

SINERGISMO ENTRE CLOXACILINA Y ACEITE ESENCIAL DE *Melaleuca armillaris* FRENTE A *Staphylococcus aureus* A PH 7.4, 6.5 Y 5

Daniel Buldain^{1,2*}, Andrea Buchamer¹, Laura Marchetti¹, Florencia Aliverti¹, Nora Mestorino¹.

¹Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos –LEFyT–, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. Calle 60 y 118 s/n. ²CONICET La Plata, Buenos Aires, Argentina. *Autor de correspondencia danibuldain@gmail.com.

RESUMEN

Melaleuca armillaris Sm. es una planta de la familia de las Myrtaceae, cuyo aceite esencial (AE) presenta actividad inhibitoria *in vitro* frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Cloxacilina (CLOX), es un β -lactámico de uso extendido en el tratamiento de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*. Nuestro objetivo fue evaluar la existencia de un efecto potenciador del AE sobre CLOX en infecciones estafilocócicas de difícil resolución en busca de una estrategia contra la problemática de la resistencia bacteriana. Se determinó Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del AE de *M. armillaris* y de CLOX por separado y en forma combinada frente a cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y aisladas de vacas portadoras de mastitis subclínica. Estos parámetros farmacodinámicos se determinaron a pH 7.4, 6.5 y 5 con el objetivo de emular condiciones intracelulares y subcelulares en donde se ubica el microorganismo. Se evaluó velocidad de crecimiento específica (μ), tiempo de latencia (TL), y máxima densidad poblacional (MDP) a 0.5xCIM de CLOX, 0.5xCIM de AE y 0.5xCIM de la combinación AE/CLOX a pH 7.4. Se obtuvo un claro efecto sinérgico entre el AE y CLOX, resultado sumamente alentador ya que se logró inhibir al *S. aureus* en las diferentes condiciones analizadas.

SUMMARY

Melaleuca armillaris Sm. is a plant of the family Myrtaceae, whose essential oil (AE) has inhibitory activity *in vitro* against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Cloxacillin (CLOX), is a

β -lactam widely used in the treatment of bovine mastitis by *Staphylococcus aureus*. Our objective was to evaluate the existence of a potentiating effect of AE and CLOX against staphylococcal in difficult resolution infections as a strategy against the problem of bacterial resistance. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of *M. armillaris* AE and CLOX were determined separately and in combination against *S. aureus* ATCC 29213 and strains isolated from cows carrying subclinical mastitis. These pharmacodynamic parameters were determined at pH 7.4, 6.5 and 5 in order to emulate the intracellular and subcellular conditions in which the microorganism is located. The specific growth rate (μ), latency time (TL), and maximum population density (MDP) were 0.5xMIC of CLOX, 0.5xMIC of AE and 0.5xMIC of the AE/CLOX combination at pH 7.4. A clear synergistic effect was obtained between AE and CLOX, a very encouraging result since it was possible to inhibit *S. aureus* in the different conditions analyzed.

INTRODUCCIÓN

Melaleuca armillaris Sm. es una planta perteneciente a la familia de las Myrtaceae. Su AE presenta actividad inhibitoria *in vitro* frente a diversas especies bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Amri *et al.*, 2012). No existen estudios aún sobre el uso del AE de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas de difícil resolución. Por lo cual nos propusimos evaluar la interacción farmacodinámica establecida al asociar AE de *M. armillaris* y cloxacilina (CLOX), antimicrobiano de uso

extendido en el tratamiento de la mastitis bovina por *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron hojas y ramas herbáceas de *M. armillaris* de plantas ubicadas en la ciudad de Coronel Brandsen, Buenos Aires, Argentina. El AE del material vegetal recolectado se extrae mediante destilación por arrastre de vapor de agua. A partir de aislamientos obtenidos de vacas Holstein portadoras de mastitis subclínica, se seleccionaron, mediante difusión de disco, cepas de *S. aureus*, sensibles ($n=3$) y con sensibilidad disminuida ($n=2$) a oxacilina (CLSI 2009). *S. aureus* ATCC 29213 fue la cepa control. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) para CLOX y para el AE de *M. armillaris* por microdilución en caldo pH 7.4 (CLSI 2009). Se evaluaron combinaciones a concentraciones decrecientes de CLOX con el AE, frente a los aislados de *S. aureus* mediante tablero de damas o checkerboard (Gzybowska *et al.*, 2004). Se determinó el índice de la concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) según la siguiente fórmula:

$$\Sigma CFI = \frac{\text{CMI de } A_1 \text{ en combinación con } A_2}{\text{CMI } A_1 \text{ solo}} + \frac{\text{CMI de } A_2 \text{ en combinación con } A_1}{\text{CMI } A_2 \text{ solo}}$$

Se considera sinergismo (S) si $CFI \leq 0.5$; sinergismo parcial o bajo (SP) si $0.5 < CFI < 1$; indiferencia o adición (I) si $1 \leq CFI < 2$ y antagonismo (A) cuando $CFI \geq 2$.

