

Prueba *in vitro* de potencia de cefovecin luego de su conservación a distintas temperaturas

In vitro potency test of cefovecin after its conservation at different temperatures

DOXANDABARAT, XD¹; PAES RODRÍGUEZ, JD¹; ALBARELLOS, GA¹

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Farmacología

RESUMEN

El cefovecin es un antimicrobiano de espectro extendido de uso veterinario que pertenece a la tercera generación de cefalosporinas. Se expende como un liofilizado y la solución reconstituida tiene un vencimiento de 28 días conservado a 4 °C. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de modificaciones a lo largo del tiempo en la potencia antibacteriana del cefovecin reconstituido y almacenado de tres formas diferentes: 4 °C, -20 °C y -70 °C. Los tres primeros meses se comparó la potencia de cefovecin conservado a 4 °C, -20 °C y -70 °C, y entre los meses cuarto a duodécimo se comparó a -20 °C y -70 °C. La actividad antimicrobiana *in vitro* del antibiótico se evaluó mediante el método microbiológico de difusión en placa. Los parámetros evaluados (R₂, pendiente y ordenada al origen) no fueron estadísticamente diferentes (P>0,05) cuando se compararon para las distintas temperaturas de conservación a lo largo de todo el estudio. Se puede concluir que el cefovecin reconstituido no perdió su potencia antibiótica cuando fue sometido a congelación durante un período de 12 meses ni tampoco durante los 3 meses que se evaluó conservado en heladera.

Palabras clave: (betalactámico), (potencia), (conservación), (antibiótico), (cefalosporina).

SUMMARY

Cefovecin is a semisynthetic extended-spectrum antimicrobial for veterinary use that belongs to the third generation cephalosporins. It is sold as a lyophilized powder and, once it is reconstituted, the solution has a 28-day expiration conserved at 4 °C. The objective of the present work was to determine the presence of modifications over time in the antibacterial potency of the reconstituted and stored cefovecin in three different ways: 4 °C, -20 °C and -70 °C. The first three months after reconstitution, the potency of cefovecin was compared between the conserved dilutions at 4 °C, -20 °C and -70 °C; and, for the fourth to twelfth months after reconstitution, it was compared between conserved dilutions at -20 °C and -70 °C. The in vitro antimicrobial activity of the antibiotic was evaluated by plaque diffusion microbiological assay. The parameters evaluated (R2, slope and ordered at the origin) were not statistically different ($P > 0.05$) when they were compared for the different conservation temperatures throughout the entire study. It can be concluded that the reconstituted cefovecin did not lose its antibiotic potency when it was subjected to freezing neither during a period of 12 months nor during the 3 months that it was evaluated preserved in the refrigerator.

Key words: (beta-lactams), (potency), (conservation), (antibiotic), (cephalosporins).

INTRODUCCIÓN

El cefovecin es un antimicrobiano beta-lactámico de uso veterinario que pertenece a la tercera generación de cefalosporinas. Es un antibiótico semisintético con un espectro extendido.

Como otros β -lactámicos, interfiere con la síntesis de pared celular bacteriana uniéndose covalentemente a las proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), como la transpeptidasa y la carboxipeptidasa^{7, 8}. Tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas (estafilococos coagulasa positiva y negativa y estreptococos) y Gram-negativas (*Pasteurella multocida* y enterobacterias, incluyendo *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*)¹².

En caninos se lo indica para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus spp.* o *E. coli*; para infecciones del tracto urinario causadas por cepas susceptibles de *E. coli* y *Proteus mirabilis*; y como terapia adyuvante al tratamiento quirúrgico para infecciones gingivales y de tejidos periodontales causadas por *Porphyromonas spp.* y *Prevotella spp.*^{7, 8}.

En gatos, cefovecin se indica para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por cepas susceptibles de *P. multocida*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*,

Peptostreptococcus spp., y *Clostridium spp.*; y para infecciones de tracto urinario asociadas a *E. coli*^{7, 8}.

