

Atividade *in vitro* do danofloxacin e de sete drogas antimicrobianas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina

(Antimicrobial activity of danofloxacin and seven other drugs against *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis)

A.D. Cruz¹, G.C.M. Batista¹, J.R. Modolo², A.F. Gottschalk², C.A.M. Lopes^{1*}

¹Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP

Caixa Postal, 510 - CEP 18618-000 - Botucatu, SP

RESUMO

Duzentas estirpes mastitogênicas de *Staphylococcus aureus* foram submetidas à atividade antimicrobiana de oito drogas (danofloxacin, cefuroxime, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, imipenem, tetraciclina e oxacilina). O danofloxacin, antimicrobiano da família das 4-fluoroquinolonas, foi recém-lançado para uso exclusivo em veterinária. O estudo comparativo das drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica do disco (Bauer-Kirby) e da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) juntamente com a avaliação da concentração bactericida mínima (CBM). Os resultados demonstraram que as drogas mais eficientes foram: imipenem (100%), trimetoprim/sulfametoxazol (98,9%), cefuroxime (97,3%), tetraciclina (96,9%), danofloxacin (95,4%), cloranfenicol (93,9%), oxacilina (93,4%) e ciprofloxacina (91,1%), considerando-se somente os percentuais de linhagens sensíveis. Levando-se em conta também as linhagens moderadamente sensíveis, o danofloxacin foi considerado o terceiro antimicrobiano mais eficiente. O estudo da determinação da CIM e da CBM do danofloxacin caracterizou sua elevada eficiência antimicrobiana, tendo em vista a proximidade entre elas (CIM_{90%} = 0,18µg/ml - CBM_{90%} = 0,23µg/ml) e a relação CIM/CBM de 1:1 e 1:2 para a maioria das linhagens em estudo.

Palavras-Chave: Bovino, *Staphylococcus aureus*, mastite, danofloxacin

ABSTRACT

The antimicrobial activity of danofloxacin, a new 4-fluoroquinolone for exclusive use in Veterinary Medicine, was compared *in vitro* with other seven drugs against 200 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. By using the antimicrobial disk diffusion method (Bauer-Kirby), the results showed that the imipenem (100%), trimethoprim/sulfamethoxazole (98.9%), cefuroxime (97.3%) were the most effective drugs taking into consideration the percentuals of sensitiveness. However, considering the percentuals of the moderately sensitive strains, danofloxacin emerged as the third most active drug. The antimicrobial dilution susceptibility test used to study the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) of danofloxacin, characterized its significative antimicrobial activity by showing a close relationship between both concentrations (MIC_{90%} = 0.18µg/ml - MBC_{90%} = 0.23µg/ml), as well as a MIC/MBC ratio of 1:1 and 1:2 for most of tested strains.

Keywords: Bovine, *Staphylococcus aureus*, mastitis, danofloxacin

Recebido para publicação, após modificação, em 27 de fevereiro de 1998.

*Autor para correspondência

INTRODUÇÃO

O ácido nalidíxico e agentes antimicrobianos similares para tratamento de infecções bacterianas existem há mais de 20 anos (Fisher et al., 1989). O ácido nalidíxico foi o primeiro de uma nova classe de agentes antimicrobianos 1,8-naphthyridine, constituindo as quinolonas antigas tais como o ácido oxolínico, drogas ativas "*in vitro*" contra uma grande variedade de bacilos Gram-negativos (com a exceção da *Pseudomonas aeruginosa*), mas essencialmente inativas contra organismos Gram-positivos, (Piddock, 1993). Devido ao restrito espectro de ação das quinolonas ancestrais, as aplicações terapêuticas têm sido limitadas porque o uso clínico freqüentemente é acompanhado por rápida emergência de mutantes resistentes e ocorrência de numerosos efeitos colaterais gastrointestinais e dermatológicos, além de provocar algumas complicações no sistema nervoso central (Neer, 1988; McQuirk et al., 1989). Assim, esses problemas estimularam a investigação para o desenvolvimento de novos antimicrobianos quinolônicos onde vários novos agentes antimicrobianos 4-fluoroquinolônicos têm sido desenvolvidos, tais como: norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, dentre outros. O danofloxacin é a mais nova 4-fluoroquinolona, sendo lançada no mercado, para uso exclusivo em terapêutica veterinária (Giles et al., 1991).

