

Fenómenos de persistencia y pleomorfismo de *Escherichia coli*

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

Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL

p.patricelli@hotmail.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.

Durante millones de años, las bacterias han evolucionado adaptándose a los diversos medioambientes y sus fluctuaciones. Una de esas adaptaciones es el fenómeno de persistencia, el cual consiste en que ante condiciones ambientales que afectan las funciones vitales de las bacterias, estas se mantengan en fase de crecimiento estacionario, reduciendo al mínimo los requerimientos energéticos, “persistiendo” en el medio ambiente hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables y entonces reiniciar su actividad metabólica y crecimiento normal³. Este comportamiento no es producto de una mutación sino de información ya presente en el genoma de la bacteria, por lo tanto es una expresión fenotípica, y determina que una pequeña fracción de la población bacteriana entre en estado de “letargo” garantice la sobrevivencia y la preservación del genoma de la especie bacteriana. Las bacterias persistentes son refractarias a la actividad de los antibióticos, quienes por sus mecanismos de acción necesitan que la población bacteriana esté en estado de crecimiento logarítmico. Si bien muchas bacterias en estado de persistencia son morfológicamente indiferenciables de la población original, a veces pueden manifestar un comportamiento pleomórfico transitorio, dando lugar a formaciones filamentosas u otras asimilables a formas-L. En este ensayo se estudiaron los fenómenos de persistencia y de pleomorfismo de una autóctona de *E. coli*, enfrentada a dos tipos de condiciones medioambientales adversas: (a) concentraciones elevadas de enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) y (b) falta de nutrientes. Se utilizó una cepa autóctona de *E. coli* (09/684) aislada de materia fecal de un ternero con signos de gastroenteritis y que fue identificada por multiplex PCR para factores de virulencia. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se determinó por el método de macrodilución en tubo¹ en el intervalo de concentraciones de 0,0039 µg/mL y 1 µg/mL. Se realizaron curvas de crecimiento y de muerte bacteriana según método previamente descripto². Inóculos de densidad bacteriana estándar (0,5 x 10⁶ ufc/mL) se expusieron a concentraciones de EFX y CFX equivalentes a los siguientes múltiplos de CIM; 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, y 32. De los inóculos de cada curva de crecimiento y de los inóculos expuestos a cada concentración de EFX y 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. Las eficacias de EFX y CFX se evaluaron con tres criterios: efecto bacteriostático; sin modificación del log₁₀ del conteo bacteriano inicial (N₀) y efectos bactericida y de erradicación bacteriana; reducción de 3 log₁₀ (eficacia del 99,9%) y 4 log₁₀ (eficacia del 99,99) respecto del log₁₀ N₀ respectivamente. De las bacterias sobrevivientes tras 24 h de exposición a concentraciones suprainhibitorias de EFX y CFX se realizaron: (a) control de la morfología de las colonias, (b) control de morfología bacteriana por tinción de gram y estimación de la CIM; (c) ante cualquier alteración de la morfología, estas se recultivaron en agar Mc Conkey libre de antibiótico y luego se volvió a controlar su morfología y (d) se realizaron las pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *E. coli* como ser: (i) desarrollo en agar BTX, (ii) desarrollo en agar EMB, (iii) desarrollo en agar Mc Conkey y (iiii) las reacciones bioquímicas de TSI, SIM y agar Citrato. Para evaluar el efecto de la falta de nutrientes se sembró la cepa original por agotamiento una placa de agar Mc Conkey, y tras 24 h de incubación a 35 °C se seleccionó una colonia y de la misma se fueron tomando muestras semanales durante seis semanas. Durante ese período la placa se almacenó en heladera a 3 °C. A partir de las muestras obtenidas se realizaron: (a) control de la morfología, (b) realización de las pruebas bioquímicas citadas anteriormente, (c) cultivo de la muestra en nueva placa de agar, (d) nuevo control de la morfología y por último (e) confirmación de la identidad bacteriana con las pruebas bioquímicas citadas anteriormente. Los valores de CIM estimados fueron de 0,0312 y 0,0156

