

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL DICLOFENAC FRENTE A UNA CEPA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN PRESENCIA DE LECHE BOVINA

María Magdalena Mostafá

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

Área: Ciencias de la Salud

Sub-Área: Veterinaria

Grupo: X

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Diclofenac, Antibacteriano

INTRODUCCIÓN

El diclofenac (DCF) es un medicamento ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria por sus propiedades antiinflamatoria, analgésica y antipirética. No obstante ello se ha demostrado que posee cierta acción antibacteriana frente a bacterias gramnegativas y grampositivas, entre ellas *S. aureus* (Annadurai *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2008). Si bien no está completamente dilucidado, se postula que este accionar se debería a que reprime la expresión de genes que participan de la estabilidad y reparación del ADN bacteriano (Riordan *et al.*, 2011).

A fin de valorar la actividad antibacteriana, el principal indicador del cual se vale el clínico al momento de establecer el régimen posológico es el conocimiento de la concentración mínima inhibitoria (CIM), a la cual podemos definir como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento visible de un inóculo bacteriano (García Rodríguez *et al.*, 2001). Por otra parte, en la interpretación de estos indicadores se debe tener en cuenta que la CIM se determina en caldo de cultivo, y no en el entorno en el que las bacterias crecen *in vivo*, ya sea, sangre, fluido extracelular, orina, leche, o en presencia de exudado o detritos. El pH y el tenor de oxígeno del ambiente son también importantes, en particular, en localizaciones anatómicas específicas, tales como glándula mamaria o tracto urinario, al igual que el efecto de cuadros patológicos, como ser inflamación o presencia de abscesos (Ziv and Rasmussen, 1975; Luscombe and Nicholls, 1988).

La CIM es un parámetro farmacodinámico estático, por lo que para poder efectuar una mejor valoración cobran importancia los modelos dinámicos basados en curvas de crecimiento y muerte bacteriana, los cuales pueden evaluar el crecimiento y la muerte tanto en función del tiempo como de la concentración del antimicrobiano, pudiendo esta última mantenerse constante o fluctuar simulando lo que acontece *in vivo*.

Por tanto, en el presente trabajo se estudió la influencia de la incorporación de leche al medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana del DCF frente a una cepa de referencia de *S. aureus*.

Proyecto: Caracterización de la actividad antimicrobiana *in vitro* del diclofenac frente a *Staphylococcus aureus* valorando su interacción con los antibióticos usados en el tratamiento de mastitis bovina.

Director del proyecto: Eduardo J. Picco

Director del alumno: Eduardo J. Picco

METODOLOGÍA

A fin de caracterizar la actividad antibacteriana del DCF en presencia de leche bovina se utilizó un modelo dinámico de curva de crecimiento y muerte bacteriana. Para ello se procedió a enfrentar un inóculo de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) de *S. aureus* ATCC 29740 a concentraciones de DCF iguales a 256, 512 y 1024 $\mu\text{g/mL}$. La solución de DCF se preparó a partir de un estándar de pureza conocida. Como medio de cultivo se empleó caldo Mueller-Hinton (CMH) enriquecido con leche en relación 50:50, añadiéndose para efectuar la dilución leche ultrapasteurizada (UHT) parcialmente descremada (1,5% de materia grasa, pH 6,65). El pH final del medio de cultivo fue de 7,00. Por otra parte, tubos con CMH y CMH:Leche se utilizaron como testigos para valorar el crecimiento bacteriano en ausencia de DCF. Todos los tubos se incubaron en estufa a 35°C y se tomaron alícuotas del medio de cultivo a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas posteriores al inicio del ensayo, las que previa dilución en solución fisiológica fueron sembradas en placas de Petri. Después de 24 horas de incubación se procedió a efectuar el conteo de colonias. La actividad bacteriostática de DCF en CMH:Leche se definió como la máxima dilución capaz de lograr una concentración igual o menor a \log_{10} de la concentración inicial del inóculo (N_0) luego de 24 h de exposición a 35°C . Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como su valor promedio.

RESULTADOS

La evolución temporal de la población bacteriana de esta cepa luego de haber sido expuesta a distintas concentraciones de DCF respecto al crecimiento control se muestran representadas gráficamente en la Figura 1.

