

Cloxacilina y aceite esencial de *Melaleuca armillaris* en combinación sinérgica frente a *Staphylococcus aureus*

Buldain D^{1,2}, Buchamer A¹, Marchetti L¹, Aliverti F¹, Borja C¹, Mestorino¹ N

¹Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos –LEFyT-, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (Calle 60 y 118 S/N) La Plata.

²CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina

dbuldain@fcv.unlp.edu.ar

La creciente antibiótico-resistencia insta a buscar nuevas alternativas terapéuticas. Cloxacilina (CLOX) es un antibiótico muy utilizado en medicina veterinaria frente a *Staphylococcus aureus*. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la combinación de CLOX y el aceite esencial (AE) de la planta *Melaleuca armillaris* como alternativa.

El AE se obtuvo por destilación de arrastre de vapor. Se trabajó con 3 cepas salvajes de *S. aureus*, aisladas de vacas Holstein mastíticas, y la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de CLOX y AE en combinación, se determinó por microdilución en caldo a pH 7.4; pH 6.5 y pH 5. Mediante la técnica del tablero de damas se evaluó la interacción entre CLOX y AE, se calculó el Índice de Concentración Fraccionaria (ICF):

$$\frac{(A)}{(CIM)_a} + \frac{(B)}{(CIM)_b} = ICF \quad \frac{(A)}{(CIM)_a} + \frac{(B)}{(CIM)_b} = ICF$$

(A): CIM de CLOX en combinación con el AE; (B): CIM del AE en la mezcla con CLOX, (CIM)_a: CIM del antimicrobiano solo y (CIM)_b: CIM del AE solo. Se consideró sinergismo si $ICF \leq 0.5$; sinergismo parcial si $0.5 < ICF < 1$; indiferencia si $1 \leq ICF < 2$ y antagonismo cuando $ICF \geq 2$. A partir de aquellas combinaciones arrojaron los menores valores de ICF, se evaluó el índice de actividad antibacteriana (*E*), establecido como la diferencia entre los valores Log₁₀ del número de bacterias viables (UFC/mL) al inicio ($n_{t=0}$) y al final del ensayo ($n_{t=24}$) según: $E = n_{t=24} - n_{t=0}$. Para ello se prepararon mezclas de AE/CLOX (Control sin antimicrobianos; 0.5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla, respectivamente), se incubaron a 37°C y se realizó el recuento de colonias. Se consideró: a) Efecto bacteriostático: $E = 0$; b) Efecto bactericida: $E = -3$ y c) Efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$. Resultados en tablas 1-4.

Al combinar el AE con CLOX se logró disminuir la concentración del antibiótico necesaria para inhibir al *S. aureus*, incluso modificando el pH del medio. Esto se refleja también en la actividad bactericida logrando un efecto cercano a la erradicación virtual. Se obtuvieron resultados prometedores frente al tratamiento de infecciones estafilocócicas.

Tabla 1. Índices de concentración fraccionaria (ICF) obtenidos para la combinación aceite esencial/Cloxacilina (AE/CLOX) en diferentes condiciones de pH vs. CIMs individuales.

Cepa	pH 7.4				pH 6.5				pH 5			
	CIM AE μl/ml	CIM CLOX μg/ml	CIM AE/CLOX (μl/ml)/(μg/ml)	ΣICF	CIM AE μl/ml	CIM CLOX μg/ml	CIM AE/CLOX (μl/ml)/(μg/ml)	ΣICF	CIM AE μl/ml	CIM CLOX μg/ml	CIM AE/CLOX (μl/ml)/(μg/ml)	ΣICF
ATCC 29213	25	0.125	25/0.03	0.75	25	0.062	0.62/0.007	0.36	12.5	0.031	3.1/0.0035	0.36
13	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
139	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61
96	12.5	0.5	6.25/0.125	0.62	12.5	0.125	12.5/0.015	1.12	6.25	0.031	3.1/0.0035	0.61

