

## PERSISTENCIA DE *Escherichia coli* Y MODIFICACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE ENROFLOXACINA Y CIPROFLOXACINA

Eliana Ramirez, Candela Presa Rossa

Laboratorio de Farmacología y Toxicología - Facultad de Ciencias Veterinarias UNL

**Área:** Ciencias de la salud

**Sub-Área:** Veterinaria

**Grupo:** X

**Palabras clave:** Fluoroquinolonas, *Escherichia coli*, Persistencia

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden protegerse a sí mismas de varios tipos de estrés ambiental mediante la supresión de su crecimiento. Estas bacterias son transitoriamente refractarias a la actividad de los antibióticos y se las denomina persistentes (Wiuff et al., 2005). Una población bacteriana enfrentada a un antibiótico muestra una eliminación bifásica, donde la mayoría es rápidamente eliminada y una pequeña fracción de persistentes es eliminada lentamente y sobrevive. Enrofloxacin (EFX) es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas (FQs). Tras su administración parenteral a bovinos este es transformado parcialmente a ciprofloxacina (CFX). Estos antibióticos son eficaces sobre *E. coli*. Las FQs presentan actividad "concentración dependiente". Sin embargo 24 horas de exposición a elevadas concentraciones de EFX y CFX no son eficaces para erradicar la subpoblación de persistentes de *E. coli*.

### OBJETIVOS

Los objetivos fueron: (i) evaluar la actividad antibacteriana de concentraciones combinadas de EFX y CFX (70:30) frente a *E. coli*, en presencia de suero bovino (SB) mediante ensayos de curva de muerte bacteriana (CMB), (ii) evaluar el efecto de las cepas persistentes de *E. coli* sobre la cinética de eliminación bacteriana, y (iii) realizar una integración farmacocinética/farmacodinámica (PK-PD) entre las concentraciones combinadas de EFX y CFX (EFX+CFX) obtenidas tras la administración a bovinos de 5 mg/kg de EFX y la cinética de eliminación bacteriana observada *in vitro*.

### METODOLOGÍA

Se utilizó una cepa estandarizada de *E. coli* ATCC 25922 y estándares de EFX y CFX de pureza conocida (Sigma-Aldrich® Argentina). La concentración inhibitoria mínima (CIM) de EFX y CFX se estimó con el método de macrodilución en tubo (CLSI, 2008). La CMB se realizó en caldo Muller Hinton y SB (MH-SB) en proporción 50:50. Un inóculo de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) fue expuesto a concentraciones de EFX+CFX. La relación CFX/EFX fue de 0,7 similar a la observada en plasma bovino luego de la administración de EFX a una dosis de 5 mg/kg de EFX. Las concentraciones finales de EFX+CFX se expresaron como actividad antibacteriana mediante la suma de los múltiplos de CIM de cada concentración de EFX y CFX respectivamente. (Tabla 1). 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 eficacia de EFX+CFX se evaluó con tres criterios: efecto bacteriostático; sin modificación del  $\log_{10}$  del conteo bacteriano inicial ( $N_0$ ) y efectos bactericida y de erradicación bacteriana; reducción de 3  $\log_{10}$  (eficacia del 99,9%) y 4  $\log_{10}$  (eficacia del 99,99) respecto del  $\log_{10}$  de  $N_0$  respectivamente.

Proyecto: Proyecto n° 501 201101 00068 LI CAI+D 2011: "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"

Director del proyecto: Dr. Enrique A. Formentini

Director del becario/tesista: Dr. Enrique A. Formentini

**Tabla 1:** Concentraciones mixtas de EFX y CFX donde la relación CFX/EFX es 0,7. La concentración de cada antibiótico se expresa en referencia a su valor estimado de la CIM. Por último, las concentraciones finales de EFX y CFX se expresan como la sumatoria de los valores de CIM parciales de cada antibiótico.

