

Fenómeno de resistencia de primer paso de una cepa de *Escherichia coli* a la actividad de enrofloxacin, ciprofloxacina y marbofloxacina

Aguirre M.S.¹; Patricelli P.¹; Dell'Elce A.¹; Weidmann C.¹⁻²; Fernández H.³; Formentini E.¹

¹Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL

²Cátedra de Matemática, FCV-UNL

³Cátedra de Farmacología, FCV-UNL

soledad.aguirre87@hotmail.com

La sensibilidad de una bacteria a una quinolona está determinada por la capacidad de ésta para ingresar y acumularse en el interior de la misma y en la potencia para unirse a su sitio de acción (enzima ADN girasa o topoisomerasa IV). La resistencia a las quinolonas tiene su base en la mutación espontánea de genes cromosomales durante el proceso de fisión binaria, donde ocurren errores en la copia del ADN. Estas mutaciones presentan baja frecuencia, usualmente 1 en 10^6 o 1 en 10^9 y alteran (i) los sitios de acción de las quinolonas; enzimas ADN girasa (bacterias gram negativas) y topoisomerasa IV (bacterias gram positivas) y (ii) los mecanismos de ingreso (porinas) o extrusión (bombas de flujo) de estos antibióticos. Por eso, dentro de una población bacteriana sensible, es posible hallar una pequeña fracción de bacterias ($<10^{-9}$) que son refractarias a la actividad de las quinolonas. La presencia del antibiótico elimina entonces las bacterias sensibles y permite la sobrevivencia de la fracción refractaria a éste. Concentraciones elevadas de quinolonas como la concentración preventiva de mutantes (CPM), impiden la sobrevivencia y el crecimiento de estas mutantes resistentes. La evolución de la resistencia a las quinolonas se produce por un proceso escalonado de acumulación de mutaciones (mutaciones de un solo paso). Cada mutación disminuiría la sensibilidad de las quinolonas en el orden de 4 y 8 veces⁴. Cuando las bacterias que han mutado se replican, entonces puede producirse nuevamente un error en la transcripción del ADN y la sensibilidad de esta progenie vuelve a reducirse en el orden de 4-8 veces. Estas mutaciones únicas, pueden acumularse a lo largo de sucesivas generaciones (mutantes de 2^{do}, 3^{er} o 4^{to} paso) hasta llegar a originar una población de bacterias resistentes. La resistencia entre quinolonas puede ser cruzada o dicotómica. En la primera; la sensibilidad de dos quinolonas (A y B) disminuye en el orden de 4-8 veces, pero la potencia de las mismas se mantiene (B sigue siendo menos potente que A). En la resistencia dicotómica, la sensibilidad de una quinolona no es afectada por la pérdida de la sensibilidad de otra, por lo tanto, la relación entre la potencia de las mismas no se mantiene y el grado de disminución de sensibilidad depende del microorganismo y de la quinolona utilizada. El impacto clínico de las mutaciones de un paso depende de la potencia de la quinolona para la bacteria sobre la que actúa. La evolución de la resistencia clínica a una quinolona específica es determinada por la potencia intrínseca de la droga a una cepa sensible, los efectos de la droga en el sitio de la infección y el número de mutaciones sucesivas que se necesitan para que la sensibilidad de la bacteria mutante supere cierta concentración denominada punto de corte clínico. Esta evolución escalonada permitiría predecir la eficacia de la terapia con una quinolona que tenga bajas probabilidades de desarrollar resistencia (necesidad de un elevado número de mutaciones sucesivas). En este estudio evaluamos la resistencia cruzada de una cepa autóctona de *Escherichia coli* para tres antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas; enrofloxacin (EFX), ciprofloxacina (CFX) y marbofloxacina (MFX). Se utilizó una cepa autóctona de *Escherichia coli* (*E. coli* 09-684), y estándares de pureza conocida de EFX, CFX y MFX. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los tres antibióticos se determinó por el método de macrodilución en tubo¹. Para EFX y CFX se determinó la CPM mediante método previamente descrito³. A partir de una colonia que desarrolló a la concentración inmediata inferior a la CPM de CFX se le determinó la CIM para MFX. Para evaluar la sensibilidad de *E. coli* 09-684 a cada antibiótico se utilizaron puntos de corte epidemiológicos² (concentración a partir de la cual la sensibilidad está disminuida) y clínicos³ (concentración a partir de la cual la cepa es resistente). Se

