

El uso de modelos formales para evaluar la actividad *in vitro* de marbofloxacina sobre una cepa autóctona de *Escherichia coli*

Weidmann C.¹⁻²; Aguirre M.S.¹; Patricelli P.¹; Dell'Elce A.¹; Rubio M.³; Cadoche L.²; Formentini E.¹

¹Laboratorio de Farmacología y Toxicología, FCV-UNL

²Cátedra de Matemática, FCV-UNL

³Cátedra de Semiología, FCV-UNL

caroweidmann88@gmail.com

Si bien desde sus orígenes la biología se caracterizó por ser una ciencia descriptiva, la meta de la ciencia actual es crear modelos teóricos que permitan describir, explicar y predecir el funcionamiento de los sistemas biológicos. A veces no es posible reiterar un experimento tantas veces como se desea, o por cuestiones éticas, estos no pueden realizarse en el escenario donde ocurren, como por ejemplo en individuos vivos. Esto lleva a reemplazar el sistema real por uno simulado o modelo.

Un modelo es una representación simplificada de una realidad compleja, donde se evalúa la interacción de un limitado número de factores o componentes que se seleccionan en términos de utilidad. El modelo busca el análisis y la comprensión mecanicista de lo general, por lo cual, se dejan de lado los aspectos particulares que nada aportan a la comprensión general del fenómeno en estudio.

Para la evaluación de la actividad de un antibiótico se recurre a modelos físicos con los que se simula la situación real. En este modelo físico se reemplaza al animal por un tubo de ensayo donde en condiciones controladas se evalúa la interacción entre antibiótico y bacterias.

La limitante de los modelos físicos como el método de macrodilución en tubo para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) o la evaluación de la cinética bactericida de concentraciones fijas de un antibiótico (CuMB), es que sus resultados son meramente descriptivos y hay mucha información que se pierde. Por el contrario, el análisis con modelos formales (matemáticos) de los resultados obtenidos con los modelos físicos permite (i) entender la interacción entre las distintas variables en estudio (concentración de antibiótico, bacteria, temperatura, pH), (ii) describir la respuesta del sistema en términos de causa y efecto (concentración de antibiótico vs. eliminación de bacterias) y (iii) predecir la respuesta del sistema en función de variaciones en la magnitud de las causas).

En este estudio se evaluó la actividad de marbofloxacina (MFX) sobre una cepa autóctona de *Escherichia coli* mediante un ensayo de CuMB y los resultados se analizaron con modelos matemáticos adecuados. Se utilizó una cepa autóctona de *Escherichia coli* (*E. coli* 09-684) y un estándar de MFX de pureza conocida. La CIM se determinó por la técnica de macrodilución en tubo¹ y la CuMB se realizó según técnica reportada previamente².

La eficacia de MFX sobre *E. coli* 09-684 fue evaluada con tres criterios: (i) efecto bacteriostático (equivalente a la CIM) en el que no se observó modificación del log del número inicial de bacterias (N_0), (ii) efecto bactericida (relacionado con la remisión clínica) en el que se observó una reducción ≥ 3 log respecto del log N_0 y (iii) efecto de erradicación bacteriana (relacionado con la cura bacteriológica) en el que se observó una reducción ≥ 4 log respecto del log N_0 .

Las cinéticas de eliminación bacteriana obtenidas para cada concentración testada de MFX fueron ajustadas por regresión no lineal ponderada con el modelo de Gompertz con el que se estimaron las constantes de muerte bacteriana (k_b) y el log del conteo bacteriano esperado (N_{ss}) para cada concentración de MFX.

La relación entre concentración de MFX y efecto bactericida fue ajustada con el modelo sigmoideo de respuesta máxima o de Hill. Los valores estimados de concentración de MFX para obtener los efectos bacteriostático, bactericida y de erradicación bacteriana, fueron estimados por una ecuación derivada del modelo de Hill. La CIM estimada de MFX sobre *E. coli* 09-684 fue de 0,0312 $\mu\text{g/mL}$. Los parámetros

estimados con el modelo sigmoideo o de Hill por ajuste de los valores de k_b y N_{ss} calculados por el modelo de Gompertz en función de las concentraciones de MFX, se presentan en la tabla 1.