Cefovecin está formulado para la administración subcutánea como dosis única o bien, repetido con un intervalo de 14 días (cuando son necesarias antibioticoterapias más prolongadas, como por ejemplo, pioderma canina). Tiene una prolongada vida media (de 5,5 días en perros y de 6,9 días en gatos)^{10, 11} y difiere de otras cefalosporinas en que presenta una alta unión a proteínas plasmáticas (>99% en gatos y >98% en perros) lo que determinaría su bajo volumen de distribución, larga vida media y prolongada duración de acción⁷.

Cefovecin se expende como un liofilizado (800 mg de cefovecin en un vial de 10 ml) que una vez reconstituido (concentración de 80 mg/ml) debe almacenarse refrigerado (entre 2-8 °C) y protegido de la luz. La solución reconstituida tiene un vencimiento de 28 días, según indica el prospecto inserto en el envase del producto o de hasta 56 días⁶.

Cualquier método que permita una conservación por más tiempo del antibiótico reconstituido tendría consecuencias prácticas positivas al permitir una utilización fraccionada y prolongada del mismo. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de

modificaciones a lo largo del tiempo en la potencia antibacteriana del cefovecin luego de reconstituido y almacenado de tres formas diferentes: en heladera (4 °C) y congelado a -20 °C y a -70 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antimicrobiana *in vitro* del antibiótico, sometido a distintas condiciones de almacenamiento, se evaluó mediante el método microbiológico de difusión en placa² con modificaciones^{3,4}. Este método de determinación se basa en comparar la inhibición del crecimiento bacteriano, a través del diámetro de los halos de inhibición, que es producida por concentraciones conocidas del antibiótico que se está evaluando.

Se diluyó el liofilizado del antibiótico en agua destilada obteniendo una concentración final de 80 mg/ml y se lo fraccionó en alícuotas de 0,4 ml que se almacenaron en tubos cónicos Eppendorf de tres formas distintas (tratamientos):

-Tratamiento A: a 4-8 °C (durante 3 meses) como control de la actividad del antibiótico por el lapso de tiempo máximo y en las condiciones de conservación que indica el laboratorio productor (2 primeros meses); y, por un mes adicional.

-Tratamiento B: a -20 °C (durante 12 meses). Es la forma de conservación del antibiótico del que se deseaba evaluar la potencia *in vitro*.

-Tratamiento C: a -70 °C (durante 12 meses). Como control de la actividad del antibiótico en las condiciones recomendadas para la mayoría de las cefalosporinas^{1,5}.

Luego de reconstituido el preparado, se contrastaron los tres tratamientos mensualmente. Los tres primeros meses se compararon A, B y C, y entre los meses cuarto a duodécimo se compararon B y C.

Método microbiológico de determinación del antibiótico^{2,4}

Este método se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano y permite construir una curva de calibración relacionando el diámetro del halo de inhibición con la concentración del antibiótico.

Para decidir el microorganismo más adecuado para determinar la actividad antimicrobiana de cefovecin *in vitro* se probaron 2 bacterias estándares, *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031. Siendo seleccionada, según criterios de linealidad, exactitud y precisión, *E. coli* ATCC 25922⁹ (resultados no mostrados en el este trabajo).

Se realizó una prueba mensual donde a partir de una alícuota sometida a cada tratamiento se construyeron curvas estándares con las siguientes diluciones del antibiótico: 200, 100, 50, 10 y 5 µg/ml.

Las diluciones se sembraron por triplicado en placas de Petri de 15 cm de diámetro, estériles, con agar Müller-Hinton (28 ml/placa) inoculado con el microorganismo patrón (5 x 10⁵ ufc/ml). Luego de 18 horas de incubación a 34-35 °C se leyeron los halos de inhibición mediante un calibre digital.

