ ) (Cuadro 2), aunque estas diferencias estadísticas, difícilmente puedan tener un impacto clínico significativo.

La eficacia global o total (EG) es un parámetro que se utilizó para cuantificar la eficacia antibacteriana, considerando la reducción del número de bacterias viables en un intervalo de tiempo preestablecido, respecto de una concentración bacteriana de referencia, que en nuestro caso consistió en ABCT. Los resultados obtenidos en nuestro ensayo muestran una clara actividad antibacteriana adicional cuando al medio de cultivo se incorporó SC y OC (Cuadro 2).

Otro importante parámetro de eficacia incorporado a nuestro análisis fue el tiempo en el que la población bacteriana en presencia de antibiótico recuperó en número

de bacterias viables presentes al inicio del ensayo ( $N_0$ ) y lo definimos como tiempo de recuperación bacteriana (TRB). Un concepto similar fue propuesto por White & Toothaker (1985), quienes lo definieron como muerte total (“total killing”). El mismo parámetro de eficacia fue reconsiderado por McKenzie *et al.* (2002), quienes lo redefinen como tiempo de recuperación compuesto (TRC), ya que según estos autores sería el resultado de la suma del tiempo en el que las concentraciones del antibiótico son mayores a la CIM, más el tiempo de duración del efecto posantibiótico a concentraciones subinhibitorias (EPA sub-CIM), más el tiempo de recrecimiento bacteriano (TCB), tal como se presenta a continuación:

$$TRC = t > CIM + EPA \text{ sub-CIM} + TCB$$

En nuestro caso, esta última definición se ajusta a la actividad de cefalexina sobre las seis cepas de *Escherichia coli* en MH. Sin embargo, estos autores sólo consideraron la interacción *in vitro* entre el antibiótico y la bacteria sensible en un medio de cultivo estandarizado.

En nuestro estudio el EPA sub-CIM propuesto por McKenzie *et al.* (2002) no es suficiente como única explicación de la prolongación del tiempo de recuperación bacteriana, ya que el medio de cultivo fue suplementado con fluidos biológicos, los cuales incorporaron al mismo factores de respuesta inmune de base humoral específica e inespecífica presentes en SC y componentes con actividad antibacteriana intrínseca inespecífica presentes en OC. Por lo tanto, en el concepto de TRB, el efecto aditivo de la persistencia de la actividad del antibiótico, representado por el EPA sub-CIM y el TCB son reemplazados por el concepto de efecto bactericida total (EBT), que incluye la actividad antibacteriana producto de la

interacción entre la bacteria, el antibiótico y la actividad bactericida intrínseca del fluido biológico considerado, tal como se presenta a continuación:

$$\text{TRB} = t > \text{CIM} + \text{EBT}$$

De esta manera, en nuestro estudio, el EBT es incorporado como un nuevo parámetro para evaluar la eficacia de un antibiótico en presencia de la actividad antibacteriana intrínseca de los fluidos biológicos considerados.

Un hallazgo importante lo constituye un efecto de pérdida de actividad de cefalexina sobre las seis cepas de *Escherichia coli* en MH/OC respecto de la actividad observada en presencia de SC. En una primera instancia se observó que aunque las concentraciones iniciales de cefalexina en MH/SC fueron de 64 µg/ml [ $C_0 / (\text{CIM} \times 4)$ ] y de 256 µg/ml en MH/OC [ $C_0 / (\text{CIM} \times 16)$ ] (Cuadro 2), los valores de EG obtenidos en cada medio de cultivo no presentaron diferencias siendo sus valores de  $74,3 \pm 8,59\%$  y  $68,7 \pm 4,19\%$  respectivamente (Cuadro 3). Esta menor actividad antibacteriana adicional en MH/OC respecto de MH/SC, podía ser atribuida a la actividad tiempo dependiente de cefalexina, la cual como todos los betalactámicos no incrementaría su actividad a partir de una concentración equivalente a cuatro veces el valor de la CIM.

Sin embargo, en contraposición a su actividad dependiente del tiempo, cefalexina no presentó un incremento de su eficacia, aunque el valor de  $t > \text{CIM}$  en MH/OC fue notoriamente mayor (6 horas) respecto de lo observado en MH/SC (3 horas).

Otro indicador de la pérdida de actividad de cefalexina es la concentración a la cual se observa  $N_{\min}$ , que es el momento en que estas dejan de tener un efecto bactericida neto y la población bacteriana reinicia su crecimiento,

siendo este valor en MH/SC de 8 µg/ml (0,5 x CIM) y de 32 µg/ml (2 x CIM) en MH/OC (Cuadro 2).

