

PLEOMORFISMO DE *Escherichia coli* EN PRESENCIA DE ENROFLOXACINA Y CIPROFLOXACINA

Candela Presa Rossa, Ramirez Eliana

Laboratorio de Farmacología y Toxicología - Facultad de Ciencias Veterinarias
Ciencias de la Salud - Veterinaria

INTRODUCCIÓN

Enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) son antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) que son ampliamente usados en Medicina Veterinaria. Como todas las FQs presentan gran actividad sobre *E. coli*. Tras la administración parenteral de EFX a bovinos a una dosis de 5 mg/kg, esta es transformada parcialmente a CFX en hígado en glándula mamaria y en macrófagos. La máxima concentración observada de EFX en suero de bovino es de 0,60 µg/ml y la relación entre las concentraciones plasmáticas de CFX y EFX (CFX/EFX) es de aproximadamente 0,7.

La exposición bacteriana a elevadas concentraciones de antibióticos puede originar subpoblaciones bacterianas refractarias a la acción de estos, ya sea por selección de cepas resistentes (modificación del genoma) o por selección de cepas con menor velocidad de crecimiento lo que reduciría la actividad de los antibióticos, fenómeno que se conoce como resistencia fenotípica (Wiuff et al., 2005).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* cambios de sensibilidad antibiótica y cambios fenotípicos (morfología, velocidad de crecimiento), *Escherichia coli* ATCC 25922 luego de 24 h de exposición a una concentración mixta de EFX (0,7 µg/ml) y CFX (0,49 µg/ml) simulando las máximas concentraciones que se hallarían en plasma de un bovino luego de la administración parenteral de EFX a una dosis terapéutica de 5 mg/kg.

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.

De un cultivo *E. coli* ATCC 25922 no expuesto a los antibióticos se seleccionó una colonia que fue considerada como control. Paralelamente un inóculo de *E. coli* ATCC 25922 con una turbidez equivalente al valor de 0,5 de la escala McFarland fue expuesto a una concentración mixta de EFX (0,7 µg/ml) y CFX (0,49 µg/ml) e incubado a 35°C durante 24 h, realizándose recuentos de bacterias viables a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h, los que se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Mediante regresión lineal de los lnUFC/ml de la fase terminal de eliminación bacteriana se estimó la ordenada en el origen, la constante de eliminación bacteriana (k_{el}) y la correspondiente semivida de eliminación bacteriana ($t_{1/2el}$) estimada como $\ln 2/k_{el}$.

De la colonia control y de las colonias sobrevivientes a las 24 h se tomaron muestras con las que se realizaron tres procedimientos:

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 inóculo y actividad antibacteriana intrínseca de suero de bovinos y búfalos"
Director del Proyecto y Director de los Autores: Dr. Enrique A. Formentini.

El primer procedimiento consistió en confirmar la presencia de *E. coli* ATCC 25922 por inspección de la morfología bacteriana mediante tinción de Gram, determinación de la CIM y realización de pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias como crecimiento selectivo en medio E.M.B, crecimiento en medio SIM (determinar motilidad y prueba de indol +) y desarrollo en medio T.S.I. (determinar fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa y producción de gas).

El segundo procedimiento consistió en realizar curvas de crecimiento bacteriano (CCB) a partir de muestras procedentes de la colonia control y con tres colonias sobrevivientes a las 24 h. Las CCB se realizaron en caldo Muler Hinton según el procedimiento descrito por García Rodríguez y col., (2001). 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).

La magnitud de la masa bacteriana desarrollada en cada CCB se estimó por integración de los valores de UFC/ml en función del tiempo mediante el método trapezoidal y los valores de las integrales se expresaron como (UFC/ml).h.ml⁻¹.

El desarrollo de las poblaciones bacterianas se expresó como porcentaje de la masa bacteriana obtenida en las CCB de las bacterias previamente expuestas durante 24 h, tomando como referencia la integral de la CCB control.

El tercer procedimiento consistió en repicar esas colonias en placa de agar Muller Hinton, dejándolas crecer durante 24 h a 35°C y chequeando nuevamente su morfología mediante tinción de Gram.

