

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE MARBOFLOXACINA SOBRE *Escherichia coli*; ENTRE LA BIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y EL MODELO MATEMÁTICO

Weidmann Carolina<sup>A,B</sup>, Dell'Elce Antonella<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Laboratorio de Farmacología y Toxicología - Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL  
<sup>B</sup>Cátedra de Matemática- Facultad de Ciencias Veterinarias - UNL

**Área:** Ciencias de la Salud  
**Sub-Área:** Veterinaria  
**Grupo:** X

**Palabras clave:** marbofloxacina, *Escherichia coli*, modelización

### INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, la biología se ha caracterizado por ser una disciplina contemplativa y descriptiva. La experiencia nos muestra que si bien no podemos comprender de manera completa los sistemas biológicos, al menos podemos predecir, dentro de ciertas limitaciones la respuesta de los mismos. La meta de la ciencia actual es crear modelos teóricos que puedan describir y predecir el comportamiento de tales sistemas. A veces no es posible reiterar un experimento tantas veces como se desea o por cuestiones éticas éste no puede realizarse en el ámbito donde ocurren, como por ejemplo en seres vivos. Esto lleva a reemplazar el sistema real por otro simulado (modelo) que puede ser manipulado por el investigador. Este modelo es una representación simplificada de una realidad compleja y está constituido por un objeto de estudio, un estímulo o causa (input) y una respuesta (output). Cuando estos modelos se explican en términos matemáticos, entonces hablamos de modelos formales. La utilización de modelos formales permite: (i) Entender cómo funciona el sistema biológico que se está estudiando, (ii) Describir la respuesta del sistema en términos de causa-efecto y (iii) Predecir la respuesta del sistema ante variaciones en la magnitud de las causas. La Marbofloxacina (MFX) es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas con gran actividad sobre *Escherichia coli*. Ante la dificultad de evaluar su actividad antibacteriana *in vivo*, es que se utilizan modelos *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos con los modelos *in vitro*, solo aportan información descriptiva y estática, por lo que los resultados obtenidos con los modelos *in vitro* analizados con modelos matemáticos adecuados permitirá destapar la caja negra entre causa (concentración de antibiótico) y efecto (eliminación bacteriana).

### OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el de evaluar la actividad antibacteriana de MFX sobre una cepa de *Escherichia coli* mediante modelos *in vitro* y posteriormente analizar los datos experimentales obtenidos con modelos matemáticos específicos como el modelo de Gompertz y el modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill, a fin de poder comprender la mecánica de la relación concentración de antibiótico-efecto bactericida y obtener mayor información acerca de la misma.

Proyecto: Integración farmacocinética/farmacodinámica *ex vivo* de marbofloxacina sobre *Escherichia coli* tras su administración por vía subcutánea en cabras de 1, 3 y 6 semanas de edad

Director del proyecto: Dr. Enrique Formentini

Director del becario/tesista: Dr. Enrique Formentini

## METODOLOGÍA

Se utilizó un estándar de MFX de pureza conocida, y una cepa autóctona de *Escherichia coli* (09-684). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de macrodilución en tubo dentro del intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,004 y 1 µg/mL. A partir del valor estimado de CIM se realizó con un ensayo *in vitro* de cinética de muerte bacteriana a concentraciones fijas de MFX equivalentes a 0 (crecimiento testigo), 0,25 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 x CIM, según metodología reportada por García Rodríguez y col., (2001). De los inóculos expuestos a cada concentración de MFX se extrajeron alícuotas a los 0, 1, 2, 3,5, 5, 10 y 24 h que se extendieron sobre placas de agar, las que se incubaron a 35°C durante 24 h, para luego proceder al conteo de colonias. El conteo de bacterias viables se expresó como unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL). La eficacia de MFX fue evaluada con tres puntos de corte: (i) Actividad bacteriostática sin modificación del log del conteo bacteriano inicial (log  $N_0$ ) equivalente a la CIM, (ii) Actividad bactericida (reducción  $\geq$  a 3 log de  $N_0$  (equivalente a remisión clínica) y (iii) Erradicación bacteriana (reducción  $\geq$  a 4 log de  $N_0$  (equivalente a la cura bacteriológica). Los valores log transformados de UFC/mL obtenidos para la curva de crecimiento testigo y para cada concentración de MFX en cada tiempo de muestreo fueron ajustados mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con el modelo de Gompertz que se describe en la ecuación 1.