Dilución	EFX (µg/ml)	EFX (x CIM)	CFX (µg/ml)	CFX (x CIM)	Suma (x CIM)
1	0,0025	0,09	0,002	0,12	0,21
2	0,005	0,18	0,004	0,25	0,42
3	0,011	0,35	0,008	0,49	0,84
4	0,022	0,70	0,015	0,98	1,68
5	0,044	1,40	0,031	1,96	3,37
6	0,088	2,80	0,061	3,93	6,73
7	0,175	5,61	0,123	7,85	13,46
8	0,35	11,22	0,245	15,71	29,92
9	0,70	22,44	0,49	31,41	53,85

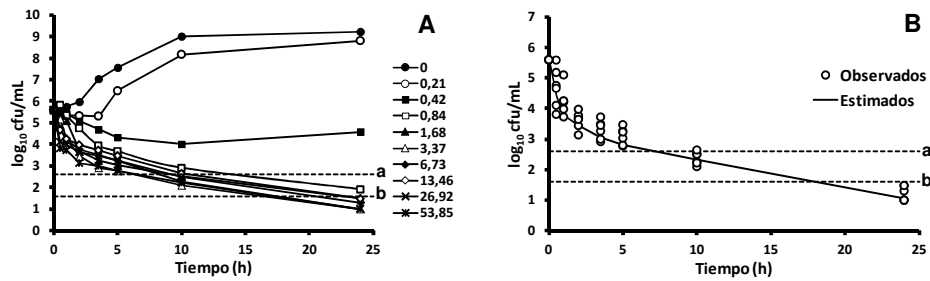
A partir de los datos experimentales se realizaron los siguientes procedimientos:

- a- Identificación de las concentraciones de EFX+CFX capaces de obtener la erradicación bacteriana.
- b- Determinación de la CIM de EFX y CFX de las bacterias sobrevivientes luego de una exposición de 24 h a estos antibióticos.
- c- Ajuste simultáneo con un modelo multiexponencial de los perfiles de eliminación bacteriana de todas las concentraciones de EFX+CFX que lograron la erradicación bacteriana y estimación del perfil teórico de eliminación bacteriana.
- d- Ajuste de los datos de UFC/ml obtenidos con cada concentración de EFX+CFX tras 24 h de exposición con un modelo sigmoideo de respuesta máxima y cálculo de la concentración teórica de EFX-CFX capaz de lograr la erradicación bacteriana.
- e- Simulación de los perfiles farmacocinéticos de EFX y CFX a partir de datos reportados en la literatura (Lucas et al., 2008), expresando sus concentraciones como (µg/ml/CIM) de EFX+CFX.
- f- Integración PK-PD del perfil de la sumatoria de múltiplos de CIM de EFX+CFX y el perfil estimado de cinética de eliminación bacteriana observado *in vitro*.

