

DESARROLLO DE UN MÉTODO COLORIMÉTRICO EN MICROPLACA PARA DETERMINAR LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*

STIEFEL, S.¹; GUMIY, D.¹; CANALIS, M.¹; SIROSKI, P.²;
PICCO, E.¹; ORTEGA, H.² & FORMENTINI, E.¹

RESUMEN

La información generada por las curvas de crecimiento bacteriano se utiliza como referencia para evaluar la actividad antibiótica en ensayos de curvas de muerte bacteriana, pero estas pruebas son laboriosas y requieren mucho tiempo. En este estudio se reporta el desarrollo de un método para la construcción de curvas de crecimiento bacteriano en microplacas, basado en la reducción del cloruro de tetrazolio (XTT) por acción de bacterias metabólicamente activas a formazán, un derivado coloreado y soluble en agua. Este compuesto se cuantifica por colorimetría, permitiendo estimar el número de bacterias viables de modo más fácil y rápido que con el procedimiento de recuento de colonias en placa. El método desarrollado se validó y luego se utilizó para construir curvas de crecimiento de seis cepas de *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos indican que la técnica desarrollada es una herramienta confiable para ser utilizada en estudios de cinética de crecimiento bacteriano.

Palabras clave: Cloruro de tetrazolio, *Staphylococcus aureus*, cinética de crecimiento.

Abreviaturas

UFC: unidad formadora de colonia

STE: sistema de transporte de electrones

XTT: cloruro de tetrazolio

1.- Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. E-mail: eforment@fcv.unl.edu.ar

2.- Departamento de Ciencias Morfológicas. FCV (UNL)

Manuscrito recibido el 5 de septiembre de 2013 y aceptado para su publicación el 6 de marzo de 2014.

SUMMARY

Development of a colorimetric method in microplate for determining growth kinetics of *Staphylococcus aureus*.

The information generated by bacterial growth curves is often used as reference information for the evaluation of the antibiotic activity in assays of time-kill assays, but these tests are laborious and time consuming. In this study we report the development of a method for constructing bacterial growth curves in microplates based on reduction of a tetrazolium salt (XTT) by metabolically active bacteria to a colored water-soluble formazan derivate. This compound can be quantified colorimetrically, allowing estimation of viable bacteria easily and faster than the classical method of serial dilution bacterial count plates. The developed method was validated and then used to construct growth curves of six bacterial strains of *Staphylococcus aureus*. The results obtained indicate that the technique developed is a reliable tool to be used in the study of the kinetics of bacterial growth.

Key words: Tetrazolium salt, *Staphylococcus aureus*, growth kinetic.

Abbreviations

CFU: colony forming unit

ETS: electron transport system

XTT: tetrazolium salt derivate

INTRODUCCIÓN

El estudio de la cinética de desarrollo o crecimiento bacteriano *in vitro* se basa en la evaluación de la evolución en el tiempo de una población bacteriana en condiciones estandarizadas y la información generada en estos estudios es útil en varios campos de investigación como microbiología, genética, biotecnología y farmacología. En esta última, la cinética de crecimiento bacteriano tiene aplicación en los ensayos *in vitro* de eficacia de antibióticos mediante ensayos de curvas de muerte bacteriana (Gloede *et al.*, 2009) en donde se evalúa el efecto *in vitro* de concentraciones constantes de fármacos antibacterianos sobre un número conocido de bacterias. En estos ensayos es necesario caracterizar el crecimiento bacteriano en ausencia de antibiótico, a fin de obtener información de referencia para comparar el número de bacterias viables que se obtuvie-

ron en ausencia (crecimiento) y en presencia de diferentes concentraciones del mismo (Firsov, 2012; Giacomino *et al.*, 2012a). Esta información permite analizar los resultados con modelos matemáticos para estimar la constante de velocidad de crecimiento bacteriano y de esa manera incorporar este parámetro a modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK-PD) para simular la actividad de los antibióticos en condiciones similares a las que se presentan en los focos infecciosos en un organismo viviente (Mueller *et al.*, 2004, Treyaprasert *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Giacomino *et al.*, 2012a).

Las curvas de crecimiento bacteriano en ausencia de antibiótico, también han sido utilizadas por nuestro grupo de trabajo para evaluar la actividad bactericida intrínseca de fluidos biológicos tales como suero y orina de canino sobre *E. coli* (Giacomino *et al.*, 2012a; Giacomino *et al.*, 2012b), suero bovino sobre *S. aureus* y *E. coli* (Giacomino

et al., 2011) y el sinergismo entre tulatromicina y la actividad fagocítica de leucocitos bovinos sobre *S. aureus* (Cerra *et al.*, 2011).

Existen muchos procedimientos para determinar el número de bacterias viables, pero en base a lo reportado en la literatura, el más utilizado es el método clásico basado en el recuento de unidades formadoras de colonia en placa (UFC/placa) (NCCLS, 1992).

En un ensayo *in vitro* de crecimiento bacteriano, el número de bacterias viables se incrementa en forma logarítmica en función del tiempo y la construcción de una curva de crecimiento bacteriano mediante el método clásico además de ser trabajoso demanda mucho tiempo. Por otra parte, el gran número de bacterias viables presentes en el medio de cultivo líquido, obliga a realizar diluciones seriadas del mismo para obtener una suspensión de microorganismos que origine un número de UFC/placa que pueda contarse fácilmente (Choi *et al.*, 1995).