### Ecuación 1.

$$\log UFC/mL = N_0 + (A - B)$$

$$A = N_{ss} \cdot e \left\{ -e \left[ \left( \frac{k_c \cdot e}{N_{ss}} \right) \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

$$B = N_{ss} \cdot e \left\{ -e \left[ \left( \frac{k_b \cdot e}{N_{ss}} \right) \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Donde  $N_0$  es el log del conteo bacteriano inicial (UFC/mL);  $N_{ss}$  es el máximo conteo bacteriano estimado;  $\lambda$  es el tiempo de latencia;  $e$  es la base de los logaritmos naturales;  $t$  es el tiempo;  $k_c$  es la constante de crecimiento bacteriano y  $k_b$  es la constante de muerte bacteriana.

Los valores estimados de  $k_b$  y  $N_{ss}$  con el modelo de Gompertz y los valores observados de eficacia de MFX (reducción del log  $N_0$ ) en función de las concentraciones testeadas de MFX fueron ajustadas con el modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill, que se presenta en la ecuación 2.

### Ecuación 2.

$$R = R_0 + \frac{R_{max} \cdot C^N}{C_{50} + C^N}$$

Donde  $R_0$  es la respuesta basal ( $k_b$ ,  $N_{ss}$ , *Eficacia*);  $R_{max}$  es la máxima respuesta esperada ( $k_b$  (max),  $N_{ss}$  (max), *Eficacia* (max));  $C$  es la concentración de MFX;  $C_{50}$  es la concentración de MFX capaz de producir el 50% de  $R_{max}$  y  $N$  es el coeficiente de sigmoidicidad o de Hill.

Las concentraciones teóricas de MFX para obtener una actividad bacteriostática, bactericida y de erradicación bacteriana se estimaron con la ecuación 3.

### Ecuación 3.

$$C = \left[ \frac{(R - R_0) \cdot C_{50}^N}{R_{max} - R_0 - R} \right]^{\frac{1}{N}}$$

Donde  $R$  la respuesta deseada (actividad bacteriostática, bactericida o de erradicación bacteriana), para la cual se desea estimar la concentración de MFX capaz de obtenerla. Los demás símbolos fueron explicados en la ecuación 2.

Los modelos fueron construidos con el programa informático ADAPT II (BMSR, University of Southern California USA).

## RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos con los ensayos *in vitro* de microdilución en tubo y cinética de muerte bacteriana, los valores observados de CIM y concentración bactericida mínima (CBM) de MFX sobre *E. coli* 09-684 coincidieron en 0,0312  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la concentración estimada de erradicación bacteriana (CeEB) fue de 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . El ajuste de las curvas de crecimiento y muerte de *E. coli* 09-684 enfrentadas a concentraciones fijas de MFX durante 24 h se presentan en la figura 1.

Figura 1.

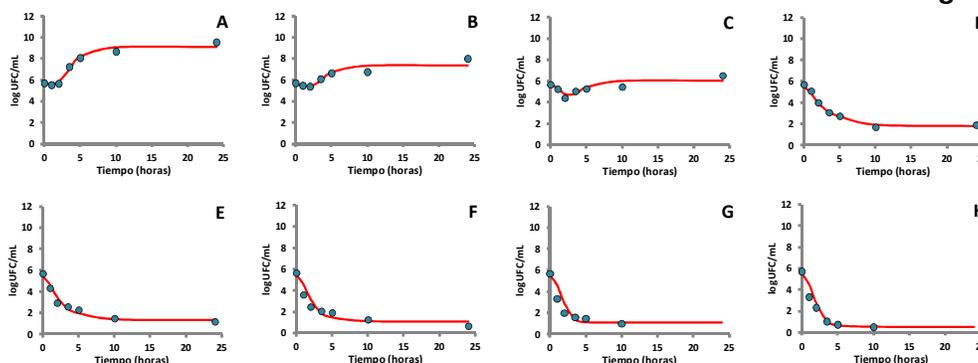


Figura 1. El ajuste de las curvas de crecimiento y muerte de *E. coli* 09-684 enfrentadas a las concentraciones fijas de MFX de **A)** control, **B)** 0,25 x CIM, **C)** 0,5 x CIM, **D)** 1 x CIM, **E)** 2 x CIM, **F)** 4 x CIM, **G)** 8 x CIM y **H)** 16 x CIM. Los círculos representan los valores de log UFC/mL y las líneas llenas son los valores estimados.

El ajuste de los valores estimados de  $k_b$  y  $N_{ss}$  en función de las concentraciones de MFX, con el modelo sigmoideo o de Hill se presenta en la figura 2, y los parámetros estimados se presentan en la tabla 1.

Figura 2.

