

CONCENTRACIÓN PREVENTIVA DE MUTANTES: ¿NUEVO PARÁMETRO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA O NUEVO MITO?

Paula Patricelli, Antonella Dell'Elce

Laboratorio de Farmacología y Toxicología - Facultad de Ciencias Veterinarias UNL

Área: Ciencias de la salud

Sub-Área: Veterinaria

Grupo: X

Palabras clave: Concentración preventiva de mutantes, *Escherichia coli*, persistencia

INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden protegerse a sí mismas de varios tipos de estrés ambiental mediante la supresión de su crecimiento. Estas bacterias al permanecer biológicamente inactivas son transitoriamente refractarias a la actividad de los antibióticos y se las denomina persistentes (Wiuff et al., 2005). Enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) son antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) con modo de acción concentración dependiente y que son muy eficaces sobre *E. coli*. Los ensayos *in vitro* de sensibilidad antibiótica se realizan con inóculos de concentraciones bacterianas estandarizadas que fluctúan entre $0,5-1 \times 10^6$ unidades formadoras de colonia/mL (ufc/mL). Estas concentraciones muchas veces no son representativas de las presentes en el sitio de un foco infeccioso, como por ejemplo en el tracto urinario ($1,7 \times 10^7$), el tracto respiratorio (1×10^7 ufc/mL) o el sistema nervioso central (3×10^8 ufc/mL). En estas elevadas concentraciones bacterianas es posible hallar bacterias que habiendo mutado su genoma (2 en un billón) se han vuelto resistentes a los antibióticos. La concentración preventiva de mutantes (CPM) se ha instalado como un nuevo parámetro farmacodinámico que compite en interés clínico con la concentración inhibitoria mínima (CIM). Sin embargo, aunque se conoce el efecto inhibitor de la CPM sobre la emergencia de cepas resistentes, no se conoce que impacto esta tiene sobre las bacterias persistentes.

OBJETIVOS

Los objetivos fueron: (a) determinar los puntos de corte de eficacia antibacteriana en presencia de altas densidades bacterianas, (b) evaluar la actividad antibacteriana de EFX y CFX sobre un inóculo de una cepa autóctona de *E. coli* de densidad bacteriana elevada mediante ensayos *in vitro* de curvas de muerte bacteriana (CMB) y ensayos de CPM, (c) establecer la ventana de selección preventiva de mutantes (VSM) para EFX y CFX y (d) determinar la presencia de bacterias persistentes en ambos ensayos.

METODOLOGÍA

Se utilizó una cepa autóctona de *E. coli* 09-684 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). La CIM de EFX y CFX se estimó con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008). Las CMB se realizaron en caldo Muller Hinton con inóculos de concentraciones bacterianas equivalentes a $6,7 \times 10^8$ ufc/ml y $3,6 \times 10^8$ UFC/ml, los que fueron expuestos durante 24 h a concentraciones equivalentes a 0, 1, 2, 4, 8 y 32 x CIM de EFX y CFX respectivamente. La eficacia se evaluó con tres criterios: efecto bacteriostático; sin modificación del \log_{10} del conteo bacteriano inicial (N_0) y efecto bactericida y de erradicación bacteriana; reducción de \log_{10} de N_0 por debajo de $2,7 \log_{10}$ (<500 ufc/ml) y por debajo de $1,7 \log_{10}$ (<50 UFC/ml) respectivamente. La CPM se realizó con la técnica de inhibición de crecimiento en placa de agar con concentraciones de EFX y

Proyecto: 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: Dr. Enrique A. Formentini

Director del becario/tesista: Dr. Enrique A. Formentini

CFX equivalentes a 0, 1, 4, 14, 24, 34, 44, 54 y 64 x CIM. En la superficie de todas las placas se extendieron 100 μ l de una suspensión de $7,7 \times 10^8$ ufc/ml. La CPM se determinó como la concentración de antibiótico en la que no se observó crecimiento bacteriano en placa. La ventana de selección de mutantes (VSM) para EFX y CFX se delimitó en los perfiles de concentración plasmática de EFX y CFX obtenidos en bovinos tras la administración de una dosis de 5 mg/kg, los que fueron simulados a partir de los parámetros farmacocinéticos reportados por Lucas et al., (2008). De las placas sin desarrollo de colonias se obtuvieron muestras con hisopo estéril y se realizaron: (i) improntas para tinción de Gram y microscopía y (ii) cultivo en placas a 35°C durante 24 h para recuento de ufc y cálculo de ufc/ml. Se realizó la determinación de la CIM a todas las bacterias persistentes observadas en ambos ensayos.