observó que la cepa *E. coli* 09-684 en los ensayos de CPM para EFX, CFX y MFX desarrolló resistencia por mutación de un paso. Además, CFX presentó resistencia cruzada con MFX. Para los tres antibióticos el punto de corte epidemiológico fue $\geq 0,125 \mu\text{g/mL}$, mientras que el punto de corte clínico fue $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ¹⁻². Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Reducción de sensibilidad de una cepa autóctona de *Escherichia coli* (*E. coli* 09-684) a la acción de enrofloxacin (EFX), ciprofloxacina (CFX) y marbofloxacina (MFX). La reducción de sensibilidad de los antibióticos se expresó como el cociente entre la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración preventiva de mutantes (CPM). La resistencia cruzada con MFX (0,25 $\mu\text{g/mL}$) se observó en la cepa que desarrolló menor sensibilidad a la CFX (0,218 $\mu\text{g/mL}$). En negrita se expresan los valores observados y en cursiva los valores estimados de repetirse el patrón de resistencia. Las áreas sombreadas en verde corresponden a poblaciones sensibles. Las áreas en amarillo corresponden a poblaciones con sensibilidad disminuida y las áreas naranja corresponden a poblaciones resistentes.

	EFX	CPM/CIM	CFX	CPM/CIM	MFX	CPM/CIM
CIM ($\mu\text{g/mL}$)	0,0312	-	0,0156	-	0,0156	-
CPM ($\mu\text{g/mL}$) mutación de primer paso observada	0,437	14	0,218*	14	0,094	6
CIM ($\mu\text{g/mL}$) mutación de segundo paso estimada	<i>6,115</i>	<i>14</i>	<i>3,058</i>	<i>14</i>	<i>0,562</i>	<i>6</i>
CIM ($\mu\text{g/mL}$) mutación de tercer paso estimada			<i>42,80</i>	<i>14</i>	<i>3,369</i>	<i>6</i>
CIM ($\mu\text{g/mL}$) mutación de cuarto paso estimada					<i>20,21</i>	<i>6</i>
CIM ($\mu\text{g/mL}$ *) resistencia cruzada entre CFX y MFX					0,25*	-

La cepa *E. coli* 09-684, por mutación de primer paso redujo su sensibilidad a EFX y CFX en el orden de 14 veces. Este hecho es curioso, ya que para bacterias Gram negativas y particularmente *Escherichia coli* se ha reportado que las mutaciones puntuales reducen su sensibilidad en el orden de 4-8 veces⁴. Si en la progenie de estas mutantes se produjeran otras mutaciones con el mismo patrón de pérdida de sensibilidad (reducción de 14 veces), entonces solo sería necesaria una mutación más para que se originara una cepa resistente a EFX y dos mutaciones para que se originara una cepa resistente a CFX. La cepa *E. coli* 09-684 presentó para MFX un patrón de reducción de sensibilidad menor (reducción de 6 veces). Esto permite inferir que teóricamente se necesitaría la acumulación de 4 mutaciones sucesivas para que se origine una cepa resistente a MFX. La cepa que luego de la mutación de primer paso desarrolló menor sensibilidad a CFX (0,218 $\mu\text{g/mL}$), también desarrolló resistencia cruzada con MFX (0,25 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados muestran que los patrones de desarrollo acumulado de resistencia pueden variar entre los distintos antibióticos del grupo de las quinolonas. A partir de la comprensión del fenómeno de resistencia por acumulación escalonada de mutaciones, es que se puede predecir que la MFX puede proporcionar una terapia efectiva para una infección producida por la cepa en estudio, ya que este antibiótico al necesitar al menos 4 mutaciones puntuales sucesivas, presentaría menos probabilidad de perder su eficacia a causa del desarrollo de resistencia.

Bibliografía

- 1- 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.
- 2- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) Performance standards for antibiotic susceptibility testing; twentieth informational supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA.
- 3- García Rodríguez, J.A.; Cantón, R.; García Sánchez, J.E.; Gómez-Lus, 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.
- 4- Sanders, C. (2001) Mechanism responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clinical Infectious Disease*.15; 32 Suppl. 1:S1-8.