Estos hallazgos muestran que cefalexina no presentó una eficacia adicional por su mayor tiempo de permanencia a concentraciones mayores a la CIM ( $t > \text{CIM}$ ), sino que su actividad disminuyó notablemente, al punto que las bacterias reiniciaron su crecimiento a partir de una concentración suprainhibitoria (32 µg/ml). Una explicación a este efecto paradójico, puede estar en el hecho que cefalexina es un antibiótico bactericida y su actividad es el resultado de su acción inhibidora sobre la síntesis de la pared bacteriana debido a su unión a una o más proteínas fijadoras de penicilina y que necesita actuar sobre bacterias en fase de crecimiento. Por lo tanto, el retraso del crecimiento bacteriano observado en MH/OC en ausencia de antibiótico y que produjo una reducción de  $99,2 \pm 0,47\%$  respecto del desarrollo observado en medio de cultivo estándar (MH) podría haber limitado la actividad del antibiótico en este medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en este ensayo permiten suponer que los factores de respuesta inmune de base humoral presentes en el SC, podrían haber incrementado la eficacia de cefalexina respecto de la observada en el medio de cultivo estándar. No obstante debe considerarse que en un organismo inmunocompetente, esta actividad se incrementaría aún más por la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares presentes en la sangre. Al respecto, Cerra *et al.* (2011) reportaron que en presencia de la actividad bactericida intrínseca del suero bovino y la actividad fagocítica de polimorfonucleares presentes en leucocitos aislados de sangre bovina, un antibiótico del grupo de los macrólidos, tulatromicina enfrentada a *Staphylococcus aureus* incrementó su potencia 16 veces respecto de la observada en medio

de cultivo estandarizado. También, aunque en nuestro ensayo *in vitro* fue posible observar un efecto paradójico de pérdida de actividad en OC, debe considerarse que el efecto de “lavado” de las bacterias presentes en suspensión en la orina provocado por el proceso de micción, contribuye a reducir la carga bacteriana presente en la misma hecho que favorecería la actividad del antibiótico.

Nuestro ensayo destaca el importante papel de la respuesta inmune en la terapéutica antibiótica y propone el concepto de efecto bactericida total o global (EBT) para explicar el incremento y la persistencia de la eficacia antibiótica observados en presencia de SC y OC. Asimismo enfatiza la importancia de la utilización de modelos farmacodinámicos *in vitro* que simulen perfiles de concentración de un antibiótico en medios de cultivo que incorporan factores de respuesta inmune presentes en diferentes fluidos biológicos, ya que proporcionan información adicional acerca de la actividad de un antibiótico en condiciones que son más próximas a las presentes en un organismo viviente.

## 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

- BAGGOT, J. D.** 2001. The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. Blackwell Science, Oxford.
- BEGG, E. J.; B. A. PEDDLE; S.T. CHAMBERS & D. R. BOSWELL.** 1992. Comparison of gentamicin dosing regimens using an *in vitro* model. J. Antimicrob. Chemother. 29:427-433.
- CERRA, M.; A. FUCHS; S. STIEFEL; D. GUMIY; U. NOTARO; P. DÍAZ; E. BARONI; E. PICCO & E. FORMENTINI.** 2011. Actividad *in vitro* de tulatromicina sobre cepas de *Staphylococcus aureus* en presencia de suero y leucocitos bovinos. Aceptado para su publicación en el Volumen 10 n°1 de Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias (ISSN 1666-938X).
- 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.
- CHAMBERS, S. T.; B. A. PEDDIE; R. A. ROBSON; E. J. BEGG & D. R. BOSWELL** 1991. Antimicrobial effects of lomefloxacin *in vitro*. J. Antimicrob. Chemother. 27: 481-489.
- CHARALABOPOULOS, K.; G. KARACHALIOS; D. BALTOGIANNIS; A. CHARALABOPOULOS; X. GIANNAKOPOULOS & N. SOFIKITIS.** 2003. Penetration of antimicrobial agents into the prostate. Chemother. 49:269-279.
- 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.
- DOWLIN, P. M.** 1996. Antimicrobial therapy of urinary tract infections. Can. Vet. J. 37: 438-441.
- FIRSOV, A. A.; S.N. VOSTROV; A. A. SHEVCHENKO & G. CORNAGLIA.** 1997. Parameters of bacterial killing and regrow

- kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: actions of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* model. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 41(6): 1281-1287.
- KRISTIAN, S.A., A.M. TIMMER; G.Y. LIU; X. LAUTH; N. SALMAN; Y. ROSENFELD; Y. SHAI; R.I. GALLO & V. NIZET.** 2007. Impairment of innate killing mechanism by bacterisotatic antibiotics. *The FASEB J.* 21:1107-1116.
- McKENZIE, F.M.; K.E. MILNE & I.M. GOULD.** 2002. Calculation of composite recovery time: a new pharmacodynamic parameter. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 281-284.
- 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.
- 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.
- MULVEY, M.A.; J.D. SCHILLING; J.J. MARTINEZ & S.J. HULTGREN.** 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *PNAS.* 97(16):8829-8835.
- 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.
- PICCO, E.; M. CERRA; S. STIEFEL; P. MICHEL & E. FORMENTINI.** 2011. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic study of cephalexin and gentamicin antibacterial activity against sensible strains using a simple one-compartment *in vitro* model. *Rev. de Méd. Vét.* 162 (1) 45-49.
- SABATH, L.D.** 1978. Six factors that increase the activity of antibiotics *in vivo*. *Infection* 6 Suppl. 1 (S67).
- SUMIRTAPURA, Y.C.; J.S. PAMUDJI; N. INGRIYANI; W. SULISTIYO & H. SUHALIM** 2004. Urinary excretion profiles of four oral cephalosporines in Indonesian Healthy Subjects. *Acta Phar. Indo.* 29(2):50-58.
- 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.* 26: 71-79.
- WHITE, R.L.** 2001. What *in vitro* models of infection can and cannot do?: potential drawbacks of *in vitro* pharmacodynamic studies. *Pharmacother.* 21(11S).