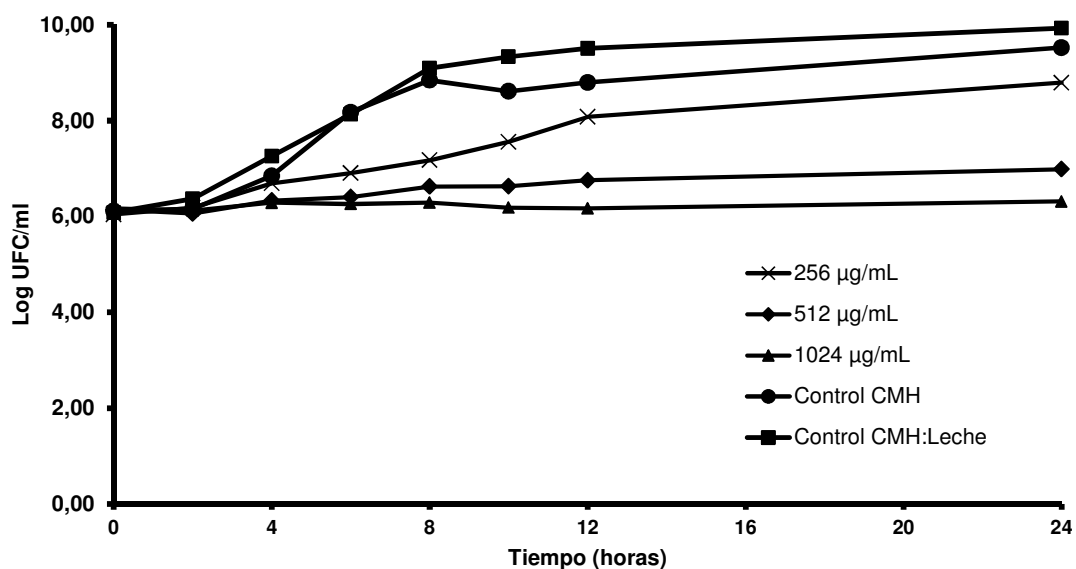


Figura 1. Evolución de la masa bacteriana de *Staphylococcus aureus* enfrentada a diferentes concentraciones de diclofenac en CMH:leche bovina en proporción 50:50.

Puede apreciarse un mayor desarrollo en la masa bacteriana de *S. aureus* en el caldo enriquecido con leche desde las 10 horas en adelante, respecto al crecimiento en CMH. Por otra parte, se evidencia que concentraciones de 256 µg/mL lograron reducir el crecimiento bacteriano de forma significativa, pero sin conseguir una actividad bacteriostática. Dicha actividad sólo se consiguió con una concentración de 1.024 µg/mL.

CONCLUSIONES

En este ensayo la concentración de DCF que inhibió el desarrollo bacteriano en CMH enriquecido con leche fue de 1.024 µg/mL. Este valor es 4 veces superior al valor obtenido en ensayos previos empleando como medio de cultivo CMH. Estas diferencias podrían deberse a la capacidad de la molécula de fijarse a la caseína de la leche y a glóbulos de grasa, con lo cual se vería limitada la capacidad para difundir hacia los microorganismos. Este trabajo demuestra la importancia de considerar el efecto de los fluidos biológicos en la actividad de DCF, por lo que los valores de CIM determinada en modelos *in vitro*, no necesariamente se correlacionan con lo que puede suceder *in vivo*. Por otra parte, hay que señalar que con la concentración de 256 µg/mL consiguió disminuir el crecimiento bacteriano respecto al que presentaba en el medio control, por lo cual esto podría contribuir a potenciar la actividad de antimicrobianos empleados en el tratamiento de rutina de la mastitis, fundamentalmente en el caso de los que actúan a nivel de la síntesis de ADN, ya que el DCF disminuiría la capacidad para restaurar o estabilizar el ADN, con lo cual la bacteria sería más sensible al accionar de estos antibacterianos (Riordan *et al.*, 2011).

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Annadurai, S.; Basu, S.; Ray, S.; Dastidar, S.G.; Chakrabarty, A.N.** (1998). Antibacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium. *Indian J. Exp. Biol.*, 36: 86-90.
- Dutta, N.K.; Mazumdar, K.; Baek, M.W.; Kim, D.J.; Na, Y.R.; Park, S.H.; Lee, H.K.; Lee, B.H.; Park, J.H.** (2008). *In vitro* efficacy of diclofenac against *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 27: 315-319.
- García Rodríguez J.A., Cantón R., García Sánchez J.E., Gómez-Luis M.L., Martínez Martínez L., Rodríguez-Avial C. & Vila J.** (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.
- Riordan, J.; Dupre, J.; Cantore-Matyi, S.; Kumar-Singh, A.; Song, Y.; Zaman, S.; Horan, S.; Helal, N.; Nagarajan, V.; Elasri, M.; Wilkinson, B.; Gustafson, J.** (2011). Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 10:30 1-11.
- Ziv, G.; Rasmussen, F.** (1975) Distribution of labelled antibiotics in different components of milk following intramammary and intramuscular administration. *J. Dairy Science* 58: 938-939