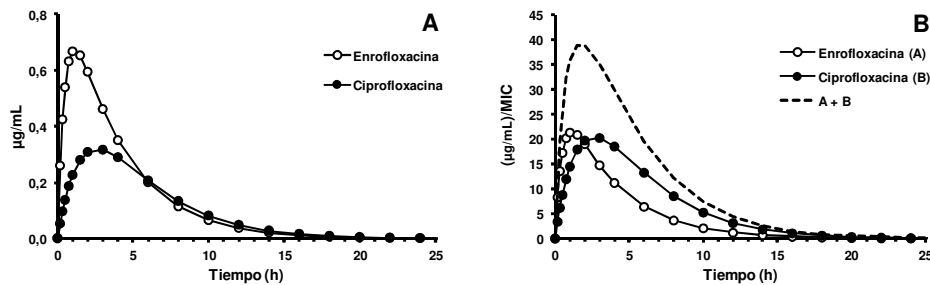
## RESULTADOS

Los valores de CIM fueron 0,0312 µg/ml para EFX y 0,0156 µg/ml para CFX. Las CMB de EFX-CFX sobre *E. coli* en MH-SB se presentan en la figura 1A. La cinética de eliminación bacteriana presentó dos fases: en la primera fase (0-5 h) la velocidad de eliminación bacteriana fue rápida y se incrementó en forma proporcional a la concentración de EFX+CFX, y en la segunda fase (5-24 h), la velocidad disminuyó y fue similar para todas las concentraciones de EFX+CFX  $\geq$  a 1,68 x CIM. Las bacterias sobrevivientes a estas concentraciones presentaron idénticos valores de CIM que las bacterias del inóculo inicial. El ajuste simultáneo de los perfiles de eliminación bacteriana en función del tiempo obtenidos con concentraciones  $\geq$  a 1,68 x CIM de EFX+CFX se presentan en la figura 1B. La suma de múltiplos de CIM de EFX+CFX capaz de producir erradicación bacteriana fue estimada en 0,877 x CIM. Los perfiles de concentración plasmática de EFX y CFX en bovinos que recibieron una dosis de 5 mg/kg de EFX se presentan en la figura 2A y en figura 2B estos valores se presentan expresados como múltiplos de la CIM de cada antibiótico. La integración PK-PD entre el perfil de actividad antibacteriana de EFX+CFX obtenido *in vivo* y la simulación de la cinética de eliminación bacteriana observada *in vitro* se presentan en la figura 3. En esta figura se distingue un área por encima de 0,877 x CIM de EFX+CFX, en la cual todas las concentraciones son capaces de lograr la erradicación bacteriana ( $-4 \log_{10}$ ), la que fue denominada Área de Concentración Efectiva (ACE) y se extendió hasta las 18 h post administración. La integración PK-PD mostró que 18 h de exposición fueron suficientes para lograr una reducción significativa del número de bacterias persistentes. La inspección

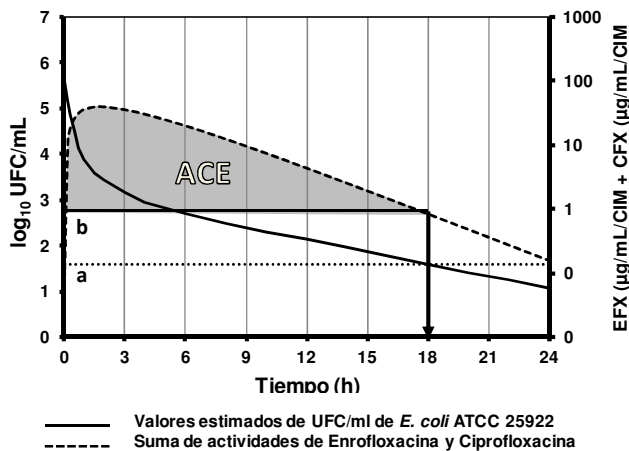
visual de los dos perfiles superpuestos permite inferir que si bien EFX y CFX son antibióticos con actividad bactericida dependiente de la concentración, el tiempo de exposición fue el determinante de la reducción de bacterias viables.



**Figura 1.** (A) Evolución temporal de un inóculo de *E. coli* expuesto a concentraciones mixtas de enrofloxacin y ciprofloxacina. Las concentraciones están expresadas como la suma de los múltiplos de CIM de cada antibiótico. (B) Ajuste simultáneo de todos los perfiles de eliminación bacteriana (UFC/ml) en función del tiempo que lograron la erradicación bacteriana, con un modelo de tres términos exponenciales, **a** y **b** son los puntos de corte de actividad bactericida y de erradicación bacteriana respectivamente.



**Figura 2.** (A) Simulación de perfiles de concentración plasmática de enrofloxacin y ciprofloxacina obtenidos tras la administración a un bovino de una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacin. (B) Los mismos perfiles expresados como múltiplos de la CIM de cada antibiótico y como la sumatoria de los múltiplos de CIM de ambos.



**Figura 3.** Integración farmacocinética/farmacodinámica entre la actividad de enrofloxacin y ciprofloxacina sobre *E. coli*. El perfil de concentración de los antibióticos se expresa como la suma de los múltiplos de CIM de cada concentración de ellos obtenidas tras la administración de enrofloxacin a un bovino a la dosis de 5 mg/kg. La curva teórica de eliminación bacteriana fue estimada por ajuste simultáneo de los perfiles de eliminación bacteriana obtenidos con todas las concentraciones mixtas de enrofloxacin y ciprofloxacina capaces de lograr la reducción de bacterias persistentes por debajo del límite teórico de erradicación bacteriana.