En los últimos años se han propuesto metodologías para reemplazar al método clásico de recuento de UFC/placa por técnicas indirectas. Una de estas técnicas se basa en cuantificar la actividad metabólica de los microorganismos como una medida de la viabilidad bacteriana (McCluskey *et al.*, 2005; Amal *et al.*, 2007). En ese sentido, la respiración de las células procariotas es considerada como una medida confiable de la viabilidad microbiana (Bensaid *et al.*, 2000) y la magnitud de este proceso ha sido cuantificado empleando aceptores de electrones, los que miden de manera indirecta la actividad de los sistemas de transporte de electrones (STE) presentes en las bacterias (McCluskey *et al.*, 2005). Entre los compuestos utilizados para tal fin se encuentra el cloruro de tetrazolio (XTT), el cual cuando es reducido por los STE de las bacterias origina un producto de color naranja y muy soluble en agua llamado formazán. Dado que

este compuesto es el producto de la actividad metabólica de las bacterias, la cantidad formada es proporcional al número de bacterias viables (Grare *et al.*, 2008).

Se ha reportado una metodología para la construcción de curvas de crecimiento bacteriano mediante el método colorimétrico basado en la reducción de XTT a formazán por parte de cepas de *P. aeruginosa* (Tunney *et al.*, 2004; Moriarty *et al.*, 2005), sin embargo, la metodología reportada por estos autores es laboriosa habiendo excesiva manipulación del cultivo bacteriano (centrifugación, resuspensión, extravasaciones) que puede afectar la viabilidad de los microorganismos. Otra desventaja del método propuesto por estos autores es que utiliza grandes volúmenes de XTT activado y los procedimientos de extravasación del cultivo incrementan el riesgo de contaminación del inóculo, pudiendo generar información errónea respecto a la dinámica de la población bacteriana en estudio.

En este trabajo, reportamos el desarrollo de un método para la construcción de curvas de crecimiento bacteriano en microplacas, utilizando una técnica colorimétrica basada en la reducción de XTT a formazán por parte de los STE de las bacterias como indicador de viabilidad bacteriana, aplicando el mismo al estudio de la cinética de crecimiento *in vitro* de seis cepas de *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del método colorimétrico en placa para determinar viabilidad bacteriana

Las bacterias utilizadas en este estudio fueron seis cepas de *S. aureus*; la cepa ATCC 29213 se empleó como control y cinco cepas autóctonas identificadas como SA-5507, SA-

5476, SA-001, SA-007 y SA-008 fueron aisladas a partir de muestras de leche de vacas con signos clínicos de mastitis aguda en la zona rural de Esperanza, Departamento Las Colonias, Provincia de Santa Fe, Argentina.

El aislamiento y la caracterización fenotípica de las cepas se realizó de la siguiente manera: las muestras biológicas fueron sembradas en agar sangre ovina al 5%, y se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 a 48 hs. a fin de seleccionar en función de la morfología de la colonia y de la tinción de Gram a las cepas de *S. aureus*. A posteriori se efectuó la identificación fenotípica de las cepas de *S. aureus* basada en las pruebas de catalasa y coagulasa, la capacidad de hidrolizar manitol en agar manitol salado (Laboratorios Britania), la presencia de DNasa (ensayo de DNasa Agar, Difco) y pirrolidónilarilamida-sa (Pyr-A-ENT, Laboratorio Britania), y la producción de acetoina a partir de piruvato por la prueba de Voges-Proskauer. Luego de la identificación, las cepas fueron conservadas en caldo Mueller-Hinton con glicerol al 15% a -20° C hasta su uso posterior.

Todas las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.

Recta de calibrado entre número de bacterias viables y densidad óptica de formazán

Para calcular el número de bacterias viables se construyó por sextuplicado una recta de calibración a partir de una suspensión madre de la cepa ATCC 29213 con una concentración bacteriana equivalente a $1,5 \times 10^9$ UFC/ml. Con esta suspensión se realizaron diluciones 1:1 en caldo Muller-Hinton (MH, Britania, Buenos Aires, Argentina) hasta llegar a una concentración bacteriana de 1×10^5 UFC/ml. Con cada una de las diluciones

obtenidas se realizaron los procedimientos que se describen a continuación:

a- Determinación de la densidad óptica del formazán producido por las bacterias viables.

De cada una de las cinco diluciones de la suspensión de bacterias se tomaron alícuotas de 100 μ l que fueron colocadas en micro-placas de 96 pocillos por triplicado. Seguidamente alícuotas de 100 μ l de XTT activado (Cell Viability Assay Kit, Biotium, Inc. USA) fueron adicionadas a cada dilución bacteriana. La placa se incubó a $35 \pm 0,5$ °C durante 30 minutos, luego de lo cual esta se agitó suavemente para homogeneizar. La densidad óptica (DO) del formazán presente en las muestras fue leída en un lector de microplacas (Thermo Labsystems Multiskan RC) a una longitud de onda de 475 nm a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hs. El valor de DO obtenido fue expresado como el promedio de los valores observados en cada réplica.

