

Pleomorfismo de *Escherichia coli* en presencia de 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

“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 presentan gran actividad sobre *E. coli*. Tras la administración parenteral de EFX a bovinos a una dosis de 5 mg/kg esta es transformada parcialmente a CFX en hígado en glándula mamaria y en macrófagos, siendo la relación entre las concentraciones plasmáticas de CFX y EFX (CFX/EFX) de aproximadamente 0,7. La exposición bacteriana a elevadas concentraciones de antibióticos puede seleccionar subpoblaciones bacterianas refractarias a la acción de estos, sea por selección de cepas resistentes o por selección de cepas con menor velocidad de crecimiento, fenómeno que se conoce como resistencia fenotípica⁴. El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* cambios de sensibilidad antibiótica y cambios fenotípicos (morfología, velocidad de crecimiento) de *E. coli* ATCC 25922 luego de 24 h de exposición a una concentración mixta de EFX: 0,7 µg/ml y CFX: 0,49 µg/ml (EFX+CFX) simulando las máximas concentraciones que se hallarían en plasma de un bovino luego de la administración una dosis terapéutica de 5 mg/kg de EFX. Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX. Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se estimaron previamente con el método de macrodilución en tubo², siendo de 0,0312 µg/ml para EFX y de 0,0156 µg/ml para CFX. De un cultivo *E. coli* ATCC 25922 no expuesto a los antibióticos se seleccionó una colonia que fue considerada como control. Paralelamente un inóculo de *E. coli* ATCC 25922 con una turbidez equivalente al valor de 0,5 de la escala McFarland fue expuesto una concentración EFX+CFX e incubado a 35°C durante 24 h, realizándose recuentos de bacterias viables a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h, los que se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Mediante regresión lineal de los valores de lnUFC/ml de la fase terminal de eliminación bacteriana se estimó la ordenada en el origen, la constante de eliminación bacteriana (k_{el}) y la correspondiente semivida de eliminación bacteriana ($t_{1/2_{el}}$) estimada como $\ln 2/k_{el}$. De la colonia control y de las colonias sobrevivientes a las a las 24 h se tomaron muestras con las que se realizaron tres procedimientos: El primer procedimiento consistió en tres pasos: (a) confirmar la presencia de *E. coli* ATCC 25922 por inspección de la morfología (tinción de Gram), (b) determinación de la CIM y (c) realización de las siguientes pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias (E.M.B agar, T.S.I agar, SIM medio y Agar citrato). El segundo procedimiento consistió en realizar curvas de crecimiento bacteriano (CCB) a partir de muestras procedentes de la colonia control y con tres colonias sobrevivientes a las 24 h. Las CCB se realizaron según técnica³. Los recuentos de bacterias viables se realizaron a las 0-1-2-3,5-5-10 y 24 h y éstos se expresaron como UFC/ml. La magnitud de la masa bacteriana desarrollada en cada CCB se estimó por integración de los valores de UFC/ml en función del tiempo mediante el método trapezoidal y los valores de las integrales se expresaron como (UFC/ml).h.ml⁻¹. El desarrollo de las poblaciones bacterianas se expresó como porcentaje de la masa bacteriana obtenida en las CCB de las bacterias previamente expuestas durante 24 h, tomando como referencia la integral de la CCB control. El tercer procedimiento consistió en repicar esas colonias en placa de agar Muller Hinton, dejándolas crecer durante 24 h a 35°C y chequeando nuevamente su morfología. Al inicio del ensayo el inóculo expuesto a EFX y CFX presentó un conteo bacteriano de 670000 UFC/ml. La cinética de eliminación bacteriana fue bifásica; una fase bactericida rápida seguida de una fase de eliminación bacteriana lenta. El valor de k_{el} fue de 0,28 h⁻¹ con un valor de $t_{1/2_{el}}$ de 2,42 h. La ordenada en el origen (3646 UFC/ml) se interpretó como la subpoblación bacteriana (0,54% del conteo inicial) que dio origen a la fase terminal de eliminación. A las 24 h de exposición, las bacterias sobrevivientes originaron 5 colonias. Estas presentaron menor tamaño que las observadas