La línea de puntos (**a**) indica el punto de corte de erradicación bacteriana ( $-4 \log_{10}$ ); **ACE** (área de concentraciones efectivas) es el área donde las concentraciones mixtas de enrofloxacin y ciprofloxacina son capaces de lograr la erradicación bacteriana; la línea llena (**b**) y la flecha indican la suma de los múltiplos de CIM de enrofloxacin y ciprofloxacina que logran la erradicación bacteriana (0,877 x CIM) y el tiempo teórico al cual se lograría la misma (18 h).

## CONCLUSIONES

Las bacterias ante la presencia de factores medioambientales adversos como por ejemplo los antibióticos, pueden modificar su fisiología reduciendo su velocidad de crecimiento y haciéndose así refractarias a la actividad de los agentes antibacterianos conocidos, los cuales necesitan que éstas se hallen en fase de crecimiento para poder ejercer su acción. A este tipo de bacterias se las denomina persistentes y representan una pequeña fracción de la población bacteriana (< 0,1%). Una vez que el antibiótico desaparece del medio, éstas reinician su crecimiento y las pruebas de sensibilidad indican que siguen siendo susceptibles a la actividad de los antimicrobianos.

En la actualidad se considera que casi el 50% de las infecciones bacterianas crónicas o recurrentes que se presume asociadas a la presencia de bacterias resistentes, son en realidad efecto de las bacterias persistentes, las que han sido asociadas a cuadros infecciosos crónicos o recidivantes como por ejemplo las infecciones del tracto urinario en caninos y felinos, y de la glándula mamaria en bovinos.

Específicamente, la característica no heredable del fenómeno de persistencia bacteriana puede prolongar el tiempo en el cual se produce la eliminación del agente infeccioso del organismo. Esto es notorio en los casos en que el microorganismo –aún en bajas concentraciones- se aloja en tejidos profundos o es intracelular facultativo y de esa manera puede evadir los factores de respuesta inmune de base celular o humoral.

Como consecuencia de esto, la población persistente evita o limita la eliminación de los agentes infecciosos por la sola acción del agente antibacteriano, proporcionando las condiciones para la emergencia de cepas resistentes en este organismo infectado, aun cuando *in vitro* este haya demostrado ser capaz de reducir el conteo bacteriano a niveles asociados con la erradicación bacteriana.

En este estudio, se observó que el tiempo de exposición de un inóculo de *E. coli* a concentraciones mixtas de EFX+CFX fue el factor determinante para lograr la reducción del conteo de bacterias viables (inclusive de las bacterias persistentes) a un nivel asociado con la erradicación bacteriana o cura bacteriológica ( $-4 \log_{10}$ ).

El hallazgo más importante de este trabajo fue el de observar que una subpoblación de bacterias persistentes de *E. coli* ATCC 25922 modificó el modo de acción de dos antibióticos del grupo de las FQs (EFX y CFX), cambiando su actividad dependiente de su concentración a dependiente del tiempo de exposición, mostrando que este último es el factor determinante para el éxito de una terapéutica antibiótica al permitir erradicar –al menos en forma teórica- a las persistentes.

Este hallazgo lleva a reconsiderar el paradigma del modo de acción de los antibióticos. Asimismo las persistentes representan un desafío para el desarrollo farmacéutico, ya que los esfuerzos actuales están encaminados al descubrimiento de nuevas moléculas capaces de minimizar la emergencia de bacterias persistentes o de impedir que éstas retomen su actividad biológica normal una vez que el antibiótico ha desaparecido del organismo.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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.
- Lucas J.J., San Andrés M.I., Gonzáles F., Froyman R., Rodríguez C.**, 2008. Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration to cattle. Veterinary research Communication, 32:275-279.
- 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.