A partir de los datos de CIM de CLOX y del AE individuales; y combinados se construyeron curvas de muerte bacteriana para la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 sin CLOX, con CLOX, AE y la mezcla AE/CLOX a la mitad de la CIM obtenida en cada caso. Partiendo de inóculos de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL se realizaron recuentos en placa con agar Mueller-Hinton a 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Aplicando el modelo de crecimiento de Gompertz a los datos de UFC/mL obtenidos, mediante el uso del programa Sigma Plot (Sigma Plot 12.0, 2011), se calcularon las velocidades específicas de crecimiento (μ), el tiempo de latencia (TL) y la máxima densidad poblacional (MDP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las CIMs y las CMBs para CLOX, para el AE de *M. armillaris*, y para las combinaciones en caldo pH 7.4, 6.5 y 5 frente a las cepas en estudio se presentan en la Tabla 1, donde también se incluyen los CFI para la mejor combinación CLOX/AE de *M. armillaris*. Se puede observar la existencia de efecto sinérgico *in vitro*, presentándose las veces que disminuye la CIM de CLOX cuando está asociada al AE, incluso frente a cepas con sensibilidad disminuida. Se evidencia un efecto sinérgico entre el AE y la CLOX. Si bien en varias de las combinaciones, el valor CFI establece un sinergismo parcial, se destaca que aunque no disminuya en gran medida la CIM del AE, si lo hace la correspondiente a CLOX en la mezcla. Por ejemplo, para la cepa 60 (sensibilidad disminuida) la CIM disminuye 32 veces al combinarse con 2.5% v/v de AE. En la Tabla 2 se puede ver claramente como la μ disminuye en presencia del antimicrobiano respecto del control. El TL también se ve afectado tanto por la presencia de CLOX como de AE, resultando en un mayor tiempo requerido para alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Lo mismo ocurre para la MDP alcanzada. En cuanto a las combinaciones se observa una gran reducción en los 3 parámetros (μ , TL, MDP), lo que indica la existencia de sinergismo AE-CLOX, donde la velocidad de crecimiento bacteriano y la cantidad final de bacterias disminuye notablemente y el tiempo en que se mantienen en estado de latencia se incrementa.

Tabla 1. Índices de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI) obtenidos para la combinación AE/CLOX en diferentes condiciones de pH.

Cepa	pH 7,4				pH 6,5				pH 5			
	CIM AE % ¹	CIM CLOX µg/mL	CIM AE/CLOX	CFI	CIM AE % ¹	CIM CLOX µg/mL	CIM AE/CLOX	CFI	CIM AE % ¹	CIM CLOX µg/mL	CIM AE/CLOX	CFI
ATCC	2.5	0.125	2.5/0.03	0.75	2.5	0.062	0.62/0.007	0.36	1.25	0.031	0.31/0.0035	0.36
13	1.25	0.5	0.62/0.125	0.75	1.25	0.125	1.25/0.015	1.12	0.625	0.031	0.31/0.0035	0.61
139	1.25	0.5	0.62/0.062	0.62	1.25	0.125	1.25/0.062	1.05	0.625	0.0625	0.62/0.0016	0.53
96	1.25	0.5	0.62/0.062	0.62	1.25	0.062	1.25/0.015	1.24	0.625	0.031	0.31/0.0035	0.61
60	5	64	2.5/2	0.53	5	64	2.5/2	0.56	1.25	2	1.25/0.25	1.13
67	1.25	8	0.62/2	0.75	1.25	2	0.62/0.125	0.56	S/C	S/C	S/C	--

CIM= Concentración Inhibitoria Mínima; ¹v/v; S/C = sin crecimiento; Cepas N° 13, 139 y 96 sensibles; Cepas N° 60 y 67 con sensibilidad disminuida a oxacilina.

Tabla 2. Valores de µ (Log UFC/mL·h), TL (h) y MDP (LOG (UFC/mL)) para *S. aureus* ATCC 29213 en ausencia de antimicrobianos (control), y en presencia de CLOX, AE y combinación AE/CLOX a 0.5xCIM a pH 7.4.

	control	CLOX 0.5xCIM 0.062 µg/mL	AE 0.5xCIM 1.25% v/v	AE-CLOX 0.5xCIM 1.25% v/v-0.015 µg/mL
µ	0.87	0.70	0.72	0.21
TL	2.29	4.68	9.96	3.40
MDP	12.20	11.80	8.66	6.68

CONCLUSIONES

Combinando AE de *M. armillaris* con cloxacilina se puede inferir una alta probabilidad de eficacia clínica, independiente del patrón de susceptibilidad del microorganismo, aún frente a cepas con sensibilidad disminuida a este antibiótico. El sinergismo observado se mantiene a diferentes valores de pH. Este hallazgo se transforma en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes como la mastitis subclínica bovina.

BIBLIOGRAFÍA

- Amri, I., E. Mancini, L. De Martino, A. Marandino, L. Hamrouni, H. Mohsen and V. De Feo. 2012. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from Three *Melaleuca* Species Grown in Tunisia Int. J. Mol. Sci. 13: 16580-16591.
- CLSI. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute.
- Grzybowska W., M. Banaszczyk-Ru, A. Wójcik and S. Tyski. 2004. Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. Med. Dosw. Mikrobiol. 56(4):391-403.