b- Determinación de bacterias viables por método clásico

Paralelamente, de cada una de las diluciones de la suspensión de bacterias se tomó una alícuota de 100 μ l y se la diluyó en solución salina isotónica (NaCl 0,9%), a partir de la cual se tomó una muestra de 100 μ l que fue extendida sobre la superficie de una placa de agar Mueller Hinton (MH, Britania, Buenos Aires, Argentina) y posteriormente fue incubada a $35 \pm 0,5$ °C durante 20 hs., luego de lo cual se realizó el conteo de UFC/placa. Los valores de UFC/ml fueron estimados multiplicando el número de UFC/placa por el factor de corrección que derivó de la dilución seriada correspondiente a cada muestra en particular. Cada dilución fue analizada por triplicado y el número de bacterias viables de cada dilución fue expresado como el valor promedio de UFC/ml obtenido en cada réplica.

c- Recta de calibración entre los valores de UFC/ml y los valores de DO de formazán.

Los datos (UFC/ml y DO) fueron analizados mediante el test estadístico de regresión lineal simple, donde la variable independiente fueron las UFC/ml de cada dilución de bacterias cuantificadas por el método clásico y la variable dependiente fueron los valores de DO del formazán producido por las bacterias de las mismas diluciones.

Metodología de curva de crecimiento bacteriano por método colorimétrico.

Un inóculo de la cepa testigo de *S. aureus* (ATCC 29213) fue preparado a partir de colonias incubadas a $35 \pm 0,5$ °C en placas con agar MH.

A partir de una suspensión de bacterias con una concentración de 1×10^8 UFC/ml se realizaron diluciones seriadas en caldo MH hasta llegar a una concentración bacteriana de 1×10^5 UFC/ml. Para establecer la relación entre el número de bacterias viables determinadas por el método clásico y el método colorimétrico, se construyó una curva de crecimiento con cada método según el procedimiento que se detalla a continuación:

a- Curva de crecimiento por el método clásico de conteo de UFC en placa.

Una muestra de 2 ml de la suspensión bacteriana (1×10^5 UFC/ml) fue incubada a $35 \pm 0,5$ °C. Alícuotas de 100 μ l de la misma fueron tomadas por triplicado a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hs. Con cada una de las alícuotas se procedió al recuento del número de UFC/ml en cada tiempo de muestreo siguiendo el procedimiento descrito en la construcción de la recta de calibración. El valor de UFC/ml se expresó como el promedio de los valores obtenidos en las réplicas.

b- Curva de crecimiento por el método colorimétrico.

La curva de crecimiento se realizó con lecturas de DO de formazán a los siguientes tiempos; 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hs. A fin de evitar la acumulación de la reacción colorimétrica del formazán producido por un inóculo bacteriano durante 24 hs., se dispuso que la reacción colorimétrica de cada tiempo de muestreo se realizara en inóculos diferentes, para lo cual en una microplaca de 96 pocillos, se dispusieron por cada tiempo de muestreo y por duplicado alícuotas de 100 μ l de la suspensión bacteriana.

Para dar tiempo a que se produzca la reacción colorimétrica y que esta pudiese ser leída a los tiempos de muestreo preestablecidos, es que 100 μ l de XTT activado se adicionaron a las alícuotas de las suspensiones bacterianas 30 min antes del tiempo de muestreo correspondiente, con excepción de las muestras a tiempo cero, en las que el XTT activado se adicionó a tiempo cero. Inmediatamente a la adición de XTT activado, la microplaca se incubó a $35 \pm 0,5$ °C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se realizó la lectura de DO de formazán del tiempo de muestreo correspondiente y la placa volvió a colocarse en estufa a la misma temperatura hasta la siguiente lectura. El valor de DO de cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de los valores obtenidos en las réplicas.

La función matemática establecida entre las dos variables de la recta de calibración permitió mediante sustitución del valor de la variable dependiente (DO) observado en la muestra problema (curvas de crecimiento), obtener el valor correspondiente de UFC/ml presente en las mismas.

Aplicación del método en cinco cepas autóctonas de *Staphylococcus aureus*.

Para la construcción de las curvas de crecimiento de las cepas autóctonas de *S. aureus*, alícuotas de 100 µl de una suspensión de bacterias con una concentración equivalente a 1×10^5 UFC/ml de cada cepa se dispusieron por duplicado en una microplaca de 96 pocillos.

Cada cepa fue sembrada por duplicado en dos columnas de seis pocillos. En cada tiempo de muestreo se utilizaron 2 pocillos para estimar las UFC/ml a través de la lectura de la DO de formazán. Para cada cepa, 2 pocillos fueron utilizados como testigos.

En la primera fila (Testigo) se colocaron 200 µl de medio de cultivo (caldo MH) sin bacterias. Las siguientes filas correspondieron a los siguientes tiempos de muestreo; 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hs. En forma vertical se dis-

pusieron seis pares de columnas de pocillos, cada par de columnas correspondió a una cepa bacteriana y dentro de cada par, cada fila (A y B) correspondió a las repeticiones de la reacción colorimétrica.

Un esquema de la disposición de las alícuotas de las suspensiones bacterianas de cada cepa en una microplaca de 96 pocillos se presenta en la Fig. 1.