O alvo primário das 4-fluoroquinolonas é a DNA girase. Essas drogas são especificamente inibidoras da subunidade A da DNA-girase, uma topoisomerase do tipo II, que é uma enzima procariótica essencial que cataliza o enovelamento do DNA cromossômial, sendo assim responsável pela correta configuração deste na célula bacteriana. Através do bloqueio dessa enzima, há o impedimento da replicação celular, interrupção das funções metabólicas e da multiplicação levando à rápida destruição da célula bacteriana (McQuirk et al., 1989; Searle, 1990; Giles et al., 1991; Doenças, 1991a,b). Ações secundárias envolvem aumento da ação dos fagócitos, diminuição da síntese de fatores microbianos de virulência e o impedimento da transferência por conjugação de plasmídeos multiresistentes entre células bacterianas. As quinolonas caracteristicamente destroem a bactéria rapidamente, em concentrações uma a quatro vezes superiores à concentração inibitória

mínima (CIM). A resistência bacteriana durante o tratamento é rara. Numerosos estudos investigaram o mecanismo responsável pela resistência ao ácido nalidíxico, ao ciprofloxacin e a outras novas quinolonas sendo identificados dois tipos: aqueles que envolvem DNA girase e aqueles que envolvem outros mecanismos (McQuirk et al., 1989).

O danofloxacin é um antimicrobiano do grupo das 4-fluoroquinolonas e é um novo composto sintético selecionado entre uma série de 6-fluoro-7-diazabicyclo-quinolonas substituídas. Mostra uma potente atividade "*in vitro*" contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, assim como contra micoplasmas, incluindo-se a maioria dos agentes patógenos envolvidos nas enfermidades respiratórias de aves e de bovinos. Essa 4-fluoroquinolona de terceira geração foi lançada comercialmente em 1991, prometendo revolucionar a antimicrobianoterapia veterinária, (Giles et al., 1991; Doenças, 1991a, b).

Seguindo a recente introdução das 4-fluoroquinolonas em medicina veterinária, é fácil constatar a quase completa ausência de informações sobre sua eficácia diante de patógenos importantes em mastite bovina. Assim, neste trabalho investiga-se a ação do danofloxacin, em relação a outros sete antimicrobianos, diante das estirpes mastitogênicas de *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Duzentas amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina, em rebanhos do Município de Botucatu – SP, foram identificadas por métodos bacteriológicos padronizados (Koneman et al., 1988) e testadas quanto à pureza por meio de cultura em caldo de cérebro e coração¹ e semeadura em ágar sangue².

A atividade "*in vitro*" do danofloxacin contra *Staphylococcus aureus* foi examinada pelo método da microdiluição em meio líquido (Performance, 1994). O antimicrobiano foi obtido sob a forma de pó puro, danofloxacin³.

¹ Merck

² Tryptic Soy Agar - Difco

³ Pfizer

Uma solução estoque do antimicrobiano foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e diluições seriadas entre 32 e 0,015ug/ml foram preparadas em 5ml de Caldo Mueller Hinton¹. As linhagens a serem testadas foram semeadas em Caldo Mueller Hinton para ativar o crescimento e em placas de ágar sangue para confirmar sua pureza. De cada placa foram retiradas 5 colônias, as quais foram inoculadas em Caldo Mueller Hinton para incubação a 37°C/4 horas em banho-maria. Todas as suspensões das culturas foram ajustadas para a fase logarítmica da curva de crescimento e até o padrão de sensibilidade ótica 0,5 da escala de MacFarland. De cada suspensão tomou-se 0,1ml para adição em tubo que continha 9,9ml de Caldo Mueller Hinton com concentrações ajustadas dos cátions divalentes Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. A concentração final de uma linhagem em cada orifício após o correspondente foi ajustada para 5×10^5 CFU/ml, sendo a semeadura realizada em microplaca com diluições seriadas da droga (32ug/ml - 0,015ug/ml) em meio de cultura. Após a semeadura, as microplacas foram cuidadosamente agitadas em "micromixer" para a homogeneização do inóculo e a seguir lacradas com papel aderente 3M e incubadas a 37°C/14 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi interpretada como a menor concentração do antimicrobiano que resulta em nenhum crescimento após o período de incubação.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) procedeu-se com micropipeta semi-automática e bastão de vidro em L, a semeadura de placas de ágar sangue com o conteúdo de cada orifício (100µl) de onde observou-se inibição da estirpe bacteriana. A CBM foi caracterizada quando houve redução de 99,9% do número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) em comparação com o inóculo inicial.

O estudo da atividade antimicrobiana do danofloxacin em relação a outras sete drogas foi realizado pelo método do disco (Performance, 1994). Os antimicrobianos obtidos sob a forma de discos impregnados tiveram as seguintes

procedências: cefuroxime 30µg (Oxoid), ciprofloxacina 5µg (Cefar), cloranfenicol 30µg (Cefar), danofloxacin 5µg (Difco), imipenem 10µg (BBL), tetraciclina 30 µg (Cefar), trimetoprim 1,25µg + sulfametoxazol 23,75µg e oxacilina 1µg (Cefar).

