

Actividad *in vitro* de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* a pH 7,4-6,5 y 5,5

Dell'Elce, A.; Patricelli, P.; Mostafa, M.; Ramírez, E.; Presa Rossa, C.; Cadoche, L.; Weidmann, C.; Baroni, E.; Formentini, E.

Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL
adellelce95@gmail.com

“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” Proyecto n° 501 201101 00068 LI CAI+D 2011. Resolución C.S. n° 481/13.

Ciprofloxacina (CFX) es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria. Como todos los de su grupo presenta actividad bactericida dependiente de su concentración. Su acción se debe a que impide la replicación del ADN bacteriano bloqueando la DNA-girasa, que es la enzima encargada de deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN, permitiendo que otras enzimas puedan proceder a la replicación propiamente dicha. Químicamente es una piperazinil quinolona que presenta en su núcleo un grupo carboxílico en posición 3 y un grupo amino en posición 7, por lo que según el pH del medio en que encuentre se puede presentar en tres formas; zwitterionica (bipolar), aniónica y catiónica. Debido a sus dos grupos funcionales CFX presenta dos pK_a : $pK_{a1} = 5,15$ y $pK_{a2} = 8,25$. Estos valores determinan que a pH fisiológico de 7,4, la molécula se halle mayoritariamente en su forma no iónica y liposoluble. Si bien al pH 7,4 se lo denomina “fisiológico”, dicha expresión es solo una formalidad, ya que los diversos fluidos biológicos de un organismo presentan diferentes valores de pH². Estas variaciones determinan que el grado de ionización y actividad de CFX se vea modificada. La concentración inhibitoria mínima (CIM) determinada por los métodos de macro o microdiluciones 1:1, presenta una gran inexactitud debido a que se desconoce la actividad de las concentraciones intermedias. Las curvas de muerte bacteriana (CMB), aunque también se basan en la técnica de dilución 1:1 presentan la ventaja de evaluar la actividad antibacteriana por conteo directo en placa de las bacterias supervivientes. El ajuste de los datos de bacterias viables expresados como unidades formadoras de colonia (ufc/ml) tras 24 h de exposición a diferentes concentraciones de antibióticos, mediante el modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill, permite estimar mediante modelización de los datos experimentales (ufc/ml) el valor teórico de la CIM. En este ensayo se evaluó (i) la actividad *in vitro* de CFX sobre una cepa autóctona de *E. coli* en presencia de diferentes valores de pH, mediante los ensayos de CMB y (ii) la estimación de diferentes parámetros de actividad antibacteriana mediante modelización de los datos experimentales por medio del modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill. Se utilizó un estándar de CFX de pureza conocida y una cepa autóctona de *E. coli* (Ecoli 09/684) aislada de materia fecal de un ternero con signos de gastroenteritis y que fue identificada por multiplex PCR para factores de virulencia³. El medio de cultivo utilizado fue caldo Mueller Hinton y su pH original (7,4) fue modificado con ácido fosfórico 1M hasta lograr valores de 6,5 y 5,5. La CIM se determinó por el método de macrodilución en tubo¹ en el intervalo de concentraciones de 0,0039 y 1 μ g/ml. Para cada pH se realizó una curva de crecimiento y una CMB según método previamente descrito⁴ con concentraciones de CFX equivalentes a los siguientes múltiplos del valor de CIM estimado a pH 7,4; 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, y 32. De los inóculos de cada curva de crecimiento y de los expuestos a cada concentración de CFX se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 3,5, 5, 10 y 24 h y posteriormente se determinó el número de bacterias viables que se expresaron como ufc/ml. Los datos experimentales de ufc/ml se ajustaron con el modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill mediante regresión no lineal comparada de mínimos cuadrados. Los parámetros estimados se presentan en la tabla 1. A partir de la evaluación visual de los resultados obtenidos en las CMB y del ajuste de los datos experimentales por modelización se evaluó la eficacia de CFX sobre *E. coli* (09-684) en base a tres concentraciones: (i) la CIM que garantizaría un efecto bacteriostático en la que no habría modificación del \log_{10} del conteo bacteriano inicial (N_0), (ii) la concentración bactericida mínima (CMB) que

lograría el efecto bactericida equivalente a la reducción de 3 log₁₀ respecto de N₀ (eficacia del 99,9%) y (iii) la concentración de erradicación bacteriana mínima (CEBM) que lograría una reducción de 4 log₁₀ respecto de N₀ (eficacia del 99,99). Las concentraciones observadas y estimadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 1. Parámetros del modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill, estimados mediante regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados de los datos experimentales de ufc/ml observados tras 24 h de exposición de una *E. coli* (09-684) a concentraciones de ciprofloxacina a pH de 7,4 – 6,5 y 5,5.

Parámetros	pH 7,4	pH 6,5	pH 5,5
N ₀ (log ₁₀ ufc/ml)	3,31	2,82	3,06
E _{max} (log ₁₀ ufc/ml)	-8,38	-8,37	-8,87
C ₅₀ (µg/ml)	0,008	0,040	0,096
n	23,74	6,64	2,77

N₀ es el valor estimado del log₁₀ del conteo bacteriano inicial; E_{max} es el efecto bactericida máximo estimado como reducción del log₁₀ de N₀, C₅₀ es la concentración de ciprofloxacina que logra el 50% del E_{max} y n es el coeficiente de sigmoidicidad o de Hill.

Tabla 2. Concentraciones de eficacia antibacteriana obtenidos partir de la evaluación visual de las curvas de muerte bacteriana (observados) y del ajuste de los datos experimentales por modelización (estimados).

Parámetros	pH 7,4		pH 6,5		pH 5,5	
	Observados	Estimados	Observados	Estimados	Observados	Estimados
CIM (µg/ml)	0,0156	0,0083	0,063	0,0357	0,125	0,0769
CBM (µg/ml)	0,0156	0,0088	0,063	0,0448	0,125	0,1263
CEBM (µg/ml)	0,0156	0,0091	0,063	0,0495	0,5	0,1564

CMB es curva de muerte bacteriana; CIM es la concentración de CFX que tras 24 h de actividad logra un efecto igual o mayor al bacteriostático; la concentración bactericida mínima (CBM) como la concentración de CFX que logra un efecto igual o mayor a la reducción del 99,9 % del inóculo inicial (-3 log₁₀ de N₀) y la concentración de erradicación bacteriana mínima (CEBM) como la concentración de CFX que logra un efecto mayor o igual a la reducción del 99,99 % del inóculo inicial (-4 log₁₀ de N₀).

El modelo sigmoideo de respuesta máxima permitió identificar para CFX una respuesta de tipo todo o nada. Asimismo, los valores observados de CIM, CBM y CEBM presentaron diferencias notorias con los valores estimados por modelización, las que proporcionaron una información más precisa acerca de la relación concentración-efecto. Las concentraciones de CFX necesarias para producir los efectos de CIM, CBM y EEBM se incrementaron con el descenso del pH. Esta pérdida se explica por el incremento de la fracción iónica e inactiva de la molécula a pH ácido Este efecto cobra importancia clínica, ya que en una infección, el proceso inflamatorio provoca un descenso del pH del líquido pericelular pudiendo modificar su eficacia sobre bacterias de localización extracelular.

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-**Endorgan-Yildrin, Z., Burian, A., Manafi, M. & Zeitlinger, M.** (2011). Impact of pH on bacterial growth and activity of recent fluoroquinolones in pooled urine. *Res in Microbiol.* 162: 249-252.
- 3-**Franck, S.M., Bosworth, B.T. & Moon, H.W.** (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol.*, 36(6), 1795-1797.
- 4-**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.