ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS: ACCIÓN DE RIFAMPICINA EN CONCENTRACIONES SUB-LETALES SOBRE ALGUNOS FACTORES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÉNICO

Husulak, E. / Oviedo, P. / Pegels, E. / Quiroga, M. / Vergara, M.
Cátedra de Bacteriología. Facultad de Ciencias, Exactas, Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375 (3300), Posadas, Misiones.

BACTERIAL ENTEROPATHOGENS: EFFECTS OF SUB-LETHAL CONCENTRATIONS OF RIFAMPIN ON SOME ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* VIRULENCE FACTORS

ABSTRACT

This study was aimed at the investigation of the effect of sub-lethal concentrations of rifampin on some enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors. We studied the effect of sub-lethal concentrations of rifampin on the adherence properties by the "Salting out" test and hemagglutination test, and on the expression of the termolabile enterotoxin (LT) by GM1-ELISA. These tests were applied on the strains grown in the presence of subinhibitory concentrations (½ and ¼ MIC) and without rifampin.
Our data show that subinhibitory concentrations of rifampin may be capable of decreasing the adhesiveness and the level of LT enterotoxin expression of enterotoxigenic *Escherichia coli*.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, rifampin, virulence.

RESUMEN

El objeto de este estudio fue el de determinar la acción de rifampicina en concentraciones subletales sobre algunos factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico. Para ello, estudiamos dicha acción sobre la adherencia por las técnicas de "Salting out" y hemaglutinación manosa-resistente y sobre la expresión de la enterotoxina termolábil (LT) por GM1- ELISA. Las técnicas se aplicaron a las cepas antes y después de ser sometidas a concentraciones subinhibitorias (½ y ¼ CIM) de rifampicina.
Nuestros datos muestran que concentraciones subinhibitorias de rifampicina serían capaces de reducir la adhesividad y la expresión de toxina LT en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénico.

PALABRAS CLAVES: *Escherichia coli*, rifampicina, virulencia.

INTRODUCCIÓN

La virulencia bacteriana refleja la habilidad de microorganismos infectivos para producir efectos patológicos en un huésped susceptible. La severidad y la extensión de dichos efectos dependerá del inóculo bacteriano, de la habilidad para adherir y desarrollar mecanismos de virulencia, sean estos de invasión, toxicidad o ambos; y de la capacidad para enfrentar las variadas estrategias del huésped puestas en juego para la defensa frente a la agresión.

Escherichia coli enterotoxigénico (ECET) es la causa más común de diarrea en niños del mundo pobre, especialmente en climas tropicales; y de adultos que viajan a estas áreas, ocasionando en ellos la llamada "diarrea del viajero". La incidencia anual de infecciones por ECET es estimada en 650 millones de casos de diarrea y 80.000 muertes en niños menores de 5 años de edad [1].

La patogénesis de la infección por ECET incluye una serie de pasos que se inician con la colonización del intestino delgado previa adherencia a la superficie epitelial mediante estructuras proteicas llamadas Factores de Colonización (CFA). Luego de vencer las defensas del huésped, se inicia la producción de dos poderosas enterotoxinas, termolábil (LT) y termoestable (ST), principales responsables del daño en el huésped cuya manifestación más visible es la diarrea acuosa profusa, tipo coleriforme. Las fimbrias o adhesinas así como otros factores involucrados en la patogenicidad (hemolisinas, enzimas, citotoxinas, enterotoxinas entre otros), constituyen importantes factores de virulencia en la patogénesis de las enfermedades infecciosas en general [2, 3]. Dichos factores pueden tener codificación plasmídica, cromosómica o por transposones y aun mediante bacteriófagos.

Diversos autores [2, 3, 4, 5, 6, 7] han observado que algunos antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias son capaces de afectar algunos de estos factores de virulencia, actuando de anti-adhesinas al alterar la síntesis y expresión de las adhesinas bacterianas, induciendo la formación de adhesinas aberrantes o la pérdida de su función específica [8], o bien eliminando plásmidos que codifican virulencia o resistencia [9]. También pueden alterar el ADN cromosómico inhibiendo la transcripción del mensaje genético necesario para la expresión de los factores anteriormente mencionados.