Parámetros estimados con el modelo de Hill			
k_{b0} (h^{-1})	0,001	N_{ss0} (log UFC/mL)	0,001
$k_{b(max)}$ (h^{-1})	2,149	$N_{ss(max)}$ (log UFC/mL)	8,296
C_{50} ($\mu g/mL$)	0,022	C_{50} ($\mu g/mL$)	0,017
N	1,14	N	2,42

Tabla 1. Parámetros estimados con el modelo de Hill, donde k_{b0} y N_{ss0} son la constante de muerte bacteriana y el log de la máxima concentración bacteriana a tiempo cero respectivamente; $k_{b(max)}$ y $N_{ss(max)}$ son los máximos valores esperados de la constante de muerte bacteriana y del log del conteo bacteriano esperado; C_{50} es la concentración de MFX que produce el 50% de los efectos máximos y N es el coeficiente de sigmoidicidad o de Hill.

Los parámetros estimados por el ajuste de los valores observados de reducción log de N_0 en función de las concentraciones de MFX y los valores de concentraciones de MFX para obtener la actividad bacteriostática (CIM), bactericida (CBM) y la erradicación bacteriana (CeBM) se presentan en la Tabla 2.

Parámetros estimados con el modelo de Hill			
N_0 (log UFC/mL)	3,849	CIM ($\mu g/mL$)	0,01649
E_{max} (-log UFC/mL)	-8,937	CBM ($\mu g/mL$)	0,02883
C_{50} ($\mu g/mL$)	0,0183	CeBM ($\mu g/mL$)	0,03892
N	2,627		

Tabla 2. Parámetros estimados con el modelo de Hill. N_0 y E_{max} son el log del conteo bacteriano inicial y la reducción del log de este respectivamente; C_{50} es la concentración de MFX que produce el 50% del efecto máximo; N es el coeficiente de Hill; CIM, CBM y CeBM son las concentraciones inhibitorias mínimas, bactericida mínima y de erradicación bacteriana mínimas estimadas con el modelo de Hill.

La utilización de un modelo formal como el modelo de Gompertz, permitió estimar parámetros para describir la eficacia antibacteriana de MFX sobre la cepa autóctona de *E. coli* 09-684. En este sentido, se halló que los valores de las constantes de velocidad de muerte bacteriana (k_b) se incrementaron de forma proporcional al incremento de las concentraciones de MFX, corroborando la actividad concentración dependiente de este antibiótico. Sin embargo, el valor del coeficiente de Hill (N), con un valor de 2,627, mostró una actividad de tipo “todo o nada” en la relación entre “concentración-eficacia” de MFX, ya que a partir de un pequeño incremento en las concentraciones de MFX se pasó de una actividad antibacteriana casi nula a la máxima eficacia antibacteriana.

Esto puede ser explicado porque aunque la velocidad de muerte inicial se incremente en forma directa a las concentraciones de MFX, la selección de una subpoblación de bacterias persistentes y su lenta eliminación, determinaría que el perfil de eliminación bacteriana para todas las concentraciones de MFX \geq a 1 x CIM fuese bifásico. En la primera fase predominaría una rápida disminución del conteo bacteriano, donde la velocidad de eliminación sería proporcional a la concentración de MFX. La segunda fase, se originaría por la sobrevida de una subpoblación de bacterias persistentes, que presentan una velocidad de eliminación lenta que es independiente de la magnitud de las concentraciones de MFX \geq a 1 x CIM, dando lugar a que todas estas presenten al final del ensayo (24 h) una eficacia similar. En este sentido, el modelo de Gompertz, permitió describir adecuadamente la cinética de eliminación bifásica de *E. coli* 09-684.

En este estudio mostramos que el análisis de los sistemas biológicos mediante la utilización de modelos formales, permite obtener mayor información que la simple recolección de datos a partir de la observación de los resultados de un ensayo *in vitro*.

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.