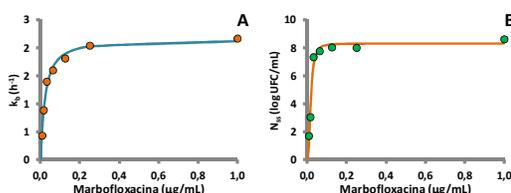


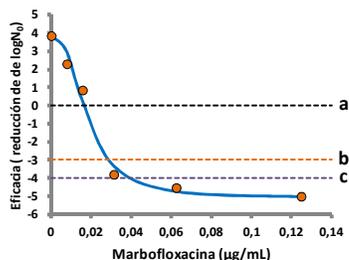
Figura 2. El ajuste de los valores de **A)**  $k_b$  ( $\text{h}^{-1}$ ) y **B)**  $N_{ss}$  (log UFC/mL). Los círculos representan los valores de log UFC/mL y las líneas llenas son los valores estimados.

Tabla 1.

Parámetros estimados con el modelo de Hill			
$k_{b0}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,001	$N_{ss0}$ (log UFC/mL)	0,001
$k_{b(max)}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	2,149	$N_{ss(max)}$ (log UFC/mL)	8,296
$C_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,022	$C_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,017
N	1,14	N	2,42

Tabla 1. Parámetros estimados con el modelo de Hill, donde  $k_{b0}$  y  $N_{ss0}$  son la constante de muerte bacteriana y el log de la máxima concentración bacteriana a tiempo cero respectivamente;  $k_{b(max)}$  y  $N_{ss(max)}$  son los máximos valores esperados de la constante de muerte bacteriana y del log del conteo bacteriano esperado;  $C_{50}$  es la concentración de MFX que produce el 50% de los efectos máximos y N es el coeficiente de Hill.

El ajuste de los valores observados de reducción log del conteo bacteriano inicial en función de las concentraciones de MFX se presenta en la figura 3, y los parámetros estimados junto con los valores de concentraciones de MFX para obtener la actividad bacteriostática (CIM), bactericida (CBM) y la erradicación bacteriana (CeBM) se presentan en la Tabla 2.



**Figura 3.**

**Figura 3.** Ajuste de los valores observados de reducción log del conteo bacteriano inicial en función de las concentraciones de MFX. Los círculos representan la reducción del log del conteo bacteriano inicial para cada concentración de MFX y la línea continua representa los valores estimados por el modelo. Las líneas de puntos representan **a)** actividad bacteriostática equivalente a la CIM, **b)** actividad bactericida equivalente a la remisión clínica y la CBM y **c)** erradicación bacteriana, equivalente a la cura bacteriológica y la CeBM.

**Tabla 2.**

Parámetros estimados con el modelo de Hill			
$N_0$ (log UFC/mL)	3,849	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,01649
$E_{\text{max}}$ (-log UFC/mL)	-8,937	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,02883
$C_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,0183	CeBM ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,03892
N	2,627		

**Tabla 2.** Parámetros estimados con el modelo de Hill.  $N_0$  y  $E_{\text{max}}$  son el log del conteo bacteriano inicial y la reducción del log de este respectivamente;  $C_{50}$  es la concentración de MFX que produce el 50% del efecto máximo; N es el coeficiente de Hill; CIM, CBM y CeBM son las concentraciones inhibitorias mínimas, bactericida mínima y de erradicación bacteriana mínimas estimadas con el modelo de Hill.

## CONCLUSIONES

La utilización de modelos matemáticos, permitió estimar de manera más precisa los parámetros de eficacia antibacteriana de MFX sobre la cepa autóctona de *E. coli* 09-684. Las constantes de velocidad de muerte bacteriana se incrementaron de forma proporcional al incremento de las concentraciones de MFX, lo que corrobora una actividad concentración dependiente de este antibiótico. Sin embargo, la relación concentración-eficacia de MFX mostró una actividad de todo o nada, donde a partir de un pequeño incremento en las concentraciones de MFX se pasó de una actividad casi nula a la máxima eficacia. Esto puede ser explicado porque aunque la velocidad de muerte inicial se incrementa en forma directa a las concentraciones de MFX, la selección de una subpoblación de bacterias persistentes y su lenta eliminación determinó un perfil de eliminación bacteriano bifásico, dando lugar a una eficacia similar para todas las concentraciones de MFX iguales o superiores a  $1 \times \text{CIM}$ . En este sentido, el modelo de Gompertz, permitió describir adecuadamente la cinética de eliminación bifásica de *E. coli* 09-684. En este estudio mostramos que el análisis de los sistemas biológicos mediante la utilización de modelos formales, permite obtener mayor información que la simple recolección de datos a partir de la observación de los resultados de un ensayo *in vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**García Rodríguez J.A., Cantón R., García Sánchez J.E., Gómez-Lus M.L., Martínez Martínez L., Rodríguez-Avila 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.