En un trabajo previo [10] evaluamos la actividad subinhibitoria de rifampicina, un antibiótico que bloquea la transcripción inhibiendo la iniciación de la síntesis del ARN [11], sobre la capacidad hemolítica de especies de *Aeromonas* provenientes de niños con y sin diarrea. En dicho trabajo observamos la reducción de la capacidad hemolítica (posiblemente ligada a la enterotoxicidad) en el 75% de las cepas, por lo que decidimos ampliar las experiencias a otros microorganismos, frecuentes en nuestro medio, involucrados en la diarrea bacteriana, como *Escherichia coli* enterotoxigénico, e investigar la acción de rifampicina en concentraciones subinhibitorias, sobre algunos factores asociados a la virulencia como la adherencia y la expresión de la toxina termolábil (LT).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Se estudiaron 8 cepas de ECET aisladas de muestras fecales de niños con diarrea aguda y asintomáticos. Las cepas fueron conservadas en nitrógeno líquido (-196 ºC) hasta la realización de los estudios.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

El estudio de la CIM se realizó por el método de dilución en medio sólido en agar Mueller Hinton (Biokar Diagnostics, Francia) siguiendo las Normas del NCCLS [12]. El antimicrobiano utilizado, rifampicina, droga pura con actividad certificada, fue provisto por Laboratorios Hoechst Marion Roussel, Argentina.

Condiciones de cultivo

Las cepas de ECET fueron suspendidas en caldo Tripteína Soya, en inóculo de 0.5 Mc Farland y se sometieron a la acción de concentraciones de rifampicina equivalentes a ¼ y ½ de la CIM, manteniéndose en agitación constante en Shaker y a temperatura de 35ºC durante 24 horas.

Luego del crecimiento, las suspensiones bacterianas se lavaron tres veces con buffer fosfato-salino (PBS, pH: 7,2) a fin de eliminar todo resto de antimicrobiano. La viabilidad de las cepas se corroboró por siembra en agar Mueller Hinton.

Técnica de "Salting out "(SO)

El ensayo fue realizado como lo describen Oviedo y col. [13]. Volúmenes iguales (25 µl) de las suspensiones bacterianas (5 x 10^9 unidades formadoras de colonias/ml en PBS 0,002 M, pH 6,8), obtenidas según se describen anteriormente, y diferentes concentraciones de soluciones de sulfato de amonio pH 6,8 (rango 2M a 0,02M) fueron mezcladas en placas de vidrio, sometiéndolas a rotación constante durante 2 minutos a temperatura ambiente. La hidrofobicidad de cada cepa fue definida como la menor concentración de sulfato de amonio donde se observaba precipitación visible.

Técnica de Hemaglutinación (HA)

Se utilizaron glóbulos rojos frescos humanos grupo A, equinos, bovinos y de pollo, lavados tres veces con solución fisiológica y suspendidos al 3% en PBS (pH 7,2) con y sin D-manosa (1% en PBS pH 7,2) según metodología descripta por Oviedo y col. [13]. Volúmenes iguales (50 µl) de eritrocitos y las suspensiones bacterianas fueron enfrentados en placas de vidrio, sometiéndolas a rotación constante durante dos minutos a temperatura ambiente.

Técnica de producción de enterotoxina termolábil (LT)

La determinación de la producción de toxina LT en las cepas de *Escherichia coli* en estudio se realizó según la técnica de gangliósido GM1-ELISA con anticuerpos monoclonales, según la describen Svennerholm y col. [14].

Los ensayos de *"Salting out"*, hemaglutinación y producción de enterotoxina LT fueron llevados a cabo con las cepas sometidas a concentraciones subinhibitorias (½ y ¼ CIM) y sin rifampicina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios realizados respecto a la acción de antibióticos en concentraciones subinhibitorias sobre fimbrias sugieren que concentraciones subletales de antimicrobianos pueden disminuir la adherencia bacteriana y, por lo tanto, la colonización de mucosas perineal, uretral, vaginal y anal [15].

La habilidad de cepas de *Escherichia coli* para expresar hidrofobicidad de superficie y aglutinar eritrocitos de diferentes especies animales ha sido correlacionada con la presencia de factores asociados a la adherencia en la superficie celular [16]. El comportamiento frente a eritrocitos de diferentes especies animales, (diferentes perfiles de hemaglutinación) se asocia a la diversidad de esos factores puestos en juego.