RESULTADOS

Os resultados da eficácia "*in vitro*" do danofloxacin com base nas determinações da concentração inibitória mínima e bactericida mínima acham-se expostos na Tab. 1. Sua análise demonstra uma efetiva atividade do antimicrobiano através da observação de estreitos limites entre a CIM_{90%} e a CMB_{90%}. Adicionalmente, constata-se também que a maioria das amostras apresentou um índice de correlação CMB/CIM de 1:1 e 2:1.

Em consideração à análise da atividade antimicrobiana da danofloxacin em relação às outras sete drogas através do método de difusão em ágar da droga impregnada em disco (Tab. 2), observou-se que embora praticamente todos os antimicrobianos demonstrassem uma efetiva e equivalente atividade diante das estirpes, as mais eficazes foram em seqüência, o Imipenem com 100% de amostras sensíveis, vindo a seguir o trimetoprim/sulfametoxazol (98,9%) e o cefuroxime (97,30%). No conjunto, as drogas com menor eficácia foram o ciprofloxacina (91,1%), a oxacilina (93,4%), o cloranfenicol (93,9%) e o danofloxacin (95,41%), levando-se em consideração, exclusivamente, os percentuais específicos para amostras sensíveis. Contudo, avaliando-se como critério interpretativo também os percentuais de amostras moderadamente sensíveis, o danofloxacin emergiu como a terceira droga mais eficaz em relação ao contexto de antimicrobianos testados. A oxacilina, antibiótico beta lactâmico considerado como padrão de referência para avaliação de outras drogas do mesmo grupo demonstrou uma atividade antimicrobiana similar aos das demais drogas, por meio do percentual de 93,4% de linhagens sensíveis à droga.

¹ Difco

Tabela 1. Estudo "in vitro" da suscetibilidade de 200 linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina, diante do danofloxacin

µg/ml		Nº (%) de linhagens com respectivo índice CBM / CIM							
CIM _{90%}	CBM _{90%}	CIM _{90%} Variação	CBM _{90%} Variação	1:1	2:1	4:1	8:1	16:1	32:1
0,20	0,45	0,01-0,50	0,01-1	40(72,9)	8(14,5)	3(5,1)	2(3,6)	2(3,6)	0

Tabela 2. Sensibilidade *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina diante do danofloxacin e de sete outros antimicrobianos

Antimicrobiano	Halo de inibição (mm)		Padrão de sensibilidade nº (%) de linhagens	
	Variação	Média	S*	MS*
Cefuroxima	0-36	25,8	195 (97,3)	0
Ciprofloxacina	12-34	25,1	182 (91,1)	14 (6,8)
Cloranfenicol	0-48	24,4	188 (93,3)	6 (3,1)
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	0-44	27,7	198 (98,9)	0
Danofloxacin	10-34	27	191 (95,4)	5 (2,6)
Imipenem	24-56	46,7	200 (100)	0
Tetraciclina	0-54	27,1	194 (96,9)	1 (0,5)
Oxacilina	0-37	21,9	187 (93,4)	4 (2,0)

*S = Sensível

*MS = Moderadamente sensível

DISCUSSÃO

A dificuldade em discutir os presentes resultados com os de outros autores consiste no fato de que são extremamente escassas as informações específicas sobre a eficácia do danofloxacin sobre patógenos significativos na etiologia da mastite bovina. Não obstante, em recente publicação, Watts et al. (1997) verificaram que o premafloxacin, uma nova fluoroquinolona de amplo espectro de ação estudada comparativamente com o ciprofloxacina, enrofloxacin e danofloxacin, demonstrou uma atividade equivalente *in vitro* sobre bacilos Gram negativos e, mais ativa, sobre *Staphylococcus*, *Streptococcus* e anaeróbios, num total de 673 linhagens de importância em veterinária. Contudo, em relação a outras patologias, segundo alguns pesquisadores (McQuirk et al., 1989; Giles et al., 1991; Doenças, 1991 a, b), o danofloxacin possui amplo espectro de ação, mesmo contra patógenos que tenham adquirido resistência a outros antimicrobianos, características farmacocinéticas que garantem rápida distribuição e manutenção de concentrações terapêuticas em determinados sítios orgânicos (tecido pulmonar, plasma, mucosa bronquial e mucosa nasal) superiores às CIM, segurança de modo a satisfazer as exigências legais de proteção de espécies animais tratadas e consumidores. Os autores ainda

comentaram que o antimicrobiano é eficaz sobre cepas de *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Mycobacterium bovis* e patógenos respiratórios para bovinos.