RESULTADOS

Los valores de CIM fueron 0,0312 μ g/ml para EFX y 0,0156 μ g/ml para CFX. Las CMB de EFX y CFX sobre inóculos de alta densidad de *E. coli* 09-684 se presentan en la figura 1. Ninguna de las concentraciones de EFX y CFX pudo lograr una reducción del número de bacterias viables equivalente a la erradicación bacteriana (<50 ufc/ml).

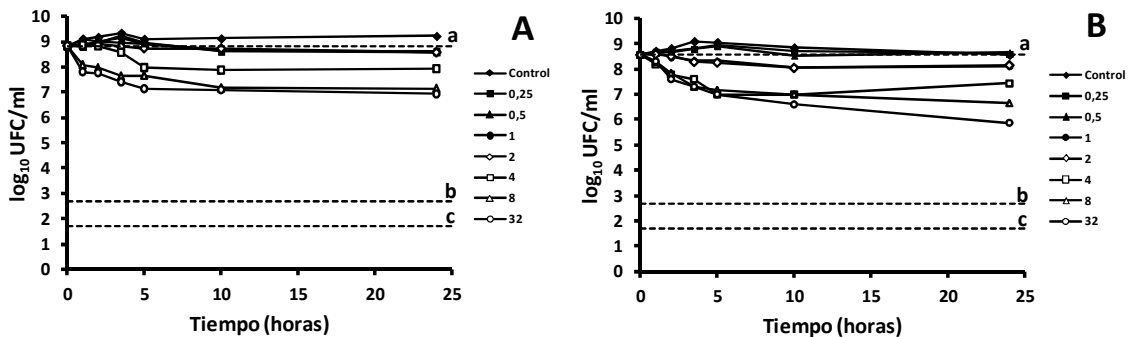


Figura 1. Evolución temporal de un inóculo de una cepa autóctona de *E. coli* 09-684 de alta densidad expuesto a concentraciones de (A) enrofloxacina y (B) ciprofloxacina. Los puntos de corte de eficacia clínica están representados con líneas de puntos horizontales siendo (a) actividad bacteriostática, (b) actividad bactericida y (c) erradicación bacteriana.

El valor estimado de la CPM fue de 0,437 μ g/ml para EFX y de 0,218 para CFX. La VSM en los perfiles plasmáticos de EFX y CFX en bovinos se presenta en la figura 2.

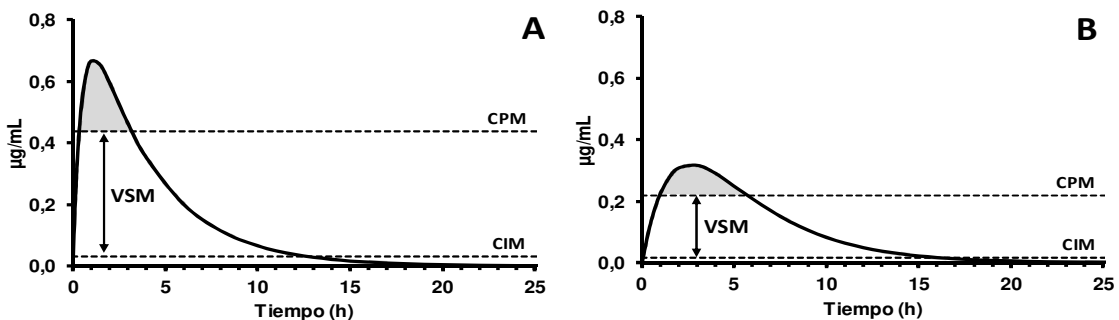


Figura 2. Simulación de los perfiles de concentración plasmática de (A) enrofloxacina y (B) ciprofloxacina obtenidos tras la administración de una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacina a un bovino. En las gráficas se hallan indicadas por medio de líneas de puntos la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración preventiva de mutantes (CPM) de cada antibiótico que delimitan la ventana de selección de mutantes (VSM). Las áreas grises indican las concentraciones que evitarían la selección de cepas de mutantes resistentes.