RESULTADOS

Al inicio del ensayo el inoculo expuesto a EFX y CFX presentó un conteo bacteriano de 670.670 UFC/ml. La cinética de eliminación bacteriana fue bifásica; una primera fase bactericida rápida seguida de una segunda fase de eliminación bacteriana lenta. El valor de k_{ei} fue de 0,28 h⁻¹ con un valor de $t_{1/2ei}$ de 2,42 h. La ordenada en el origen (3646 UFC/ml) se interpretó como la subpoblación bacteriana (0,54% del conteo inicial) que dio origen a la fase terminal de eliminación.

A las 24 h de exposición, las bacterias sobrevivientes originaron 5 UFC/ml. Estas UFC presentaron menor tamaño que las observadas en las colonias de la cepa control. Las bacterias procedentes de las colonias sobrevivientes presentaron coloración Gram (-) y morfología filamentosa. Las pruebas bioquímicas (E.M.B agar, T.S.I agar y SIM medio) confirmaron que las formas filamentosas pertenecían a una subpoblación de *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 1).

Tabla 1. Resultado de las pruebas bioquímicas utilizadas para confirmar la presencia de *E. coli* ATCC 25922. Desarrollo en E.M.B. agar (Eosina y Azul de Metileno), SIM medio y T.S.I. agar (Triple Sugar Iron Agar).

	E.M.B. agar	SIM medio			T.S.I. agar	
	Colonias	Movilidad	Indol	SH ₂	S/P	Gas
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Negro azuladas con brillo metálico	+	+	-	A/A	+

S/P: reacción se superficie/profundidad; A/A: reacción ácida/ácida (amarillo).

Los valores de CIM de EFX y CFX de las bacterias que sobrevivieron a la exposición de EFX 0,7 µg/ml (22,44 x CIM) y CFX; 0,49 µg/ml (31,44 x CIM) durante 24 h (formas filamentosas) no presentaron diferencias respecto de los valores obtenidos en la cepa control (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado de los valores de CIM de EFX y CFX de *E. coli* ATCC 25922 (cepa control) y bacterias de la subpoblación que sobrevivió a la exposición de elevadas concentraciones mixtas de EFX y CFX durante 24 h.

Antibióticos	Ensayo	Control		Formas filamentosas
EFX	CIM	0,0312 µg/ml	Exposición a EFX y CFX durante 24 h	0,0312 µg/ml
CFX		0,0156 µg/ml		0,0156 µg/ml

Luego de repicar las colonias sobrevivientes (formas filamentosas) en placa de agar Muller Hinton, al cabo de 24 h las colonias volvieron a presentar su morfología y coloración típica de bacilo Gram (-) (Figura 1).

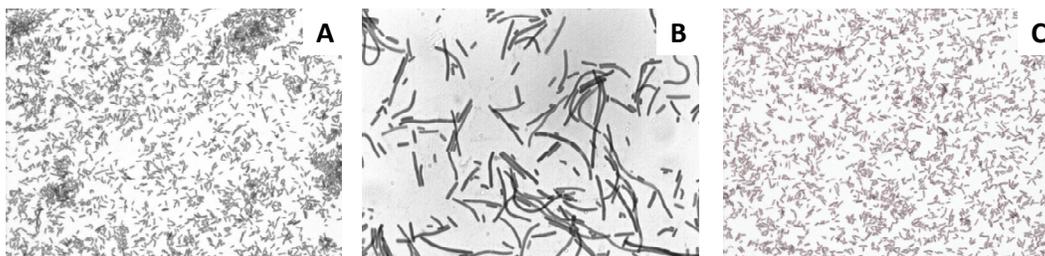


Figura 1. Comportamiento pleomórfico de *E. coli* ATCC 25922; (A) bacilos Gram (-) de la cepa control; (B) formas filamentosas Gram (-) luego de que la cepa control estuvo expuesta durante 24 h a concentraciones mixtas de EFX 0,7 µg/ml (22,44 x CIM) y CFX; 0,49 µg/ml (31,44 x CIM) y (C) Bacilos Gram (-) de la misma cepa observada en (B) luego de haberse repicado en placa de agar Muller Hinton y haberse incubado durante 24 h a 35°C.

Los resultados de las CCB realizadas con las bacterias sobrevivientes mostraron que tras 24 h de incubación la masa bacteriana de estas expresada como (UFC/ml).h.ml⁻¹ fue menor respecto del desarrollo bacteriano de la cepa control (Figura 2; Tabla 3).