La metodología para la realización de la reacción colorimétrica y la lectura de la DO del formazán producido en cada tiempo de muestreo fue descrita anteriormente. El número de UFC/ml en cada tiempo de muestreo fue estimado según la metodología ya descrita. En cada curva de crecimiento, el número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de los valores obtenidos en las réplicas.

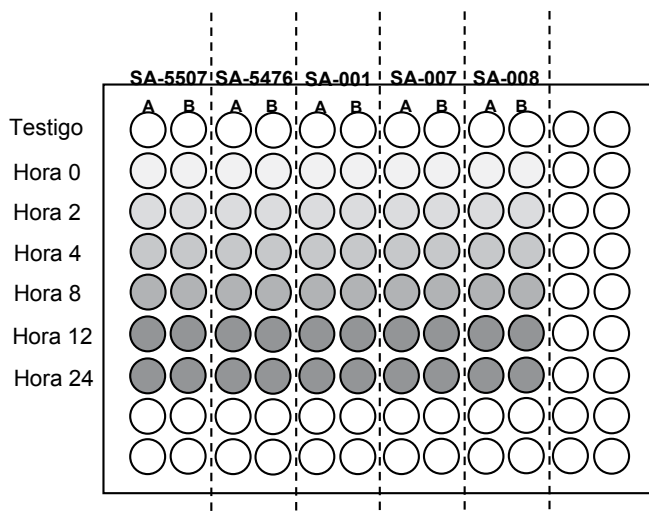


Fig. 1: Disposición de inóculos (100 µl) con una concentración bacteriana equivalente a 1×10^5 UFC/ml de cada una de las cinco cepas bacterianas autóctonas de *S. aureus* en una microplaca de 96 pocillos para determinación del número de bacterias viables con el método colorimétrico basado en la medición de la densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana de una sal de tetrazolio (XTT). En forma horizontal están indicadas las filas de pocillos correspondientes al testigo y los seis puntos de muestreo; 2, 4, 6, 8, 12 y 24 hs. En forma vertical separados por una línea de puntos se hallan cinco pares de columnas de pocillos; un par para cada cepa bacteriana. En cada uno de los pares, las repeticiones se identifican con las letras A y B.

Modelización de las curvas de crecimiento

Los valores de UFC/ml en función del tiempo de cada cepa bacteriana fueron ajustados con un modelo de proliferación celular (Jusko, 1971), donde la evolución en el tiempo de la población bacteriana en ausencia de antibióticos es descripta por la siguiente ecuación:

$$\frac{dB}{dt} = (k_c \cdot B) \cdot \left[1 - \left(\frac{B}{B_{ss}} \right) \right]$$

Ecuación 1

donde dB/dt es la derivada del número de bacterias viables sobre derivada del tiempo, k_c es la constante de crecimiento de primer orden aparente, B es el número de bacterias viables expresado como UFC/ml, y B_{ss} es el número de bacterias viables durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento. El primer término ($k_c \cdot B$) representa la fase de crecimiento exponencial de las bacterias, mientras que el segundo [$1 - (B/B_{ss})$] es un término de logístico que representa la disminución de la velocidad de crecimiento bacteriano antes de llegar a la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

El tiempo de generación bacteriana (t_g) fue estimado cómo:

$$= \frac{0,693}{k_c}$$

Ecuación 2

donde 0,693 es el logaritmo natural de 2 y k_c es la constante de primer orden aparente de crecimiento bacteriano. El modelo de crecimiento bacteriano fue construido con el programa informático ADAPT II (BMSR, University of Southern California, USA). Los parámetros fueron calculados directamente a partir de los perfiles de UFC/ml en función del tiempo mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados. El esquema de ponderación utilizado fue $1/x^2$.

RESULTADOS

La representación gráfica de la recta de calibración realizada entre los valores de UFC/ml de *S. aureus* (ATCC 29213) y la DO de formazán producido por reducción bacteriana de XTT se presenta en la Fig. 2A. En la Fig. 2B se presenta una gráfica semilogarítmica de la dispersión de residuales de los valores de UFC/ml observados respecto de los valores de UFC/ml estimados por el análisis de regresión lineal de la recta de calibración. Esta gráfica demuestra la correlación entre las variables estudiadas ($r = 0,9991$) y el correcto ajuste de los datos experimentales con un modelo de regresión lineal simple ($r^2 = 0,9982$). Un resumen de los parámetros de bondad de ajuste del análisis de regresión lineal simple se presenta en el Cuadro 1.

Las curvas de crecimiento en función del tiempo de un inóculo de *S. aureus* (ATCC 29213) construidas con el método colorimétrico y con el método de recuento de UFC/placa o método control presentaron similitud, la que puede ser observada en la Fig. 3.

Los valores de UFC/ml observados a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h en las curvas de crecimiento de las cinco cepas autóctonas de *S. aureus* construidas con el método colorimétrico se presentan en la Fig. 4. En las mismas se observa que la fase estacionaria de la curva de crecimiento se produce entre las 8 y las 12 horas y los valores de UFC/ml observados a las 24 hs. están incluidos en la fase de declinación o muerte bacteriana. En vista de este resultado, el ajuste mediante análisis de regresión no lineal de los datos experimentales se realizó desde el tiempo 0 hasta las 12 hs. inclusive.