Con los halos de inhibición de cada tratamiento se construyeron las correspondientes curvas del log concentración de cefovecin (ug/ml) / diámetro del halo de inhibición (mm).

Validación y análisis estadístico⁹

Para cada curva (de cada tratamiento y de cada ensayo mensual) se determinó la validez de la determinación según los siguientes criterios de validación: linealidad (R²), precisión (CV<15% para todas la diluciones y <20% para el límite de cuantificación o LLOQ) y exactitud (80-120% para todas las diluciones).

Para la comparación de la actividad antimicrobiana (potencia del antibiótico) entre los tres tratamientos para cada uno de los meses que duró el ensayo se contrastaron estadísticamente la pendiente, ordenada al origen cuando x=0 y valor de R². Se utilizó un test de ANOVA para las comparaciones de los tratamientos del primer, segundo y tercer mes (entre los tratamientos A, B y C) y un test de t para las comparaciones correspondientes del tercero al duodécimo mes (entre los tratamientos B y C). Se consideraron diferencias significativas si P<0,05.

Para cada ensayo (cada mes) se compararon estadísticamente (test de F, P<0,05) las curvas

obtenidas con cada tratamiento para establecer su equivalencia en cuanto a pendientes y ordenadas al origen.

RESULTADOS

Los resultados de los distintos criterios de validación (media±DE) de los tratamientos probados (4 °C, -20 °C y -70 °C) en los doce meses de estudio se muestran en la Tabla 1.

En la Figura 1 y 2 se muestran las curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de la concentración de cefovecin para cada tratamiento (A, B y C) al mes y al año de reconstituido, respectivamente.

Los parámetros evaluados (R^2 , pendiente y ordenada al origen) no fueron estadísticamente diferentes ($P>0,05$) cuando se compararon para las distintas temperaturas de conservación a lo largo de todo el estudio (12 meses).

En cada tiempo, las curvas de los diámetros de halos en función de la concentración fueron validadas, siendo la precisión (CV%) <3,90% en todos los casos y la exactitud entre el 80% y 120% (de 91,15% para el límite mínimo y de 114,68% para el máximo). En todos los ensa-

yos el LLOQ fue de 5 ug/ml. Las curvas, según sus pendientes y ordenadas al origen resultaron estadísticamente equivalentes ($P>0,05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las potencias calculadas fueron equivalentes tanto para la conservación en heladera hasta los 90 días (4 °C) como para el producto congelado hasta los 12 meses (a -20 °C o a -70 °C). Por esto, se puede concluir que el cefovecin reconstituido según las condiciones que indica el laboratorio productor no perdió su potencia antibiótica cuando fue sometido a congelación durante un período de 12 meses.

En cuanto a la conservación en heladera, durante los 3 meses que se evaluó, cefovecin tampoco modificó su potencia, sin embargo, su coloración cambió hacia un color pardo oscuro. Si bien se reporta que, la solución reconstituida conservada en heladera por 28 días puede cambiar su color a amarillento sin modificar su potencia (prospecto cefovecin).

En cuanto a la conservación congelado, la estabilidad de la potencia de cefovecin puede ser una gran ventaja en relación a su uso clínico,

Tabla 1: Promedio y desvío estándar de los R^2 , pendientes y ordenadas al origen de las curvas de los diámetros de halo en función de la concentración de cefovecin en las distintas temperaturas de conservación (4 °C, -20 °C y -70 °C) a lo largo del tiempo (12 meses).

