

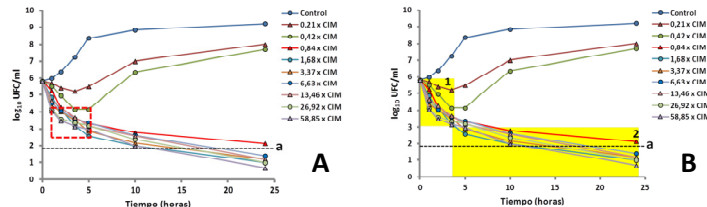
## Determinación de la ventana de resistencia fenotípica de *Escherichia coli* tras su exposición *in vitro* a enrofloxacin y ciprofloxacina

Ramírez, E.; Presa Rossa, C.; Patricelli, P.; Dell'Elce, A.; Baroni, E.; Formentini, E.  
Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL  
[egram88@gmail.com](mailto:egram88@gmail.com)

“Actividad antibacteriana *in vitro* de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*; influencia del pH, tamaño del inoculo 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.

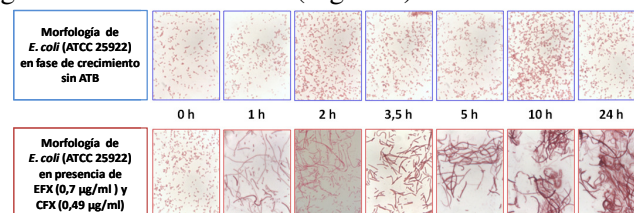
Cuando una población bacteriana en fase de crecimiento es expuesta a concentraciones bactericidas de antibióticos, la velocidad de muerte bacteriana decrece rápidamente con el tiempo de exposición transcurrido y una fracción importante de la población inicial de bacterias sobrevive tras 24 h de exposición y pueden inclusive reiniciar su fase de crecimiento. Los antibióticos son más eficaces cuando la población bacteriana se encuentra en fase de crecimiento que cuando se halla detenido o en fase estacionaria. Una población bacteriana puede ser homogénea en su genotipo pero heterogénea en su fisiología en lo que respecta a su metabolismo y/o velocidad de crecimiento. Subpoblaciones bacterianas con lento crecimiento pueden ser refractarias a la actividad de los antibióticos, fenómeno se conoce como resistencia fenotípica<sup>3</sup>. La exposición a un antibiótico ejercería presión de selección favoreciendo la supervivencia de bacterias fenotípicamente tolerantes. Sin embargo no disponemos de datos concretos acerca de las concentraciones de antibióticos y del tiempo de exposición antibiótica que favorecen la selección de subpoblaciones bacterianas fenotípicamente resistentes. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante un ensayo de curva de muerte bacteriana (CMB) las concentraciones mixtas de enrofloxacin y ciprofloxacina (EFX+CFX) y el tiempo de exposición a estos antibióticos que favorecen la selección de subpoblaciones bacterianas fenotípicamente resistentes de *Escherichia coli* ATCC 25922. Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se estimó previamente con el método de macrodilución en tubo<sup>1</sup>, siendo de 0,0312 µg/ml para EFX y de 0,0156 µg/ml para CFX. La CMB se realizó según técnica<sup>2</sup>. Se utilizaron concentraciones de EFX+CFX con una relación (CFX/EFX) de aproximadamente 0,7, similar a la que se halla en plasma de un bovino luego de la administración parenteral de EFX a una dosis terapéutica de 5 mg/kg. Las concentraciones finales de EFX+CFX se expresaron como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico [ $(\mu\text{g}/\text{mL}_{\text{EFX}}/\text{CIM}_{\text{EFX}}) + (\mu\text{g}/\text{mL}_{\text{CFX}}/\text{CIM}_{\text{CFX}})$ ], siendo estas de 0,21, 0,42, 0,84, 1,68, 3,37, 6,73, 13,46, 29,92 y 53,85 x CIM. Los recuentos de bacterias viables se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Se realizaron los siguientes procedimientos: a-Determinación del área en la cual se produce el quiebre de la cinética de eliminación bacteriana; b-Determinación del intervalo de valores de bacterias viables y del tiempo de exposición de EFX y CFX donde estos presentaron actividad bactericida concentración dependiente; c-Determinación del intervalo de valores de bacterias viables y del tiempo de exposición de EFX y CFX donde estos presentaron actividad tiempo dependiente; d Control de la morfología bacteriana a las 24 h en la curva de crecimiento control y en todas las concentraciones de EFX+CFX; e -Control de la morfología bacteriana en todos los tiempos de muestreo en la curva de crecimiento control y en los siguientes valores de la sumatoria de CIM parciales de cada antibiótico; 0,42 x CIM, 6,63 x CIM y 58,85 x CIM. La CMB permitió mostrar dos fases: (a) fase bactericida rápida donde la velocidad de eliminación bacteriana fue proporcional a la concentración de los antibióticos y (b) fase bactericida lenta, donde la velocidad de eliminación bacteriana fue similar e independiente de la concentración de los antibióticos. El área donde se produce el quiebre de la cinética bactericida fue delimitada por: (a) entre 1 y 5 h de inicio del ensayo y (b) entre 17783 UFC/ml y 398 UFC/ml. La actividad concentración dependiente de EFX+CFX fue delimitada entre 1 y 3 h y los valores de 670670 y 2661 UFC/ml. La actividad tiempo dependiente de EFX+CFX fue delimitada entre las 3 y 24 h y entre 2661 y 1