en la cepa control. Las bacterias procedentes de las colonias sobrevivientes presentaron coloración Gram (-) y morfología filamentosas. Las pruebas bioquímicas confirmaron que las formas filamentosas pertenecían a una subpoblación de *E. coli* ATCC 25922. Los valores de CIM de EFX y CFX de las bacterias que sobrevivieron a la exposición de EFX 0,7 µg/ml (22,44 x CIM) y CFX; 0,49 µg/ml (31,44 x CIM) durante 24 h (formas filamentosas) no presentaron diferencias respecto de los valores obtenidos en la cepa control. Luego de repicar las colonias sobrevivientes (formas filamentosas) en placa de agar Muller Hinton, al cabo de 24 h las colonias volvieron a presentar su morfología y coloración típica de bacilo Gram (-). Los resultados de las CCB realizadas con las bacterias sobrevivientes mostraron que tras 24 h de incubación, la masa bacteriana de estas expresada como (UFC/ml).h.ml⁻¹ fue menor respecto del desarrollo bacteriano de la cepa control. La cinética bifásica de eliminación bacteriana mostró un cambio en la actividad de los agentes antimicrobianos. La fase de eliminación bacteriana lenta mostró que a pesar de que actualmente se asume que la eficacia EFX y CFX es dependiente de sus concentraciones, la elevada concentración mixta de EFX y CFX no fue suficiente para eliminar las bacterias en su totalidad tras 24 h de exposición, ya que estas no modificaron su sensibilidad antibiótica, lo que descarta la selección de alguna subpoblación resistente. La inspección por microscopia, mostró que tras 24 h de exposición antibiótica, los bacilos Gram (-) modificaron su morfología a filamentosos sicitiales Gram (-). Según la literatura, las formas bacterianas filamentosas se originan por disminución o detención de la fisión celular, aunque continúan creciendo¹. Este fenómeno de pleomorfismo es inducido *in vitro* e *in vivo* como una respuesta para sobrevivir a condiciones ambientales adversas como ser: presencia de concentraciones de antibióticos, reducción de nutrientes (stress nutricional) y presencia de predadores como otras bacterias y/o macrófagos¹. La morfología de filamentosos sicitiales se revirtió a la forma bacilar una vez que las condiciones medioambientales volvieron a ser favorables. La menor actividad de EFX y CFX que se expresó por una menor velocidad de muerte bacteriana puede ser explicada por la menor velocidad de crecimiento de estas bacterias, ya que si consideramos que las FQs actúan impidiendo la replicación del DNA, entonces una detención o retraso en la velocidad de crecimiento bacteriano afectaría negativamente la actividad bactericida de estas, determinando una resistencia de tipo fenotípica. Esta plasticidad morfológica se produce por supresión de la división celular *in vitro* e *in vivo*, y es una respuesta adaptativa para sobrevivir entre otras cosas a la actividad de los antibióticos. Esta situación podría ocurrir durante el tratamiento de una infección, sin embargo no es tenida en cuenta a la hora de diseñar regímenes posológicos. Los resultados generan algunos interrogantes respecto de la actividad *in vivo* de las FQs que abren nuevas líneas de investigación para el futuro: ¿Las formas filamentosas de *E. coli* son más resistentes a la acción del sistema inmune?; ¿La resistencia fenotípica de *E. coli* puede reducir la eficacia de un antimicrobiano?; ¿En ese caso, la resistencia fenotípica puede modificar la actividad de EFX y CFX de concentración dependiente a tiempo dependiente?

Bibliografía

- 1-Claessen D., Rozen D.E., Kuipers O.P., Sogaard-Andersen L. & van Wezel G.P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews, Microbiology*, 12, 115-124.
- 2- 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.
- 3- 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.
4. 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.