

VENTANA DE RESISTENCIA FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* TRAS EXPOSICIÓN A ENROFLOXACINA Y CIPROFLOXACINA

Soledad Aguirre, Carolina Lindt, Eliana Piani
Laboratorio de Farmacología y Toxicología - Facultad de Ciencias Veterinarias
Ciencias de la Salud - Veterinaria

INTRODUCCIÓN

Cuando una población bacteriana en fase de crecimiento es expuesta a concentraciones bactericidas de antibióticos, la velocidad de muerte bacteriana decrece rápidamente con el tiempo de exposición transcurrido y una fracción importante de la población inicial de bacterias sobrevive tras 24 h de exposición y pueden inclusive reiniciar su fase de crecimiento. La mayoría de los antibióticos son más eficaces cuando la población bacteriana se encuentra en fase de crecimiento logarítmico que cuando su crecimiento se halla detenido o en fase estacionaria.

Una población bacteriana puede ser homogénea en su genotipo pero heterogénea en su fisiología en lo que respecta a su metabolismo y/o velocidad de crecimiento. Subpoblaciones bacterianas con baja velocidad de crecimiento pueden llegar a ser refractarias a la actividad de los antibióticos, afectando negativamente la eficacia de estos, fenómeno se conoce como resistencia fenotípica (Wiuuff et al., 2005). Durante la exposición a un antibiótico, este ejercería presión de selección favoreciendo la sobrevivencia de bacterias fenotípicamente tolerantes. Sin embargo no disponemos de datos concretos acerca de las concentraciones de antibióticos y del tiempo de exposición antibiótica que favorecen la selección de subpoblaciones bacterianas fenotípicamente resistentes.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue determinar para *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante un ensayo de curva de muerte bacteriana (CMB) las concentraciones mixtas de enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) y el tiempo de exposición a estos antibióticos que favorecen la selección de subpoblaciones bacterianas fenotípicamente resistentes.

METODOLOGÍA

Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se estimaron previamente con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008), siendo de 0,0312 µg/ml para EFX y de 0,0156 µg/ml para CFX.

La CBM se realizó según el procedimiento descrito por García Rodríguez y col., (2001). Se utilizaron concentraciones mixtas de EFX y CFX con una relación (CFX/EFX) de aproximadamente 0,7, que es similar a la que se halla en plasma de un bovino luego de la administración parenteral de EFX a una dosis terapéutica de 5 mg/kg. Las concentraciones finales de EFX-CFX se expresaron como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico tal como se presentan en la tabla 1.

Proyecto n° 501 201101 00068 LI CAI+D 2011: "Actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*; influencia del pH, tamaño del inoculo y actividad antibacteriana intrínseca de suero de bovinos y búfalos"
Director del Proyecto y Director de los Autores: Dr. Enrique A. Formentini.

Tabla 1: Concentraciones mixtas de EFX-CFX donde la relación CFX/EFX es 0,7. La concentración de cada antibiótico se expresa en referencia a su valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX-CFX se expresan como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico.

Dilución	EFX ($\mu\text{g/ml}$)	EFX (x CIM)	CFX ($\mu\text{g/ml}$)	CFX (x CIM)	Suma (x CIM)
1	0,0025	0,09	0,002	0,12	0,21
2	0,005	0,18	0,004	0,25	0,42
3	0,011	0,35	0,008	0,49	0,84
4	0,022	0,70	0,015	0,98	1,68
5	0,044	1,40	0,031	1,96	3,37
6	0,088	2,80	0,061	3,93	6,73
7	0,175	5,61	0,123	7,85	13,46
8	0,35	11,22	0,245	15,71	29,92
9	0,70	22,44	0,49	31,41	53,85

Los recuentos de bacterias viables se realizaron a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h y éstos se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). El límite de detección de la técnica fue de 1 UFC/ml.

A partir de los datos experimentales de evolución de la población bacteriana en función del tiempo tras la exposición de diferentes concentraciones mixtas de EFX y CFX se realizaron los siguientes procedimientos.