El ajuste de los datos experimentales de cada cepa bacteriana se presenta en la Fig. 5 y los parámetros estimados se resumen en el Cuadro 2. Las cepas de *S. aureus* presen-

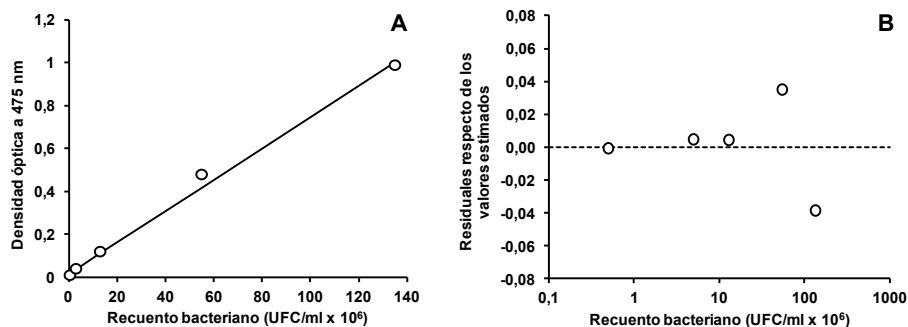


Fig. 2: (A) Recta de calibración construida entre valores de recuento bacteriano (UFC/ml) y de densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana (*S. aureus* ATCC 29213), de una sal de tetrazolio (XTT). Los datos experimentales (o) son promedios de determinaciones de densidad óptica por triplicado. (B) Gráfica semilogarítmica de la dispersión de residuales de los valores de UFC/ml observados respecto de los valores de UFC/ml estimados por el análisis de regresión lineal de la recta de calibración. Esta gráfica muestra la correlación ($r = 0,9991$) entre las variables estudiadas y el correcto ajuste de los datos experimentales con un modelo de regresión

Cuadro1: Parámetros de bondad de ajuste obtenidos del análisis de regresión lineal de la relación entre la densidad óptica a 475 nm de formazán y el recuento de bacterias viables de una cepa de *S. aureus* (ATCC 29313).

| Parámetros | Valor | Error | Limites inferior y superior del IC 95% | |
|--|-----------|-----------|--|----------|
| Pendiente | 8,039E-10 | 1,952E-11 | 7,418E-10 | 8,66E-10 |
| Y | 0,01552 | 0,01118 | -0,02007 | 0,0511 |
| X | -1.93E+07 | | | |
| Coeficiente de correlación (r) = 0,9991 | | | | |
| Coeficiente de determinación r^2 = 0,9982 | | | | |
| Desvío estándar de los residuales ($Sy.x$) = 0,01901 | | | | |
| Resultado del test de ANOVA = $p < 0,0001$ | | | | |

Y es el punto de intersección en el eje de las ordenadas, X es el punto de intersección en el eje de las abcisas e IC 95% es el intervalo de confianza al 95%.

taron un valor de k_c comprendido entre 0,96 h^{-1} y 1,42 h^{-1} y un valor de t_g comprendido entre 0,49 hs. (29,2 min) y 0,60 hs. (35,8 min), lo cual muestra la elevada velocidad de

crecimiento de la población bacteriana en las condiciones experimentales estandarizadas utilizadas en este ensayo.

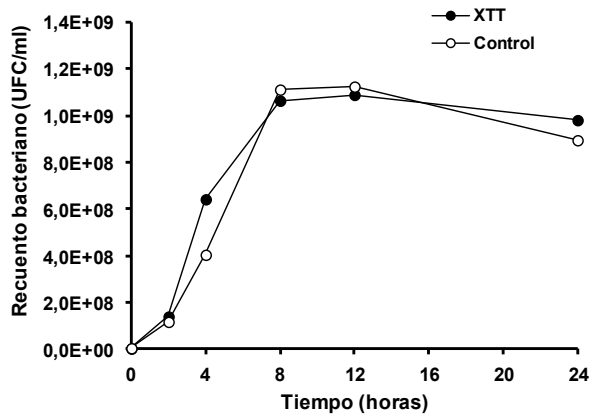


Fig. 3: Gráficas aritméticas de la evolución del recuento bacteriano (UFC/ml) en función del tiempo de un inóculo de *S. aureus* (ATCC 29213). Las curvas de crecimiento fueron construidas con el método colorimétrico basado en la medición de la densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana de una sal de tetrazolio (XTT) y con el método de recuento de UFC/placa o método control.

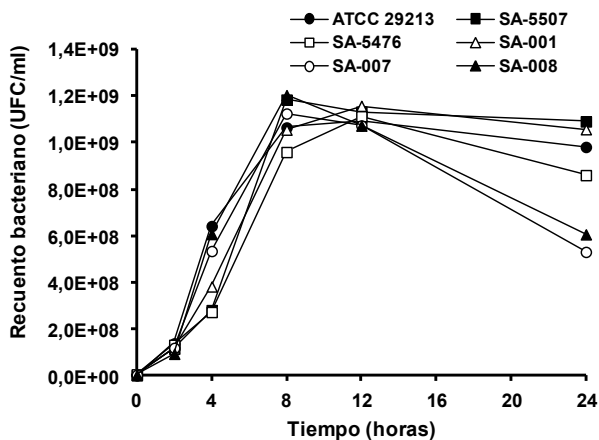


Fig. 4: Gráficas aritméticas de la evolución del recuento bacteriano (UFC/ml) en función del tiempo de seis cepas de *S. aureus*: ATCC 29213, SA-5507, SA-5476, SA-001, SA-004 y SA-005. Las curvas de crecimiento fueron construidas con el método colorimétrico basado en la medición de la densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana de una sal de tetrazolio (XTT).