Las tinciones de los hisopados de la superficie de las placas de agar sin desarrollo de colonias mostraron formas filamentosas de *E. coli* (Figura 3), las que tras ser sembradas en placas de agar sin antibiótico desarrollaron un promedio de 11 (EFX) y 5 (CFX) ufc/placa, las que corresponden a una concentración de bacterias persistentes de 110 (EFX) y 50 (CFX) ufc/ml, estando estos valores por encima del punto de corte de erradicación bacteriana.

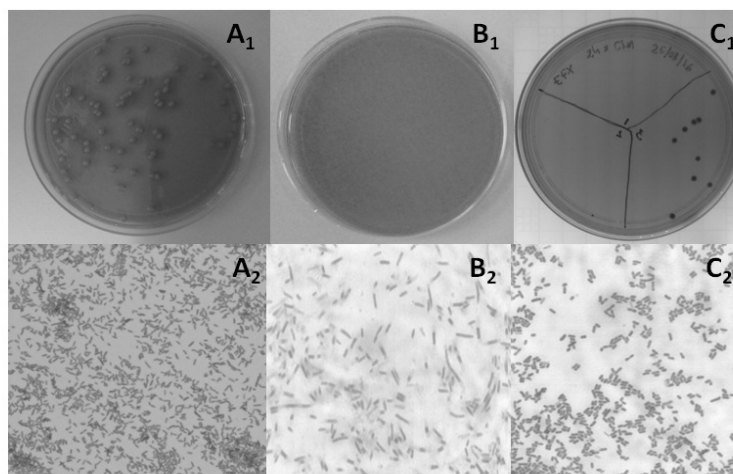


Figura 3. (A₁) Colonias de *E. coli* 09-684 sobre una placa de agar con utilizada para el control del tamaño inicial del inóculo de alta densidad presentando en (A₂) la morfología bacteriana normal. (B₁) Ausencia de desarrollo de colonias de *E. coli* 09-684 sobre una placa de agar conteniendo elevadas concentraciones de enrofloxacin y (B₂) tinción de un hisopado de la superficie de misma placa mostrando persistentes de *E. coli* con morfología filamentosa. (C₁) Colonias de *E. coli* 09-684 obtenidas por cultivo del hisopado de la superficie de la placa de la figura B₁, mostrando la viabilidad de las formas filamentosas persistentes de *E. coli* 09-684 y (C₂) y el retorno a la morfología normal de coccobacilo.

Las bacterias que en las CMB sobrevivieron a 24 h de exposición a concentraciones suprainhedoras de EFX y CFX y las que sobrevivieron sobre la superficie del agar con morfología filamentosa en el ensayo de CPM presentaron idénticos valores de CIM para EFX y CFX que las bacterias del inóculo original.

CONCLUSIONES

Los ensayos *in vitro* de eficacia antibiótica sobre inóculos bacterianos de alta densidad conducen a replantear los puntos de corte de eficacia antibacteriana utilizados corrientemente. Se acepta que reducciones mayores a $-3 \log_{10}$ y $-4 \log_{10}$ respecto del $\log_{10} N_0$ son indicadores clínicos de una actividad bactericida y de erradicación bacteriana respectivamente. Esto es cierto cuando los ensayos se realizan con inóculos de tamaño estándar (5×10^5 ufc/ml), donde estas eficacias se logran con reducciones de bacterias viables menores a 500 y 50 ufc/ml respectivamente, siendo el \log_{10} de estos valores de 2,7 y 1,7. En este ensayo realizado con inóculos de concentración elevada (\log_{10} 8,83 para EFX y \log_{10} 8,63 para CFX), los puntos de corte a considerar para evaluar la actividad bactericida y de erradicación bacteriana debería ser la reducción del \log_{10} de N_0 a valores de \log_{10} menores a 2,7 y 1,7 respectivamente. Los ensayos de CMB con altas concentraciones de *E. coli* 09-684 enfrentadas a EFX y CFX (Figura 1) mostraron que la actividad de estos antibióticos no logró reducir el número de bacterias viables por debajo del límite considerado como necesario para lograr la erradicación bacteriana ($<1,7$). Los ensayos de CPM mostraron que EFX y CFX presentan una actividad bactericida del tipo “todo o nada”, ya que

