

DETERMINACIÓN DE LA VENTANA DE SELECCIÓN DE MUTANTES PARA MARBOFLOXACINA FRENTE A CEPAS DE REFERENCIA DE *Staphylococcus aureus*

Valdez Abdo, Juan Manuel

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral

Director: Picco, Eduardo Jesús

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: Marbofloxacina - *Staphylococcus aureus* - Mutante

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es uno de los problemas más importantes de la producción lechera, ocasionando enormes pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con producción intensiva. Si bien los programas efectivos y económicos para el control de la mastitis bovina se basan fundamentalmente en la prevención, la intervención terapéutica es una parte importante del programa de control de este cuadro clínico infeccioso. Por otra parte, a pesar de que en la actualidad el profesional veterinario dispone de un verdadero arsenal terapéutico, las infecciones recidivantes provocadas por *Staphylococcus aureus* generan difíciles problemas sanitarios, obligando a un replanteo de las estrategias terapéuticas, a través de un exhaustivo estudio de la biología del microorganismo patógeno y de la farmacodinamia del agente antimicrobiano seleccionado. Al respecto, el principal criterio de base científica empleado para seleccionar al agente antibacteriano es la susceptibilidad del microorganismo al fármaco en cuestión, lo cual se efectúa a través de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), ya que los patrones de susceptibilidad pueden variar no solamente de acuerdo con la región geográfica, sino también de un rodeo a otro (Hossain *et al.*, 2017).

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos ha aumentado considerablemente en los últimos años. Son muchos los autores y las agencias públicas y privadas que han alertado de este problema y se han realizado documentos de consenso para establecer estrategias que reduzcan o minimicen sus efectos. Está claro que las cepas resistentes se seleccionan para un rango de concentraciones muy amplio, incluidas las inferiores a la CIM, ya que bajas concentraciones de antibióticos pueden afectar varios procesos celulares que aumentan la variabilidad genética y alteran el comportamiento celular, además que por el sólo hecho de permitir la expansión de la población de patógenos; fomentan indirectamente la posibilidad de generación de nuevos mutantes. Sin embargo, el conocimiento de los detalles mecanicistas de estos efectos es aún limitado y, en particular, las implicaciones evolutivas y médicas de la exposición bacteriana a estas bajas concentraciones de antibióticos son en su mayor parte inexploradas.

Proyecto: Determinación de la ventana de selección de mutantes para antimicrobianos frente a cepas autóctonas causantes de mastitis bovina.
Instrumento: CAI+D
Año convocatoria: 2020
Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral
Director: Eduardo J. Picco

En una primera aproximación respecto a resistencia, podríamos pensar que los antimicrobianos tienen un efecto mutagénico y que inducen la aparición de mutaciones. Sin embargo, es bien conocido que los mutantes resistentes se encuentran de manera natural en las poblaciones bacterianas y que este hecho es independiente de la presencia del antimicrobiano en el medio. Toda población bacteriana tiene, con una frecuencia variable, mutantes resistentes que coexisten con la población sensible mayoritaria. Bajo determinadas circunstancias, cuando se somete una población bacteriana a la acción de un antimicrobiano, los mutantes resistentes pueden hacerse dominantes al inhibirse la fracción sensible mayoritaria pero no la de los mutantes resistentes. Este proceso se conoce con el nombre de selección de mutantes resistentes (Canton, 2006).

Por otra parte, ya en el año 1997 Baquero y Negri sugirieron que existe un peligroso rango de concentraciones donde las mutantes resistentes son seleccionadas con mayor frecuencia, siendo el inicio del concepto de la ventana de selección de mutantes (VSM). De este planteo se deriva la concentración preventiva de mutantes (CPM), definida como la concentración que restringe la amplificación de mutantes resistentes de primer paso dentro de una población sensible, porque por encima de esta concentración el crecimiento bacteriano solo se espera que ocurra con dos o más mutaciones concomitantes. El rango de concentraciones entre la CIM y la CPM se define como ventana de selección de mutantes; la misma no debe verse como un rango de concentraciones uniformemente asociado a la probabilidad de selección, sino como el rango de concentraciones donde determinados factores relacionados con el patógeno y con la exposición influyen en dicha probabilidad (Canut Blasco *et al.*, 2013).

Según esta hipótesis de la VSM y la CPM, manteniendo las concentraciones de drogas por encima de su CPM durante toda la terapia se puede restringir severamente la adquisición de resistencia a los medicamentos y lograr su efecto terapéutico, mientras que esto aumentará el riesgo de efectos adversos y tóxicos. Es por ello que una alternativa para restringir la selección de resistencia es usar compuestos que tienen una ventana de selección mutante estrecha, es decir, que la proporción CPM: CIM (índice de selección) sea baja. Este índice de selección es específico para cada combinación antimicrobiano-bacteria (Zhao and Drlica, 2007).

En este caso evaluamos marbofloxacin (MFX), una fluoroquinolona sintética de tercera generación desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria. Las características farmacocinéticas de MFX la hacen un antimicrobiano atractivo para tratar infecciones serias en animales de producción causadas por bacterias aerobias grampositivas y gramnegativas (El Garch *et al.* 2017).

OBJETIVO

El objetivo del trabajo fue determinar la ventana de selección de mutantes para marbofloxacin frente a cepas de referencia de *Staphylococcus aureus*.

METODOLOGÍA

Se emplearon dos cepas de referencia de *S. aureus*, esto es ATCC 29213 y ATCC 29740 (Newbould 305). La primera de ellas se utilizó por ser la cepa que normalmente se emplea como referencia en los estudios CIM para *S. aureus*, en tanto que la segunda cepa se eligió por ser una cepa ATCC aislada a partir de un caso de mastitis.