DISCUSIÓN

La información generada por las curvas de crecimiento bacteriano permite evaluar la mayor o menor velocidad de desarrollo de los microorganismos de manera subjetiva, mediante la inspección visual de las gráficas de UFC/ml en función del tiempo o también estimando la evolución de la masa bacteriana en crecimiento mediante la integral de los valores de UFC/ml en función del tiempo.

La importancia de la dinámica de crecimiento bacteriano en los ensayos de eficacia antibiótica *in vitro* ha sido revalorizada en los últimos años, ya que éstas constituyen la información de referencia para cuantificar la eficacia de diversas concentraciones de antibióticos en base al porcentaje de bacterias eliminadas al final del ensayo (Firsov *et al.*, 2012).

El avance de los conocimientos en el área de la farmacodinamia de los antibióticos, ha conducido a evaluar el crecimiento bacteriano con un enfoque mecanicista, mediante la

construcción de modelos matemáticos que permiten resumir los datos de UFC/ml en función del tiempo en parámetros, los que integrados a modelos PK-PD permiten simular la actividad de los agentes antimicrobianos a diversas dosis e intervalos de administración.

Dentro de este contexto, tiene gran importancia la relación existente entre la velocidad de crecimiento bacteriano y la actividad antibiótica, ya que las bacterias que se encuentran durante su fase de crecimiento exponencial son susceptibles a la actividad de determinadas concentraciones de antibióticos, mientras que las mismas concentraciones son ineficaces en bacterias que no se encuentran en su fase de crecimiento (Tuomanen *et al.*, 1986), por lo que en la actualidad se asume que la actividad de muchos antibióticos es una función tanto de la concentración de los mismos en el sitio de localización de los microorganismos como de la velocidad de crecimiento de estos (Wiuff *et al.*, 2005).

Cuadro 2: Parámetros de crecimiento bacteriano estimados mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados, de los datos experimentales de conteo de bacterias viables en función del tiempo, de seis cepas de S. aureus: ATCC 29213, SA-5507, SA-5476, SA-001, SA-004 y SA-005. La estimación del número de bacterias viables se realizó por el método colorimétrico basado en la medición de la densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana de una sal de tetrazolio (XTT).

| Parámetros | Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | ATCC 29213 | SA-5507 | SA-5476 | SA-001 | SA-007 | SA-008 |
| k_c (h^{-1}) | 1,22 | 0,96 | 1,16 | 1,38 | 1,42 | 1,22 |
| t_g (h) | 0,57 | 0,72 | 0,60 | 0,50 | 0,49 | 0,57 |
| t_g (min) | 34,0 | 43,1 | 35,8 | 30,0 | 29,2 | 34,0 |
| N_{ss} (UFC/ml) | 1.158.621.751 | 1.112.675.467 | 1.156.834.289 | 1.087.152.301 | 1.153.347.353 | 1.158.621.751 |

k_c es la constante aparente de primer orden de crecimiento bacteriano, t_g es el tiempo de generación y N_{ss} es el número de bacterias viables expresadas como UFC/ml en la fase estacionaria de crecimiento.