un incremento en la concentración de estas de 1 x CIM a 4 x CIM determinó la reducción de bacterias de $7,7 \times 10^8$ ufc/ml a 20 ufc/ml, estando la CPM de ambos antibióticos comprendida entre 4 y 14 x CIM (0,125 y 0,473 $\mu\text{g/ml}$ para EFX; 0,062 y 0,218 $\mu\text{g/ml}$ para CFX). La VSM para EFX y CFX representadas en las figuras 2A y 2B, muestran que en bovinos a una dosis terapéutica de 5 mg/kg, el tiempo de exposición a concentraciones que eviten la emergencia de cepas mutantes resistentes es de aproximadamente 3 h para EFX y de 4 hs para CFX. La pregunta que surge es: ¿es este tiempo de exposición suficiente para eliminar el riesgo de la selección de una cepa mutante resistente?

La presencia formas filamentosas de *E. coli* 09-684 en la superficie de las placas de agar, permite inferir que el pleomorfismo bacteriano es otra expresión fenotípica de las bacterias persistentes que ingresan en una fase de inactividad biológica y detienen su replicación para ser transitoriamente refractarias a la actividad de las FQs (EFX y CFX). Tanto en la CMB como en la CPM, las elevadas concentraciones de EFX y CFX ejercieron presión de selección sobre la población bacteriana, eliminando las biológicamente activas y permitiendo la supervivencia de las persistentes. Las formas filamentosas que fueron recultivadas en un medio sin antibiótico retomaron su actividad biológica, reiniciaron su fase de crecimiento, adoptaron su morfología normal de cocobacilo y presentaron la misma sensibilidad a EFX y CFX que al inicio del ensayo (Figura 3).

Actualmente la CPM es considerada un nuevo parámetro indicador de eficacia clínica y una alternativa para diseñar esquemas posológicos que logren en el organismo concentraciones que reduzcan la emergencia de cepas resistentes. Sin embargo, los resultados hallados muestran que las concentraciones superiores a la CPM y sostenidas durante 24 y 48 h no fueron eficaces para eliminar las bacterias persistentes ni reducir la viabilidad de las mismas. En un escenario *in vivo*, estas bacterias reiniciarían su actividad biológica normal y su crecimiento una vez que el agente antibacteriano desapareciera del organismo. Esto se correlaciona con la presencia de enfermedades crónicas y recidivantes, aún cuando los estudios de sensibilidad antibiótica de los gérmenes actuantes no muestren evidencia de resistencia bacteriana. El viejo y desechado paradigma de la terapéutica antibiótica sostenía que el éxito terapéutico se alcanzaba logrando concentraciones elevadas y sostenidas de antibiótico durante un tiempo prolongado, durante los años 80 este fue reemplazado por la discriminación de los modos de acción de los agentes antibióticos (concentración dependiente o tiempo dependiente) y su diferente modo de ser administrados (dosis y frecuencia) para garantizar eficacia. En este contexto, la CPM constituye una variante "reforzada" del desechado viejo paradigma que se basaba en el concepto de "cuanto más, mejor". Actualmente, muchos grupos de investigación sostienen que ningún modo de acción o posología antibiótica puede eliminar eficazmente las bacterias persistentes. Los esfuerzos actuales están encaminados al descubrimiento de nuevas moléculas capaces de minimizar la emergencia de persistentes o de impedir que éstas retomen su actividad biológica normal una vez que el antibiótico ha desaparecido del organismo. Queda por dilucidar por qué el medio de cultivo líquido en las CMB propició mayor sobrevida de persistentes ($7,5 \times 10^5$ y $8,3 \times 10^6$ UFC/ml que el medio sólido en el ensayo de CPM (50 y 110 UFC/ml).

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.
- Lucas J.J., San Andrés M.I., Gonzáles F., Froyman R., Rodríguez C.**, 2008. Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration to cattle. Veterinary research Communication, 32:275-279.
- 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.