En una primera etapa se estimó la CIM mediante la técnica de microdilución en placa con caldo Mueller-Hinton, donde un inóculo de 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) de

cada una de las cepas de *S. aureus* se enfrentó a diluciones aritméticas 1:1 de marbofloxacin en un rango de concentraciones de entre 0,016 a 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos se realizaron por duplicado incubándose en estufa a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. La CIM fue definida como la menor dilución de marbofloxacin que evitó el desarrollo bacteriano visible.

La CPM fue determinada de la siguiente manera. Las dos cepas bacterianas se cultivaron en tres placas de agar y se incubaron a 35°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, el contenido completo de bacterias presentes sobre la superficie de las placas de agar fue removido totalmente con una espátula estéril y fue transferido a un medio de cultivo líquido (caldo Mueller Hinton) donde se lo incubó a 35° durante 18 horas. Al cabo de ese tiempo se procedió a centrifugar a 3500 r.p.m durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en un volumen menor de medio de cultivo fresco a fin de alcanzar una densidad bacteriana de aproximadamente 1×10^9 UFC; entonces una alícuota de 100 μL fue sembrada sobre la superficie de las placas de agar conteniendo al antimicrobiano en un intervalo predeterminado de concentraciones, las cuales eran diluciones aritméticas 1:1 de marbofloxacin en un rango de entre 0,128 a 1,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente estas placas se incubaron a 35°C bajo condiciones de aerobiosis. La lectura de las mismas se realizó a las 24 y a las 48 horas de haber sido sembradas y la CPM se determina como la menor concentración de antibiótico que evita el desarrollo de colonias bacterianas sobre la superficie de las placas. Todo el procedimiento se realizó por duplicado con dos repeticiones. Se tomaron muestras del inóculo a fin de corroborar la densidad bacteriana.

Para estimar índices farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) se tomaron datos de parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin en leche, luego de la administración intramuscular en vacas (Schneider *et al.*, 2004).

RESULTADOS / CONCLUSIONES

Para las dos cepas testeadas la CIM fue de 0,256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en tanto que la CPM fue de 0,512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual indica que la proporción CPM/CIM fue de 2, lo cual determina que la amplitud de la ventana de selección de mutantes sea estrecha.

Cuando los valores de CIM y MPC se analizaron en forma conjunta con los parámetros farmacocinéticos obtenidos de la revisión bibliográfica se observa que la C_{max} alcanzada en leche luego de la administración de marbofloxacin por vía intramuscular a una dosis de 2 mg/kg era de $1,024 \pm 0,2563$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminuyendo hasta $0,1603 \pm 0,0058$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 23 horas post administración. Por su parte el valor de área bajo la curva (AUC_{0-23}) fue de $6,383 \pm 1,059$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Es por ello que la relación $C_{\text{max}}/\text{CIM}$ fue de 4, en tanto que la $C_{\text{max}}/\text{CPM}$ fue 2. Del mismo modo, la relación AUC/CIM fue 24,9 y la relación AUC/CPM fue de 12,4. Cabe señalar que, de acuerdo a lo citado por la bibliografía, para ser una buena herramienta predictiva de curación clínica y evitar resistencia, los puntos finales de estas proporciones deben ser al menos de 10 para $C_{\text{max}}/\text{CIM}$ y de 125 h para AUC/CIM (Canut Blasco *et al.*, 2015).

Estos resultados demuestran que la aplicación de marbofloxacin por vía intramuscular en vacas sanas en lactación no consigue alcanzar concentraciones en leche que permitan asegurar el control de estas cepas de *S. aureus*. Es también importante señalar aquí la recomendación efectuada por organismos internacionales de control de medicamentos, como el caso la Agencia Europea para la Aprobación de Medicamentos (EMA), quien indica que el uso de las fluoroquinolonas en animales debería limitarse a fin de mitigar el riesgo para la salud pública, por la importancia trascendental que tienen en medicina humana,

recomendándose que el uso en animales debería efectuarse siempre en base a pruebas de susceptibilidad, y solamente cuando no haya otro antimicrobiano clínicamente eficaz.

De esta forma, el conocimiento de la susceptibilidad microbiana a través de la CIM, CPM y VSM combinada con parámetros PK podría ser útil como predictor de parámetros de resistencia *in vitro* y podría ayudar a agregar nueva información para conocer la situación de resistencia de las cepas de una determinada zona geográfica.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Baquero, F., Negri, M.C. 1997. Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. J Chemother, 9: Suppl 3, 29-37.

Cantón, R. 2006. Concentración preventiva de mutantes: ¿un nuevo parámetro de actividad antimicrobiana con valor clínico? Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 24(10), 599-602.

Canut Blasco, A., Aguilar Alfaro, L., Cobo Reinoso, J., Giménez Mestreb, M.J., Rodríguez-Gascón, A. 2015. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. Enferm Infecc Microbiol Clin, 33: 48-57.

El Garch F, Kroemer S, Galland D, Morrissey I, Woehrle F. 2017. Survey of susceptibility to marbofloxacin in bacteria isolated from diseased pigs in Europe. Vet. Rec. 180: 591

Hossain, M.K., Paul, S., Hossain, M., Islam, M., Alam, M. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. Austin J Vet Sci & Anim Husb, 4 (1): 1-12.

Schneider, M., Vallé, M., Woehrlé, F., Boisramé, B. 2004. Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. J. Dairy Sci. 87:202–211.

Zhao, X., Drlica, K. 2002. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: measurement and potential uses of the mutant selection window. J. Infect. Dis. 185: 561-565.