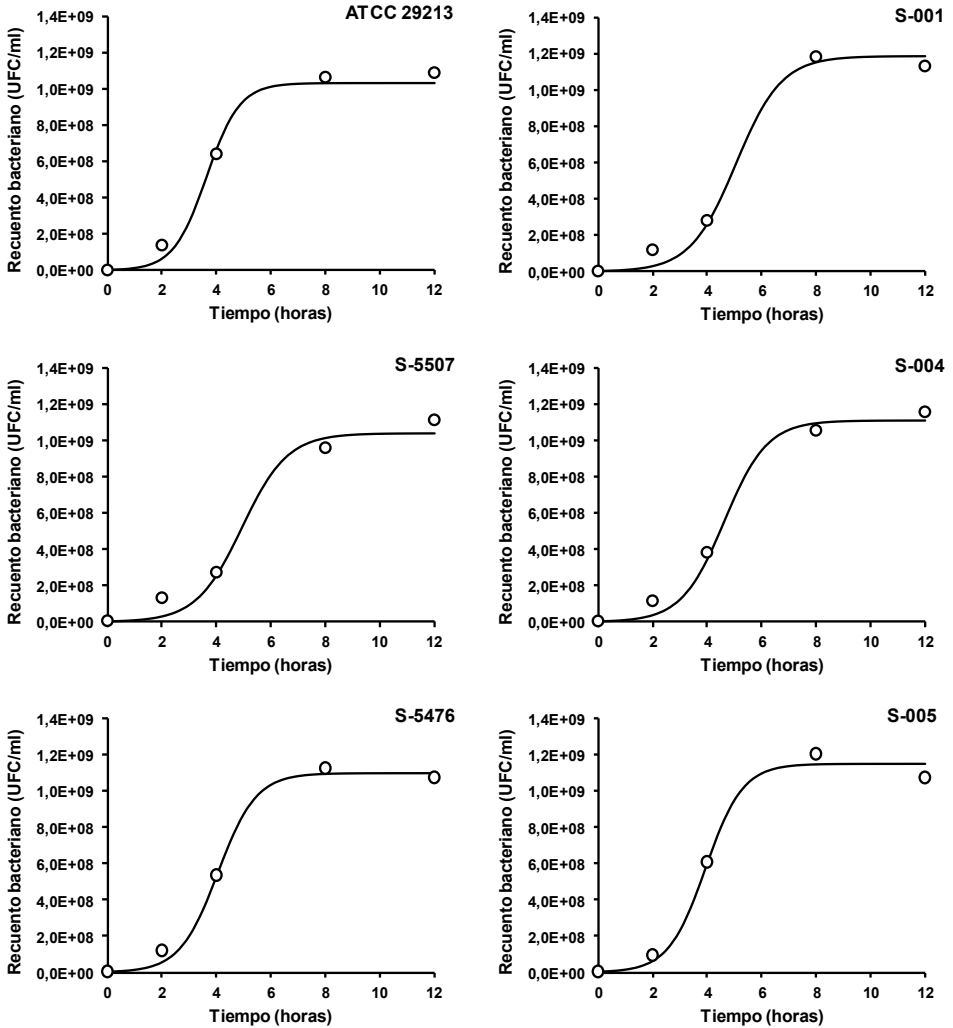


Fig. 5: Gráficas aritméticas de los datos experimentales observados () y estimados (-) de la evolución del recuento bacteriano (UFC/ml) en función del tiempo de seis cepas de *S. aureus*: ATCC 29213, SA-5507, SA-5476, SA-001, SA-004 y SA-005 construidas con el método colorimétrico basado en la medición de la densidad óptica a 475 nm de formazán producido por reducción bacteriana de una sal de tetrazolio (XTT). Los valores estimados fueron obtenidos por ajuste de los datos experimentales observados con un modelo de crecimiento bacteriano mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados.

La metodología para la construcción de curvas de crecimiento bacteriano mediante el método clásico es laborioso, y dado que el crecimiento de una población bacteriana es exponencial, los elevados valores de bacterias viables presentes en estos ensayos obligan a la realización de diluciones seriadas de las muestras del cultivo en crecimiento, a fin de reducir la concentración bacteriana de forma tal que la siembra en placa de una alícuota de la última dilución origine un número de UFC/placa que pueda ser fácilmente contado. Estos valores normalmente oscilan entre 30 y 300 UFC/placa, los que están sesgados por los posibles errores cometidos durante la realización de las diluciones.

Otra de las limitantes de este método es el tiempo que demanda, ya que las placas sembradas deben cultivarse en estufa durante 20 hs. para posteriormente realizar el conteo de UFC/placa.

En este último paso hay otro factor de error a tener en cuenta y es que este valor de UFC/placa debe ser convertido a concentración bacteriana en el medio de cultivo líquido y expresarse en UFC/ml, lo cual implica multiplicar el valor de las UFC/placa por un factor de corrección que se originó a partir de las diluciones seriadas del medio de cultivo, por lo que en muchos casos una UFC/placa se traduce en valores que fluctúan entre 1×10^6 y 9×10^6 UFC/ml.

El método colorimétrico basado en la reducción de XTT a formazán por los STE bacterianos propuesto por Tuney *et al.*, (2004) y Moriarty *et al.* (2005), presenta dos ventajas: la primera es la de evitar los errores humanos asociados a los procedimientos de dilución, siembra en placa y conteo de UFC/placa, y la segunda en acortar la duración del ensayo. Como desventajas hallamos que de un cultivo bacteriano se deben obtener a tiempos preestablecidos muestras de 1 ml, que necesitan ser centrifugadas a

8000 g durante 5 minutos para obtener un sedimento, sobre el cual, una vez retirado el sobrenadante adicionar 1 ml de la solución de XTT activado. Seguidamente la reacción colorimétrica se realiza incubando los microorganismos resuspendidos en XTT a 37°C durante 2 hs., para posteriormente retirar una alícuota, colocarla en un pocillo de una microplaca y realizar la lectura de la DO por espectrofotometría.

Este método presupone que el número de bacterias viables se mantiene invariable desde el momento de la obtención de la muestra hasta la lectura de la DO, al tiempo que no considera la posibilidad que los procedimientos de toma de muestra, centrifugado, resuspensión en la solución de XTT y la permanencia durante 2 hs. en estufa en ausencia de medio de cultivo, puedan afectar la viabilidad de los microorganismos reduciendo el número de bacterias viables final.

Por el contrario, el método desarrollado y reportado en este estudio, considera la incidencia de estos aspectos y minimiza la manipulación del cultivo bacteriano, realizando en cada tiempo de muestreo la reacción colorimétrica en diferentes alícuotas de 100 μ l de medio de cultivo, al tiempo que evita el error asociado al procedimiento de extravasación y el riesgo de contaminación de la muestra.