Tabla 2. Índices de actividad bacteriana (E) con su Desvío Estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) y para *S. aureus* SALVAJES (n=3) a pH 7.4.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 7.4				<i>S. aureus</i> SALVAJES pH 7.4			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX (μg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (μg/ml)/(μl/ml)	E ± DE	CLOX (μg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (μg/ml)/(μl/ml)	E ± DE
0.5	0.062	6.50 ± 0.04	0.015/12.5	1.07 ± 0.06	0.25	6.69 ± 0.71	0.062/3.13	0.15 ± 0.07
1	0.125	1.34 ± 0.15	0.031/25	-1.25 ± 0.09	0.5	0.13 ± 0.30	0.125/6.25	-1.94 ± 0.10
2	0.25	-1.10 ± 0.12	0.062/50	-3.83 ± 0.06	1	-2.82 ± 0.08	0.25/12.5	-3.66 ± 0.13
4	0.5	-3.05 ± 0.08	0.125/100	-3.77 ± 0.09	2	-3.12 ± 0.21	0.5/25	-3.78 ± 0.14
8	1	-3.46 ± 0.14	0.25/200	-3.76 ± 0.08	4	-3.31 ± 0.39	1/50	-3.77 ± 0.15

Tabla 3. Índices de actividad bacteriana (E) con su Desvío Estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) y para *S. aureus* SALVAJES (n=3) a pH 6.5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 6.5				<i>S. aureus</i> SALVAJES pH 6.5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX (μg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (μg/ml)/(μl/ml)	E ± DE	CLOX (μg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (μg/ml)/(μl/ml)	E ± DE
0.5	0.031	1.96 ± 0.12	0.015/12.5	1.04 ± 0.04	0.062	2.67 ± 0.39	0.007/6.25	0.21 ± 0.14
1	0.062	0.34 ± 0.15	0.031/25	-2.94 ± 0.05	0.125	0.43 ± 0.05	0.015/12.5	-2.25 ± 0.28
2	0.125	-2.80 ± 0.12	0.062/50	-3.95 ± 0.09	0.25	-2.84 ± 0.16	0.031/25	-2.97 ± 0.09
4	0.25	-3.41 ± 0.04	0.125/100	-3.90 ± 0.10	0.5	-3.13 ± 0.23	0.062/50	-3.11 ± 0.06
8	0.5	-3.77 ± 0.05	0.25/200	-3.89 ± 0.07	1	-3.22 ± 0.03	0.125/100	-3.35 ± 0.24

Tabla 4. Índices de actividad bacteriana (E) con su Desvío Estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) y para *S. aureus* SALVAJES (n=3) a pH 5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 5				<i>S. aureus</i> SALVAJES pH 5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	E $\pm$ DE	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	E $\pm$ DE	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	E $\pm$ DE	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	E $\pm$ DE
0.5	0.015	4.02 $\pm$ 0.05	0.0016/6.25	-0.59 $\pm$ 0.07	0.015	3.13 $\pm$ 0.54	0.0015/3.1	-1.30 $\pm$ 0.31
1	0.031	1.35 $\pm$ 0.07	0.0035/12.5	-2.09 $\pm$ 0.05	0.031	0.92 $\pm$ 0.03	0.0035/6.25	-1.96 $\pm$ 0.12
2	0.062	-2.79 $\pm$ 0.04	0.007/25	-3.90 $\pm$ 0.07	0.062	-2.90 $\pm$ 0.03	0.007/12.5	-2.89 $\pm$ 0.05
4	0.125	-3.13 $\pm$ 0.16	0.015/50	-3.84 $\pm$ 0.08	0.125	-3.01 $\pm$ 0.13	0.015/25	-3.44 $\pm$ 0.23
8	0.25	-3.37 $\pm$ 0.12	0.031/100	-3.81 $\pm$ 0.05	0.25	-3.43 $\pm$ 0.44	0.031/50	-3.49 $\pm$ 0.17