Mes	R^2			Pendiente (media±DE)			Ordenada al origen (media±DE)		
	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C
1	0,987	0,995	0,987	7,24±0,23	6,84±0,13	6,98±0,22	6,67±0,34	7,59±0,19	7,21±0,32
2	0,992	0,995	0,995	6,79±0,17	6,86±0,14	7,26±0,14	7,71±0,29	7,71±0,23	6,98±0,24
3	0,996	0,993	0,968	7,92±0,14	7,48±0,17	8,03±0,40	8,69±0,24	9,14±0,28	8,47±0,67
4		0,984	0,972		9,13±0,32	8,49±0,40		5,16±0,53	5,88±0,66
5		0,992	0,997		7,14±0,17	7,03±0,13		9,12±0,29	9,08±0,21
6		0,992	0,991		7,56±0,19	7,66±0,20		7,94±0,32	7,95±0,34
8		0,958	0,969		6,82±0,41	7,96±0,45		9,17±0,70	6,19±0,78
10		0,989	0,939		7,36±0,21	8,17±0,58		6,99±0,35	4,25±0,95
12		0,978	0,988		7,46±0,31	7,10±0,31		6,43±0,51	7,30±0,35

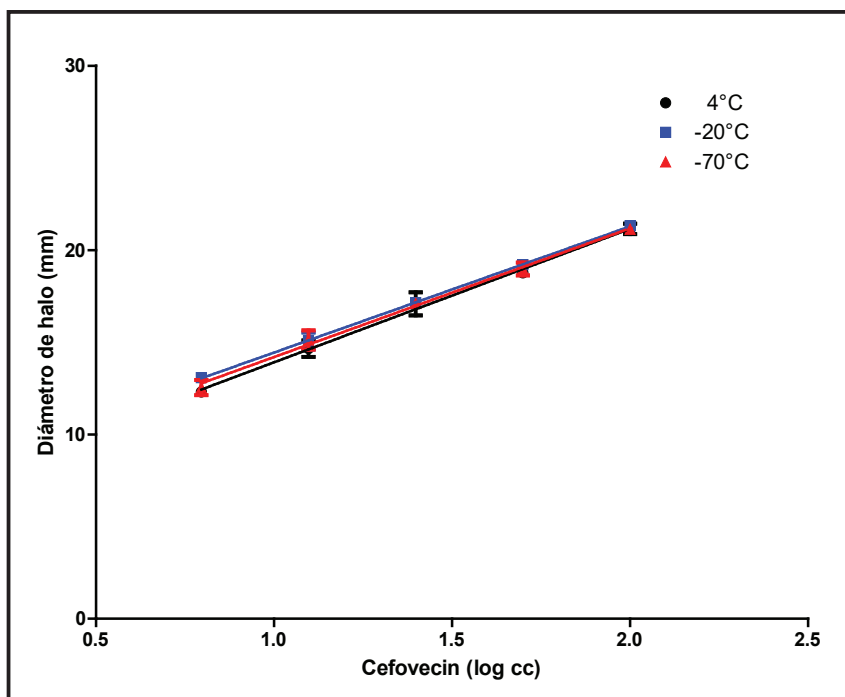


Figura 1. Curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de concentración de cefovecin para cada tratamiento (A= 4 °C, B= -20 °C y C= -70 °C) al mes de reconstituido.

