

Actividad *in vitro* de enrofloxacin y ciprofloxacina sobre *Escherichia coli* ATCC 25922; ¿eficacia dependiente de la concentración o del tiempo de exposición?

Piani E.; Lindt C.; Aguirre S.; Ramírez E.; Presa Rossa C.; Russi N.; Formentini E.
Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL
elianajp84@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.

Enrofloxacin (EFX) y ciprofloxacina (CFX) son antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (FQs) que son ampliamente usados en Medicina Veterinaria. Como todas las FQs presentan gran actividad sobre *E. coli*. Estos antibióticos presentan actividad bactericida dependiente de la concentración y actúan sobre el ADN bacteriano uniéndose a algunas topoisomerasas impidiendo su acción y bloqueando la síntesis de éste.

En un ensayo previo de curva de muerte bacteriana (CMB) de EFX sobre *E. coli* ATCC 25922, se observó que la cinética de eliminación bacteriana presentó una fase de eliminación bacteriana rápida, cuya velocidad dependió de la concentración del antibiótico y una segunda fase donde la velocidad de eliminación fue menor y similar para todas las concentraciones de EFX mayores a su concentración inhibitoria mínima (CIM)³.

En este estudio se evaluó con ensayos de CMB la actividad bactericida de EFX y CFX sobre *E. coli*, y posteriormente mediante modelización se determinaron similitudes en la cinética de eliminación bacteriana de las concentraciones de EFX y CFX mayores a sus respectivos valores de CIM.

Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). Los valores de CIM de EFX y CFX se estimaron con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008)¹, y las CBM se realizaron según el procedimiento descrito por García Rodríguez y col., (2001)². Se evaluó la actividad antibacteriana de concentraciones de EFX y CFX equivalentes a 0,25-0,5-1-2-4-8 y 32 x CIM, se realizaron recuentos de bacterias viables a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h y éstos se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). El límite de detección de la técnica fue de 5 UFC/ml. La eficacia de EFX y CFX sobre *E. coli* ATCC 25922 fue evaluada a las 24 horas de exposición con tres criterios:

- Sin modificación del número de bacterias del conteo inicial (efecto bacteriostático).
- Reducción del 99,9% del número de bacterias respecto del conteo inicial (efecto bactericida).
- Reducción del 99,99% del número de bacterias respecto del conteo inicial (erradicación bacteriana).

Los valores de CIM para EFX y CFX fueron de 0,0312 µg/ml y 0,0156 µg/ml respectivamente. Las gráficas de las CMB mostraron que luego de 24 horas de exposición solo las concentraciones equivalentes a 2, 4, 8 y 32 x CIM lograron eficacias del 99,9% para EFX y 99,99% para CFX.

También se observó que entre las 2 h y las 3,5 h de exposición a EFX y CFX se produjo un quiebre en la cinética de eliminación bacteriana que coincide con un % de bacterias sobrevivientes de 0,57% y 1,73% en presencia de EFX y de 0,39% y 1,10% en presencia de CFX. Se determinó que un modelo de tres términos exponenciales era adecuado para ajustar en conjunto todos los datos experimentales de UFC/ml en función del tiempo de las concentraciones de EFX y CFX equivalentes a 2, 4, 8 y 32 x CIM. El modelo de ajuste utilizado se describe a continuación:

$$N = N_1 \cdot \exp[(k_a - k_{b1}) \cdot t] + N_2 \cdot \exp[(k_a - k_{b2}) \cdot t] + N_3 \cdot \exp[(k_a - k_{b3}) \cdot t]$$

Donde N es el número de bacterias viables (UFC/ml), N_1 , N_2 y N_3 son subpoblaciones bacterianas, exp es el exponente de los logaritmos naturales, k_{b1} , k_{b2} y k_{b3} son las constantes de primer orden aparente de muerte bacteriana expresadas como la recíproca del tiempo (h^{-1}), k_a (h^{-1}) es la constante de crecimiento de *E. coli* en ausencia de antibiótico estimada en un estudio previo ($1,44 h^{-1}$) y t es el

tiempo. El ajuste se realizó por regresión no lineal ponderada de mínimos cuadrados con el software de regresión no lineal ADAPT II (BMSR, University of Southern California, USA). En todos los casos el esquema de ponderación utilizado fue $1/y$. Los resultados del ajuste de los datos experimentales se presentan en la figura 1.