µg/ml para EFX y CFX respectivamente. En las curvas de muerte, la cinética de eliminación bacteriana fue bifásica: una fase de eliminación rápida (0-5 h) cuya velocidad bactericida fue dependiente de la concentración de los antibióticos y una fase de eliminación lenta (6-24 h) que fue similar para todas las concentraciones de EFX y CFX > 2 x CIM. Las colonias de las bacterias que sobrevivieron tras 24 h de exposición a elevadas concentraciones de EFX y CFX presentaron menor tamaño que las colonias de crecimiento control al mismo tiempo de muestreo. Las bacterias provenientes de estas colonias presentaron morfología filamentosas, y las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *E. coli* O9-684. Aun habiendo sobrevivido a concentraciones elevadas de EFX y CFX, estas bacterias presentaron para EFX y CFX el mismo valor de CIM que las bacterias del inóculo original. Estas bacterias luego de haber sido recultivadas en agar Mc Conkey volvieron a presentar su morfología normal de cocobacilo Gram negativo. En la curva de crecimiento de CFX se halló que las bacterias habían perdido su morfología de cocobacilo para adquirir una morfología esferoide. Aún siendo Gram (-), su tinción fue más pálida. Estas bacterias presentaron un perfil bioquímico compatible con *E. coli*, y luego de ser recultivadas volvieron a adquirir la morfología de cocobacilo Gram (-). Esta forma de pleomorfismo es compatible con las formas-L transitorias o esferoplastos. En las colonias de una misma placa de agar la morfología de *E. coli* a lo largo del tiempo fue evolucionando desde cocobacilo hasta la presencia de formas filamentosas. Esto puede explicarse como una respuesta adaptativa al envejecimiento y agotamiento del medio de cultivo. El pleomorfismo de las bacterias es una adaptación a condiciones desfavorables del medio ambiente que actúan como agentes disparadores para la expresión de genes ancestrales. Se acepta que la morfología cocobacilar o esferoide de las bacterias es producto de haber evolucionado a partir de formas primitivas de tipo bacilar o filamentosas. El retorno transitorio a una morfología ancestral implica el cambio de una flora planctónica a una flora sésil, que busca sedimentar y adherirse a superficies para evitar el efecto de “lavado” y sobre todo evadir “predadores naturales”. Una forma filamentosa presenta un tamaño entre 50 a 100 veces mayor al tamaño original de la bacteria. Esto determina que la actividad de los macrófagos se vea dificultada. La pared ausente o incompleta de las formas-L, le proporciona a la bacteria la capacidad de poder evadir al sistema inmune. El hallazgo de morfologías extrañas o aberrantes en los ensayos *in vitro* planteó algunos interrogantes: ¿Cuál es el disparador de una adaptación semejante? ¿Pueden estas morfologías interferir o dificultar el diagnóstico bacteriológico? En nuestro caso, pleomorfismo y persistencia de *E. coli* constituyen dos facetas de un mismo fenómeno; resistir a la erradicación bacteriana solo a causa de un agente antibiótico. Actualmente se acepta que más del 50% de las enfermedades crónicas o recidivantes de etiología bacteriana no se deben bacterias resistentes, sino a la presencia de bacterias persistentes. Es cierto que la población de bacterias persistentes es una ínfima fracción de la población infectiva (< 0,01%) y que esa pequeña cantidad de bacterias “debería” ser eliminada fácilmente por el sistema inmune. No obstante se acepta que enfermedades bacterianas de difícil resolución o reincidentes como las infecciones urinarias crónicas, o con septicemia, meningitis o endocarditis muchas veces tienen su base en formas persistentes de que internalizándose en lo profundo de los estratos tisulares, pueden permanecer viables y en estado de latencia hasta que el agente antibiótico desaparezca de la circulación general.

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- **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.
3. **Wiuiff 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.