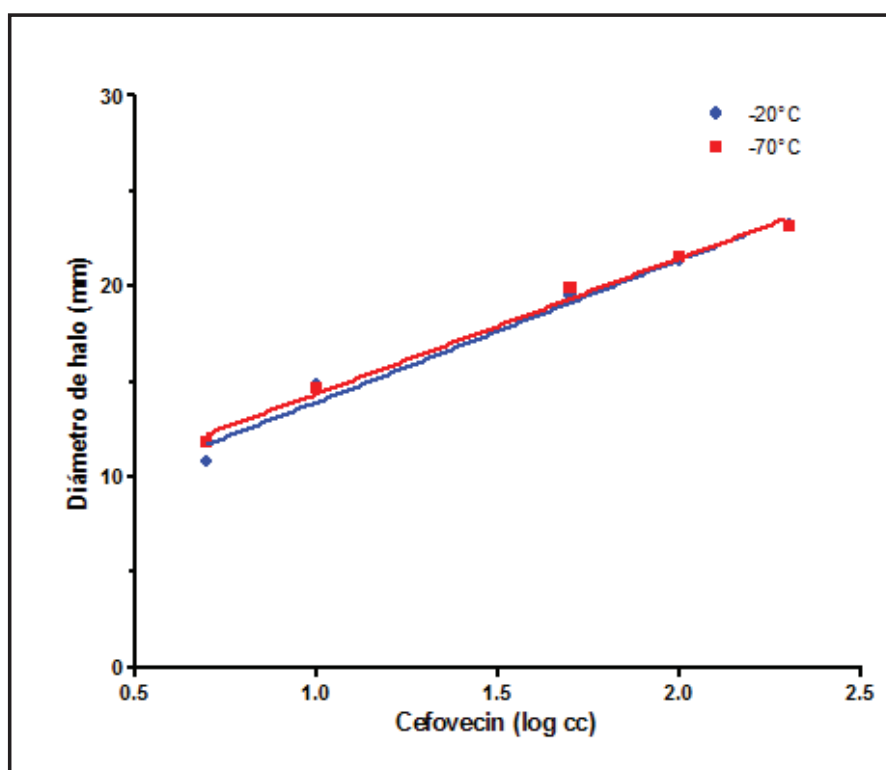


Figura 2. Curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de concentración de cefovecin para cada tratamiento (B= -20 °C y C= -70 °C) a los 12 meses de reconstituido.

porque permitiría su fraccionamiento en forma estéril en alícuotas de poco volumen (por ejemplo, en monodosis para utilizar en gatos o en perros pequeños), pudiendo conservarse de esta manera por hasta un año en un freezer doméstico. Sin embargo, hay que destacar que este estudio fue realizado *in vitro* y no incluyó la evaluación de la eficacia clínica del cefovecin luego de los distintos tratamientos. Esto se constituye en una limitación para la extensión de los resultados obtenidos, por lo que para recomendar la conservación de este antibiótico reconstituido y congelado (-20 °C), deben hacerse pruebas de eficacia clínica en animales con infecciones susceptibles.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto UBACYT 2018-2020, 20020170100574BA.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 (Suppl. S1):5-16.
- ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Valoración microbiológica de antibióticos. En Farmacopea Argentina, 7° Edición, Buenos Aires, Argentina, 2003:333-350.
- Arret, B.; Johnson, D.P.; Kirshbaum, A. Outline of details for microbiological assays of antibiotics: second revision. *J Pharm Sci.* 1971; 60:1689-1694.
- Bennet, J.V.; Brodie, J.L.; Benner, E.J.; Kirby, W.M.M. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Environ Microbiol.* 1966; 14(2):170-177.
- Okerman, L.; Van Hende, J.; De Zutter, L.. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Anal Chim Acta.* 2007; 586:284-288.
- Papich, M.G. Saunders Handbook of Veterinary Drugs. Small and large animal. 4th Edition. Elsevier. St. Louis, USA, 2016.
- Papich, M.G. β -Lactam antibiotics: Penicillins, cephalosporins, and related drugs. En Riviere, J.E.; Papich, M.G. Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 10th Edition. Wiley Blackwell. NJ, USA. 2018: 826-857.
- Prescott, J.F. Beta-lactam antibiotics: Cephalosporins. En Giguère, S.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 5th Edition. Wiley Blackwell, Ames, USA. 2013:153-173.
- Shah, V.P.; Midha, K.K.; Dighe, S. *Et al.* Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *J Pharmaceut Sc.* 1992; 81:309-312.
- Stegemann, M.R.; Sherington, J.; Blanchflower, S. (2006a) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29:501-511.
- Stegemann, M.R.; Sherington, J.; Coati, N.; Brown, S.A.; Blanchflower, S. (2006b). Pharmacokinetics of cefovecin in cats. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29:513-524.
- Stegemann, M.R.; Passmore, C.A.; Sherington, J. Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(7):2286-2292.