- a- Determinación de la ventana delimitada por el intervalo de tiempo de exposición y el intervalo entre los valores de UFC/ml dentro de la cual se produce el quiebre de la cinética de eliminación bacteriana.
- b- Determinación del intervalo de valores de bacterias viables y del tiempo de exposición de EFX y CFX donde estos presentaron actividad bactericida concentración dependiente.
- c- Determinación del intervalo de valores de bacterias viables y del tiempo de exposición de EFX y CFX donde estos presentaron actividad dependiente del tiempo de exposición.
- d- Control de la morfología bacteriana mediante tinción de Gram a las 24 h en la curva de crecimiento control (sin antibiótico) y en todas las concentraciones mixtas de EFX y CFX expresadas como la sumatoria de CIM parciales de cada antibiótico.
- e- Control de la morfología bacteriana mediante tinción de Gram en todos los tiempos de muestreo en la curva de crecimiento control (sin antibiótico) y en los siguientes valores de la sumatoria de CIM parciales de cada antibiótico; 0,42 x CIM, 6,63 x CIM y 58,85 x CIM.

RESULTADOS

La inspección visual de la CMB permite observar que la cinética de eliminación bacteriana presenta dos fases bien definidas: Una primera fase bactericida rápida donde la velocidad de eliminación bacteriana es proporcional a la concentración de los antibióticos y una segunda fase bactericida lenta, donde la velocidad de eliminación bacteriana es similar e independiente de la concentración de los antibióticos. El área donde se produce el quiebre de la cinética bactericida está delimitado por: a)- el intervalo de tiempo comprendido entre la primera hora y las 5 horas de inicio del ensayo y b)- el intervalo de bacterias viables comprendido entre 17783 UFC/ml y 398 UFC/ml.

La actividad concentración dependiente de EFX y CFX se halla delimitada entre: a)- los tiempos 1 h y 3 h y b)- los valores de bacterias viables comprendidos entre 670670 UFC/ml y 2661 UFC/ml.

La actividad tiempo dependiente de EFX y CFX se halla delimitada entre: a)- los tiempos 3 h y 24 h y b)- los valores de bacterias viables comprendidos entre 2661 UFC/ml y el límite de cuantificación de la técnica (1 UFC/ml).

La CMB de *E. coli* ATCC 25922 expuesta a concentraciones mixtas de EFX y CFX y mostrando el detalle del área donde se produce el quiebre de la cinética bactericida y las áreas de actividad concentración y tiempo dependiente se presentan en la figura 1.

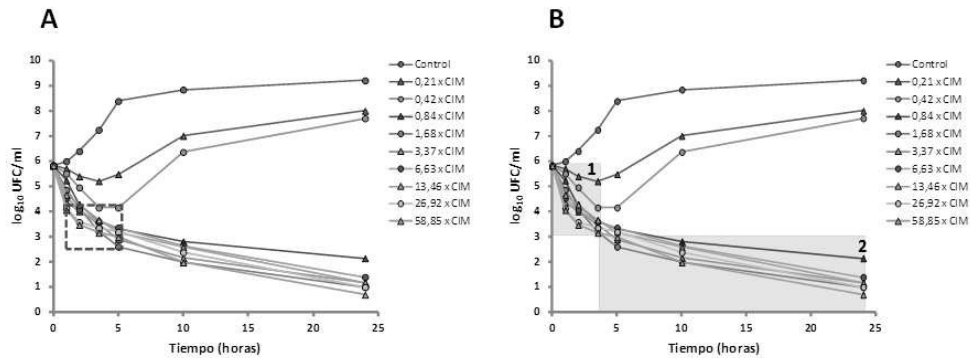


Figura 1. (A) Curva de muerte bacteriana de *E. coli* ATCC 25922 expuesta a concentraciones mixtas constantes de EFX y CFX. El recuadro con líneas de puntos representa el área teórica donde se produce el quiebre de la cinética de eliminación bacteriana. (B) En la misma gráfica el cuadrante superior izquierdo (1) delimita el área donde la cinética de eliminación bacteriana es concentración dependiente, y el cuadrante inferior derecho (2) delimita el área donde la cinética de eliminación bacteriana se torna dependiente del tiempo de exposición a los antibióticos

El control de la morfología bacteriana mostró que la exposición de *E. coli* ATCC 25922 a elevadas concentraciones mixtas de EFX y CFX dio lugar a que esta modificara su morfología bacilar a filamentosa (Figura 2).