Otro aspecto que se consideró fue el tiempo en el cual se realizaron las lecturas, ya que para establecer la concordancia entre la DO de formazán y el conteo de UFC/ml en la recta de calibración, la adición de XTT activado a las alícuotas de medio de cultivo se realizó 30 min. antes del tiempo preestablecido para realizar la reacción colorimétrica y la lectura de la DO del formazán y al mismo tiempo tomar las muestras del medio de cultivo control para realizar los procedimientos de dilución, siembra en placa y posterior conteo de UFC/placa. De esta

manera el procedimiento desarrollado logra establecer una concordancia más exacta entre el número de bacterias viables y la DO del formazán producido por las mismas.

Los perfiles de UFC/ml en función del tiempo de las seis cepas de *S. aureus* utilizadas en este ensayo obtenidas con nuestro método muestran una gran similitud (Fig. 4) y la ausencia de valores aberrantes o erráticos permitió un fácil ajuste de los datos experimentales (Fig. 5) y la estimación de parámetros de crecimiento bacteriano robustos (Cuadro 2).

Estos resultados obtenidos permiten inferir que tanto el método clásico como el método colorimétrico en placa basado en la reducción de XTT a formazán desarrollado en este estudio, son confiables para la construcción de curvas de crecimiento bacteriano y la estimación de k_c .

AGRADECIMIENTOS

Este estudio pudo realizarse gracias al soporte económico proporcionado por la Universidad Nacional del Litoral, Argentina, en el marco de la convocatoria de proyectos CAI+D 2006 y la colaboración del personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- AMAL, G.; A. AL-BAKRI & AFIFI, F. 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods.* 68(1):19-25.
- BENSAID, A.; J. THIERIE & M. PENNING-KX. 2000. The use of tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimens. *J. Microbiol. Methods.* 40(3):255-63.
- CERRA, M.; A. FUCHS; S. STIEFEL; D. GUMIY; U. NOTARO; P. DÍAZ; E. BARONI; E. PICCO & E. FORMENTINI. 2011. Actividad *in vitro* de tulatromicina sobre cepas de *Staphylococcus aureus* en presencia de suero y leucocitos bovinos. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias.* 10(1), 57-72.
- CHOI, K; S. MAHERWARAN & C. CHOI. 1995. Colorimetric assay using XTT for assessing virulence of avian *Pasteurella multocida* strains. *Vet. Microb.* 45:191-200.
- FIRSOV, A.; D. GILBERT; K. GREER; Y. PORTNOY & S. ZINNER. 2012. Comparative pharmacodynamics and antimutant potentials of doripenem and imipenem with ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(3):1223-1228.
- GIACOMINO N.; M. CERRA; S. STIEFEL; D. GUMIY; U. NOTARO; E. BUFFA; E. BARONI E. & E. FORMENTINI. 2011. Actividad bactericida intrínseca de suero bovino sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias.* 10(2), 45-57.
- GIACOMINO, N.; M. CERRA; D. GUMIY; S. STIEFEL; U. NOTARO; E. BARONI, & E. FORMENTINI. 2012a. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial activity of cephalexin on *E. coli* in presence of canine serum. *Revue Méd. Vet.* 163(8-9):431-440.
- GIACOMINO N.; U. NOTARO; M. CERRA; D. GUMIY; S. STIEFEL; E. BARONI; E. PICCO & E. FORMENTINI. 2012b. Actividad antibacteriana *in vitro* de Cefalexina sobre *Escherichia coli* en suero y orina de canino. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias.* 11(1), 33-48.

- GLOEDE, J.; C. SCHEERANS; H. DEREN-DORF & C. KLOFT.** 2009. *In vitro* pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(2):186-201.
- GRARE, M.; S. FONTANAY; C. CORNIL; C. FINANCE & R. DUVAL.** 2008. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: why? Which salt to select? How? *J. Microbiol. Methods.* 75(1):156-159.
- JUSKO, W.** 1971. Pharmacodynamics of chemotherapeutic effects: dose-time-response relationships for non-specific agents. *J. Pharmacol. Science.* 60:892-895.
- McCLUSKEY, C.; J. QUINN & J. McGRATH.** 2005. An evaluation of activity of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganism. *Microb. Ecol.* 49:379-387.
- MUELLER, M.; A. DE LA PEÑA & H. DERENDORF.** 2004. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(2):369-77.
- MORIARTY, F.; S. ELBORN & M. TUNNEY.** 2005. Development of a rapid colorimetric time-kill assay for determining the *in vitro* activity of ceftazidime and tobramycin in combination against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods.* 61(2):171-179.
- LI, Y.; M. NGUYEN; S. CHENG; S. SCHMIDT; L. ZHONG; H. DEREN-DORF & C. CLANCY.** 2008. A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against *Candida* spp. *in vitro*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31(4):369-74.
- TREYAPRASERT, W.; S. SCHMIDT; K. RAND; U. SUVANAKOOT & H. DERENDORF.** 2007. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of *in vitro* activity of azithromycin against four different bacterial strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29(3):263-70.
- TUNNEY M.; G. RAMAGE; T. FIELD; T. MORIARTY & D. STOREY.** 2004. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(5):1879-81.
- TUOMANEN, E.; R. COZENS; W. TOSCH; O. ZAK & A. TOMASZ.** 1986. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* 132(5):1297-1304.
- WIUFF, C.; R. ZAPPALA; R. REGOES; K. GARNER; F. BAQUERO & B. LEVIN.** 2005. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(4):1483-94.