

Inducción *in vitro* del fenómeno de persistencia bacteriana de una cepa de *Escherichia coli* enfrentada a concentraciones supra inhibitorias de marbofloxacina; consideraciones acerca del impacto del mismo en el diseño y eficacia de la posología antibiótica

Dell'Elce, A.¹; Patricelli, P.¹; Weidmann, C.¹; Candiotti, V.³; Rubio, G.³; Fernández, H.²; Baroni, E.²; Formentini, E.¹

¹Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL

²Cátedra de Farmacología, FCV-UNL

³Cátedra de Semiología, FCV-UNL

adellelce95@gmail.com

Los antibióticos matan a la mayoría de una población bacteriana. Sin embargo, una pequeña fracción de esa población sobrevive a causa de ingresar a un estado de lento crecimiento o quietud metabólica. Una vez desaparecido o eliminado el antibiótico, estas bacterias sobrevivientes reinician su crecimiento y originan una población con una sensibilidad al antibiótico idéntica a la de la población que le dio origen. Este fenómeno se conoce como “persistencia” y fue descrito por primera vez en el año 1942, pero permaneció poco comprendido y olvidado durante décadas. Solo recientemente se ha reconocido que las bacterias persistentes son la principal causa de la recurrencia de infecciones crónicas y un importante factor para la emergencia de la resistencia a los antimicrobianos. La administración de un antibiótico a intervalos regulares da como resultado que durante el intervalo entre dosis, a causa de los procesos de absorción, distribución y eliminación, las concentraciones plasmáticas del mismo en el sitio de localización bacteriana fluctúan entre valores superiores e inferiores a la concentración inhibitoria mínima (CIM) denominados picos (>CIM) y valles (<CIM). Eso determina que durante los picos se genere un escenario ideal para la selección de una sub población de bacterias persistentes y que durante los valles se origine un ambiente óptimo para que estas reinicien su crecimiento. En este estudio hemos inducido *in vitro* la selección de una sub población de bacterias persistentes de una cepa de *Escherichia coli* por exposición intermitente de esta cepa a elevadas concentraciones de un antibiótico del grupo de las Fluoroquinolonas (FQs); la marbofloxacina (MFX), y a partir de estos resultados realizamos algunas consideraciones acerca del impacto clínico y del diseño de esquemas posológicos debidos a este fenómeno. Se utilizó una cepa estándar de *Escherichia coli* (ATCC 25922) porque representa la sensibilidad de referencia de cualquier cepa autóctona sensible a la actividad de MFX. La CIM de MFX se determinó mediante el método de macrodilución en tubo¹, exponiendo los inóculos bacterianos a diluciones dobles de concentraciones de MFX comprendidas entre 1 y 0,0078 µg/mL. Se determinó el conteo bacteriano al inicio del ensayo y luego de 24 h de exposición de las bacterias al antibiótico. Las bacterias sobrevivientes a la máxima concentración de MFX fueron repicadas en agar McConkey en ausencia de antibiótico e incubadas a 35°C durante 24 h, y sobre éstas se volvió a determinar el valor de la CIM y de los conteos bacterianos iniciales y finales. Este procedimiento se repitió cuatro veces. El valor de la CIM de MFX al inicio del ensayo fue de 0,0032 µg/mL. En todos los repiques, se observó que en concentraciones de MFX comprendidas entre 0,0624 y 1 µg/mL sobrevivieron entre el 0,0009 y 0,0076% de las bacterias con respecto al tamaño inicial de los inóculos. Sin embargo, en los sucesivos repiques de las bacterias sobrevivientes a concentraciones de MFX mayores a la CIM, no se observó un incremento del valor de la CIM original. El detalle de los resultados se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de sobrevida bacteriana y valores de CIM de MFX en bacterias que sobrevivieron luego de una exposición a concentraciones supra inhibitorias de MFX durante 24 horas.

Repique	CIM de MFX (µg/mL)	Concentraciones de MFX (µg/mL)	Conteo bacteriano inicial (ufc/mL)	Conteo bacteriano final (ufc/mL)	Sobrevida (%)
Inicial	0,0312	32 x CIM	540540	10	0,0018
1	0,0156	64 x CIM	500500	25	0,005
2	0,0156	16 x CIM	550550	15	0,0027
3	0,0312	8 x CIM	330330	25	0,0076
4	0,0312	8 x CIM	760760	15	0,0033

La sobrevida de un pequeño número de bacterias luego de una exposición de 24 horas a concentraciones supra inhibitorias de MFX, hace suponer *a priori* la selección de una sub población bacteriana que ha desarrollado algún grado de resistencia al antibiótico. Sin embargo, estas bacterias mostraron no haber modificado su sensibilidad a la MFX. Este fenómeno denominado “persistencia”, corresponde a una “*política*” de sobrevida bacteriana ante la emergencia de condiciones ambientales adversas y durante el tiempo en que éstas se mantengan. La reducción de la actividad metabólica de las mismas es la razón por la cual pueden sobrevivir prolongados períodos con mínimos requerimientos energéticos y es el fenómeno que explica el porqué estas bacterias sobrevivientes se tornan transitoriamente refractarias a los antibióticos. La persistencia constituye un comportamiento de supervivencia común a todas las bacterias y actualmente se ha valorizado el papel que juega la misma en las infecciones crónicas y recidivantes. La ausencia de drogas que actúen sobre las bacterias persistentes ya sea impidiendo su formación o bloqueando su reingreso a la actividad metabólica, representa un problema sin resolver en el diseño de esquemas posológicos. Cogan y col.² basándose en resultados de eficacia *in vitro* entre una FQ; ofloxacina (OFX) y una cepa de *S. aureus*, proponen que ciclos regulares constituidos por 20 h de exposición de esta bacteria a concentraciones de OFX >CIM seguidos de 4 h de ausencia de antibiótico (20/4), reducirían paulatinamente el número de bacterias persistentes. No obstante, esta propuesta es meramente teórica y difícil de extrapolar al escenario *in vivo*, ya que en los esquemas posológicos (dosis e intervalos de administración), luego del pico de concentración, los niveles del antibiótico nunca llegan a cero. Es sabido que aún a concentraciones <CIM los antibióticos mantienen un grado de actividad levemente bactericida o bacteriostático. De manera que la presión ejercida por la presencia del antibiótico no desaparecería nunca durante el tiempo que dura el tratamiento. Concluyendo, los resultados contribuyen a mostrar la presencia de las bacterias persistentes y alertar sobre el papel que éstas pueden jugar como agentes etiológicos de enfermedades crónicas de etiología bacteriana, que la mayoría de las veces son atribuidas a la presencia de cepas bacterianas resistentes. Es bien conocida en nuestra profesión la presentación de cuadros clínicos recidivantes como otitis canina o mastitis bovina, que luego de remitir ante un tratamiento antibiótico recurrente, aunque el agente etiológico aislado no muestre poseer menor sensibilidad al antibiótico utilizado. Se han reportado muchas alternativas farmacológicas que permitirían eliminar a las bacterias persistentes. Lamentablemente, hasta el presente, solo son reportes experimentales y no se dispone en el mercado de drogas capaces de hacer frente a esta problemática.

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- Cogan, N.; Rath, H.; Kommerein, N.; Stumpp, S., Stiesch M. (2016). Theoretical and experimental evidence for eliminating persisten bacteria by manipulating killing timing. FEMS Microbiol Lett. 363(23). pii: fnw264. doi: 10.1093/femsle/fnw264.