Além dessas observações, Giles et al. (1991), ao trabalharem com patógenos respiratórios em bovinos, concluíram ser a droga altamente recomendada para a terapêutica dessas infecções, embora não haja, na literatura específica, informações sobre a utilização do danofloxacin no tratamento da mastite bovina.

No presente estudo, a análise da correlação CBM/CIM demonstrou que essas concentrações foram muito próximas. Por outro lado, pelo método de disco, o danofloxacin demonstrou ser a quinta droga mais eficiente (95,4%) e considerando-se o cômputo das linhagens sensíveis e moderadamente sensíveis, a terceira. O imipenem, outra droga recentemente introduzida em medicina veterinária, revelou-se como o mais eficaz antimicrobiano "in vitro", seguido pelo trimetoprim/sulfametoxazol. O ciprofloxacina foi a oitava droga mais eficiente e a oxacilina, droga de referência para avaliação da eficiência de outros beta lactâmicos, revelou atividade semelhante ao das demais drogas, fato que sugere que a pressão seletiva exercida sobre as linhagens de origem animal continua sendo baixa, quando comparadas com as de mesma espécie originárias de infecções humanas. Adicionalmente, para as demais drogas, o perfil de atividade antimicrobiana se assemelha aos dados obtidos por outros autores (Gedek, 1987; Lopes et al., 1990; Matthews et al., 1992; Ziv, 1992).

Contudo, um dos principais problemas na escolha de antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina tem sido a falta de dados farmacocinéticos sobre sua atividade *in vivo* na glândula mamária (Sandholm et al., 1990). Nesse aspecto, além da dificuldade na obtenção de dados bibliográficos sobre outras drogas, não se conhece, até o momento, as propriedades farmacocinéticas do danofloxacin para a

glândula mamária e, mais especificamente, dados de sua atividade antimicrobiana *in vitro* sobre patógenos caracterizados na etiologia da mastite bovina. Não obstante, os presentes resultados sugerem a indicação do antimicrobiano para o controle da mastite bovina, bem como a necessidade de mais estudos que esclareçam a real possibilidade de aplicação das 4-fluoroquinolonas a um espectro mais amplo de infecções significativas em medicina veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOENÇAS respiratórias em aves. [s.l.]: Laboratórios Pfizer/Divisão Agropecuária, 1991a. 18p. (Boletim Técnico).
- DOENÇAS respiratórias em bovinos. [s.l.]: Laboratórios Pfizer/Divisão Agropecuária, 1991b. 15p. (Boletim Técnico).
- FISHER, L.M., LAWRENCE, J.M., JOSTY, I.C. et al. Ciprofloxacin and the Fluoroquinolones- New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am.J.Med.*, v.87, p.2s-8s, 1989. Supplement 5A.
- GEDEK, W. Antibacterial effect of new quinolones and nalidixic acid against bovine mastitis pathogens. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, v.94, p.545-548, 1987.
- GILES, C.J., MAGONIGLE, R.A., GRIMSHAW, W.T.R. et al. Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, v.14, p. 400-410, 1991.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL JR, V.R. et al. *Diagnostic microbiology*. 3.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1988 841 p.
- LOPES, C.A.M., MORENO, G., CURI, P.R. Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcus aureus* isolated from animal and human sources in Brazil. *Br. Vet. J.*, v.146, p.50-56, 1990.
- MATTHEWS, K.R., OLIVER, S.P., JAYRAO, B.M. Susceptibility of staphylococci and streptococci isolated from bovine milk to antibiotics. *Agri-Practice* v.13, p.18-24, 1992.
- McQUIRK, P.R., JEFSON, M.R., SHRYOCK, T.R. et al. Synthesis and bacterial activity of danofloxacin (CP-76, 136): a new quinolone for veterinary medicine In: INTERSCIENCES CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY, 29, 1989, Houston. *Proceedings...* Houston: [s.n.], 1989. 303p.
- NEER, T.M. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobial drugs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.193, p.577-580, 1988.
- PERFORMANCE standard for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, proposed standard. *NCCLS Document M31-P*, v.14, p.1-45, 1994.
- PIDDOCK, L.J. Newer fluoroquinolones and Gram positive bacteria. *ASM News*, v.59, p.603-608, 1993.
- SANDHOLM, M., KAARTINEN, L., PYJORALA, S. Bovine mastitis. Why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* v.13, p.248-260, 1990.
- SEARLE, A. Fluoroquinolone. *Aust.Vet. Pract.*, v.20, p.172-173, 1990.
- WATTS, J.L., SALMON, S.A., SANCHEZ, M.S. et al. *In vitro* activity of Premafloxacina, a new extended-spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.1190-1192, 1997.
- ZIV, G. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet. Clin North Anim. Food Anim. Pract.*, v.8, p.1-15, 1992.