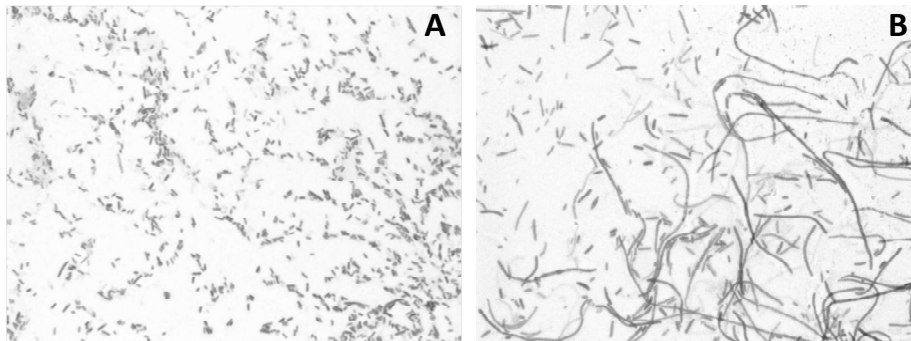


Figura 2. Morfología de *E. coli* ATCC 25922 (A) Morfología bacilar las 24 h en una curva de crecimiento control y (B) Morfología filamentosa sincitial tras la exposición a concentraciones mixtas de EFX (22,44 µg/ml) y CFX (31,41 µg/ml) equivalentes a una actividad de 53,85 x CIM.

Se observó que tras 24 h de exposición, *E. coli* ATCC 25922 presentó morfología filamentosa sincitial a partir de concentraciones mixtas de EFX y CFX equivalentes a 0,84 x CIM en adelante. También se observó que tras la exposición de concentraciones equivalentes a 6,63 x CIM y 58,85 x CIM, las formas filamentosas estuvieron presentes en todos los tiempos de muestreo. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Resultado del control de la morfología bacteriana de *E. coli* ATCC 25922 tras la exposición a concentraciones mixtas de EFX y CFX durante 24 h. El control de la morfología se realizó a las 24 h para el crecimiento control y para todas las concentraciones mixtas ensayadas. El control de la morfología se realizó en todos los tiempos de muestreo para el crecimiento control y para las concentraciones equivalentes a 0,42 x CIM, 6,73 x CIM y 58,85 x CIM.

	0h	1h	2h	3,5h	5h	10h	24h
Control	B	B	B	B	B	B	B
0,21 x CIM							B
0,42 x CIM	B	B	B	B	B	B	B
0,84 x CIM							B
1,68 x CIM							F
3,37 x CIM							F
6,73 x CIM	B	F	F	F	F	F	F
13,46 x CIM							F
29,92 x CIM							F
53,85 x CIM	B	F	F	F	F	F	F

B = morfología bacilar
F = morfología filamentosa

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten inferir que el quiebre de la cinética bactericida de concentración dependiente a tiempo dependiente de las concentraciones mixtas de EFX y CFX se debe a la selección de una subpoblación bacteriana con capacidad de modificar su morfología bacilar a filamentosa sincitial. La morfología filamentosa ha sido descrita como una forma de resistencia no heredable y reversible que se manifiesta ante condiciones adversas del medio ambiente. Una de las características de esta morfología es la detención o el enlentecimiento del crecimiento bacteriano. Esta modificación de la fisiología bacteriana sería responsable de una menor velocidad de replicación del genoma y limitará la actividad de EFX y CFX que actúan inhibiendo la replicación de este.

En vista de estos resultados proponemos que el área teórica donde se produce el quiebre de la cinética bactericida delimitada por dos dimensiones a)- el intervalo de tiempo comprendido entre la primera hora y las 5 horas de inicio del ensayo y b)- el intervalo de bacterias viables comprendido entre 17783 UFC/ml y 398 UFC/ml constituye un indicador de la cinética de la actividad bactericida de un antibiótico al que denominamos "*ventana de selección de resistencia fenotípica*". Esta ventana identifica ella el área bidimensional teórica donde hay mayor probabilidad de que ocurra la selección de subpoblaciones fenotípicamente resistentes capaces de modificar la velocidad de la actividad antibacteriana de EFX y CFX.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute.**, 2008. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline, vol. 28, third ed. Document M37-A3. Wayne, Pennsylvania, USA.
- 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.
- Wiuuff C., Zappala R.M., Regoes R.R., Garner K.N., Baquero F. & Levin.**, 2005. Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr., 1483-1494.