UFC/ml. La CMB de *E. coli* ATCC 25922 expuesta a concentraciones de EFX+CFX y mostrando el detalle del área donde se produce el quiebre de la cinética bactericida y las áreas de actividad concentración y tiempo dependiente se presentan en la figura 1.



**Figura 1.** (A) Curva de muerte bacteriana de *E. coli* ATCC 25922 expuesta a concentraciones constantes de EFX+CFX. El recuadro con líneas de puntos representa el área teórica donde se produce el quiebre de la cinética de eliminación bacteriana. (B) En la misma gráfica el cuadrante superior izquierdo (1) delimita el área donde la cinética de eliminación bacteriana es concentración dependiente, y el cuadrante inferior derecho (2) delimita el área donde la cinética de eliminación bacteriana se torna dependiente del tiempo de exposición a los antibióticos.

La exposición de *E. coli* ATCC 25922 a elevadas concentraciones de EFX+CFX dio lugar a que esta modificara su morfología bacilar a filamentosa (Figura 2).



**Figura 2.** Morfología de *E. coli* ATCC 25922 (A) Morfología bacilar durante una curva de crecimiento control y (B) Morfología filamentosa durante una curva de muerte bacteriana tras la exposición a concentraciones mixtas de EFX (0,70 µg/ml) y CFX (0,49 µg/ml) equivalentes a una actividad de 53,85 x CIM.

El quiebre de la cinética bactericida de concentración dependiente a tiempo dependiente de EFX+CFX se debe a la selección de una subpoblación bacteriana persistente con capacidad de modificar su morfología bacilar a filamentosa. Este fenómeno es una forma de resistencia no heredable y reversible. Una de sus características es la detener o enlentecer su crecimiento. Esta modificación de la fisiología sería responsable de una menor velocidad de replicación del genoma y limitaría la actividad de EFX+CFX, las que actúan inhibiendo la replicación de este. Proponemos que el área teórica donde se produce el quiebre de la cinética bactericida delimitada por dos dimensiones a)- el intervalo de tiempo comprendido entre la primera hora y las 5 horas de inicio del ensayo y b)- el intervalo de bacterias viables comprendido entre 17783 UFC/ml y 398 UFC/ml constituye un indicador de la cinética de la actividad bactericida de un antibiótico al que denominamos “ventana de selección de resistencia fenotípica”. Esta ventana identifica el área bidimensional teórica donde hay mayor probabilidad de que ocurra la selección de subpoblaciones fenotípicamente resistentes capaces de modificar la velocidad bactericida de EFX y CFX.

## 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- Wiuff 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.