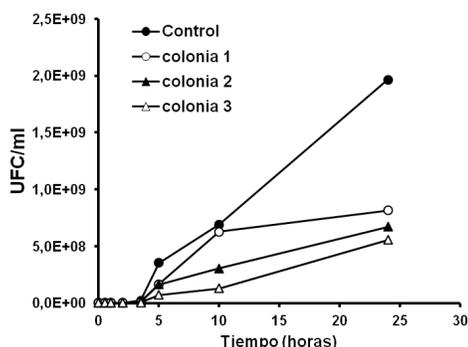


Figura 2. Curvas de crecimiento bacteriano de cuatro colonias *E. coli* ATCC 25922 en caldo Muller-Hinton; Control, colonia 1, colonia 2 y colonia 3.

Tabla 3. Desarrollo de masa bacteriana expresada como la integral de las UFC/ml en función de la diferencial del tiempo [(UFC/ml).h.ml⁻¹] mediante el método trapezoidal, en las CCB de la cepa control y de las bacterias sobrevivientes a las concentraciones mixtas de EFX y CFX. Los valores están expresados como porcentaje de desarrollo respecto del valor de la integral estimado para la cepa control.

Exposición a EFX y CFX	(UFC/ml).h.ml ⁻¹	Desarrollo (%)
No expuesta	21.499.180.528	100
Colonia 1	12.192.148.085	56,71
Colonia 2	8.135.989.648	37,84
Colonia 3	5.337.965.750	24,83

CONCLUSIONES

La cinética bifásica de eliminación bacteriana permite inferir un cambio en la actividad de los agentes antimicrobianos o en la sensibilidad de los microorganismos sobre los

que estos actúan. La fase de eliminación bacteriana lenta mostró una menor velocidad de muerte bacteriana, y a pesar de que actualmente se asume que la eficacia EFX y CFX es dependiente de sus concentraciones, los elevados niveles de estos antibióticos no fueron suficientes para eliminar las bacterias en su totalidad tras 24 h de exposición. No obstante haber sobrevivido a concentraciones de EFX 0,7 µg/ml (22,44 x CIM) y CFX; 0,49 µg/ml (31,44 x CIM) durante 24 h, estas bacterias no modificaron su sensibilidad antibiótica, lo que descarta la selección de alguna subpoblación resistente.

La inspección por microscopia de las células bacterianas, mostraron que tras 24 h de exposición antibiótica, los bacilos Gram (-) modificaron su morfología a filamentos sincitiales Gram (-) (Figura 1 B). Según la literatura, las formas bacterianas filamentosas se originan por disminución o detención de la fisión celular, aunque continúan creciendo (Claessen et al., 2014).

Este fenómeno de pleomorfismo de unicelularidad a multicelularidad es inducido *in vitro* e *in vivo* como una respuesta para sobrevivir a condiciones ambientales adversas como ser: presencia de concentraciones de antibióticos, reducción de nutrientes (stress nutricional) y presencia de predadores como otras bacterias y/o macrófagos (Claessen et al., 2014).

La morfología de filamentos sincitiales se revirtió a la forma bacilar una vez que las condiciones medioambientales volvieron a ser favorables (Figura 1 C).

La menor actividad de EFX y CFX que se expresó por una menor velocidad de muerte bacteriana puede ser explicada por la menor velocidad de crecimiento de estas bacterias (Tabla 3), ya que si consideramos que las FQs actúan impidiendo la replicación del DNA, entonces una detención o retraso en la velocidad de crecimiento bacteriano afectaría negativamente la actividad bactericida de estas, determinando una resistencia de tipo fenotípica.

Esta plasticidad morfológica que se produce por supresión de la división celular *in vitro* e *in vivo*, y que es una respuesta adaptativa para sobrevivir entre otras cosas a la actividad de los antibióticos. Esta situación podría ocurrir durante el tratamiento de una infección, sin embargo no es tenida en cuenta a la hora de diseñar regímenes posológicos. Los resultados generan algunos interrogantes respecto de la actividad *in vivo* de las FQs que abren nuevas líneas de investigación para el futuro: ¿Las formas filamentosas de *E. coli* son más resistentes a la acción del sistema inmune?; ¿La resistencia fenotípica de *E. coli* puede reducir la eficacia de un antimicrobiano?; ¿En ese caso, la resistencia fenotípica puede modificar la actividad de las FQs de concentración dependiente a tiempo dependiente?

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Claessen D., Rozen D.E., Kuipers O.P., Sogaard-Andersen L. & van Wezel G.P., 2014.** Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews, Microbiology*, 12, 115-124.
- 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.
- Wiuff 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.