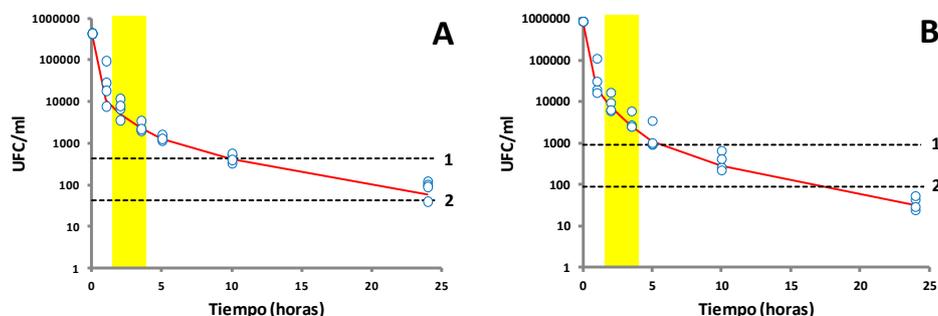


Figura 1: Ajuste de los datos experimentales de UFC/ml de *E. coli* ATCC 25922 obtenidos tras la exposición durante 24 h a concentraciones equivalentes a 2, 4, 8 y 32 x CIM para EFX (A) y CFX (B), 1 y 2 indican una reducción del 99,9% y 99,99% del conteo bacteriano inicial. Las barras amarillas indican el intervalo de tiempo (2h.-2,3h.) donde se produce el quiebre de la cinética de eliminación bacteriana.

El ajuste de los datos experimentales mostró que las cuatro concentraciones de EFX y CFX presentaron una cinética de eliminación bacteriana similar. Las tres subpoblaciones bacterianas (N_1 , N_2 y N_3) de *E. coli* en presencia de EFX presentaron valores de k_{b1} , k_{b2} y k_{b3} similares a los estimados para las tres subpoblaciones bacterianas (N_1 , N_2 y N_3) de *E. coli* en presencia de CFX (tabla 1).

Tabla 1: Subpoblaciones de bacterias (% del inóculo inicial) y los valores de sus respectivas constantes de muerte bacteriana para EFX y CFX.

Subpoblación	EFX	CFX	Valor de K	EFX	CFX
N_1 (%)	96,0	97,7	k_1 (h^{-1})	6,96	6,04
N_2 (%)	3,63	2,17	k_2 (h^{-1})	2,14	2,32
N_3 (%)	0,37	0,095	k_3 (h^{-1})	1,58	1,66

La inhibición de la actividad de las topoisomerasas (ADN-girasa y topoisomerasa IV) que impiden la replicación del ADN bacteriano hace pensar más en un mecanismo de acción bacteriostático y no puede explicar la actividad concentración dependiente de las FQs. Algunos autores afirman que las FQs fragmentarían el ADN y liberarían radicales oxígeno que producirían la lisis de las bacterias. Este estudio muestra que la actividad bactericida dependiente de la concentración no es determinante de la eficacia de EFX y CFX, ya que a partir de un número de bacterias sobrevivientes solamente una actividad dependiente del tiempo de exposición (24 h) es lo que garantiza la eficacia del 99,9% para EFX y de 99,99% para CFX. Posteriores estudios serán necesarios para comprender la causa de por qué un determinado número de bacterias se hacen refractarias a la actividad bactericida dependiente de la concentración de estos agentes.

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.; R. Cantón; J.E. García Sánchez; M.L. Gómez-Luis; L. Martínez Martínez; C. Rodríguez-Avial & J. Vila. (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- Rebelindo M.; Lapolla L.; Cusit C.; Aguirre S.; Lindt C.; Ramirez E.; Piani E.; Russi N.; Formentini, E. (2014) "Enrofloxacin; ¿una quinolona con actividad antibacteriana concentración dependiente o mixta?". II Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Esperanza, Argentina, 29 de octubre de 2014.