Luego de la incubación con concentraciones subinhibitorias de rifampicina se detectaron cambios en la expresión de hidrofobicidad de superficie en todas las cepas ensayadas con ambas concentraciones subinhibitorias seleccionadas (Figura 1). Esta reducción de la hidrofobicidad podría expresar la ausencia, por pérdida o algún mecanismo que impida su expresión, de fimbrias presentes en las cepas antes de ser sometidas a la acción de concentraciones subletales de CIM de rifampicina.

La inhibición de la hemaglutinación (Figura 2) fue más relevante con la concentración de ½ de CIM para todos los eritrocitos ensayados, excepto para eritrocitos humanos. El mayor porcentaje de cepas inhibidas, tanto con las concentraciones de ¼ y un ½ de CIM, se presentó para eritrocitos equinos.

Nuestros datos muestran que la hidrofobicidad de la superficie celular y las propiedades de hemaglutinación, fueron considerablemente reducidas luego del tratamiento con concentraciones subletales de rifampicina, sugiriendo que rifampicina sería capaz de disminuir la adhesividad de *Escherichia coli* enterotoxigénica.

Del análisis de los resultados obtenidos al determinar la expresión de la enterotoxina, se observó una disminución de la lectura de absorbencia del ELISA, que expresa la disminución en la expresión de LT, en todas las cepas ensayadas y en ambas concentraciones de sub-CIM. La concentración de ½ de CIM fue la que redujo más notable-

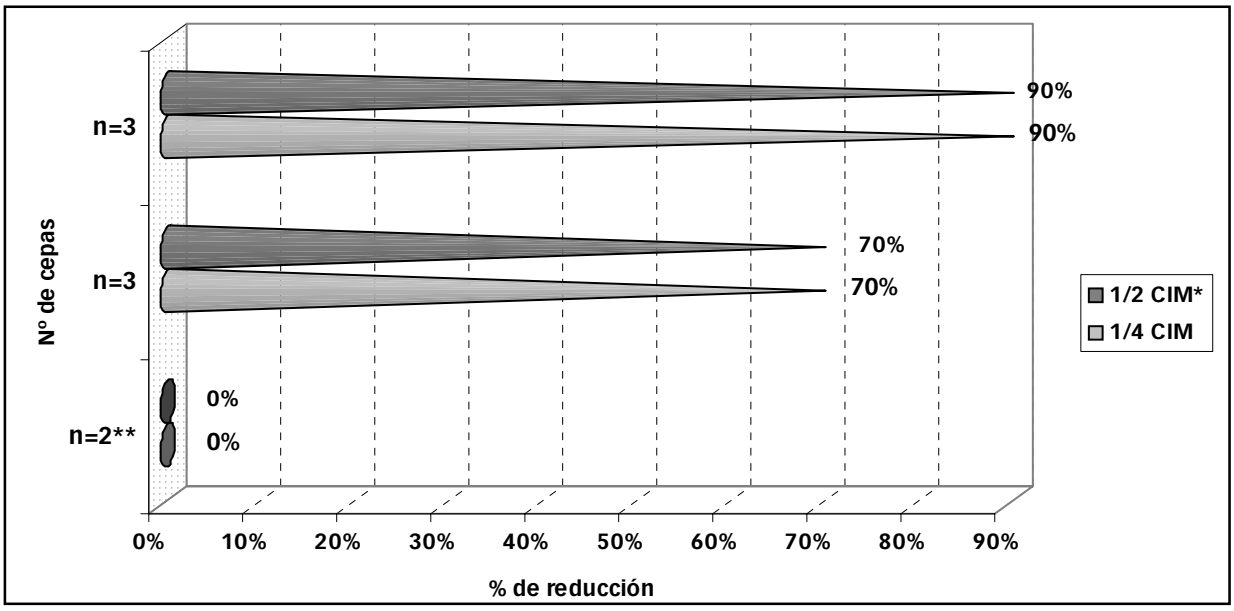

FIGURA 1: porcentaje de reducción de la hidrofobicidad (*"Salting out"*) de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénico sometidas a concentraciones subinhibitorias de rifampicina. *Concentración Inhibitoria Mínima. **2 cepas fueron *Salting out* negativo (mayor a 2 M).

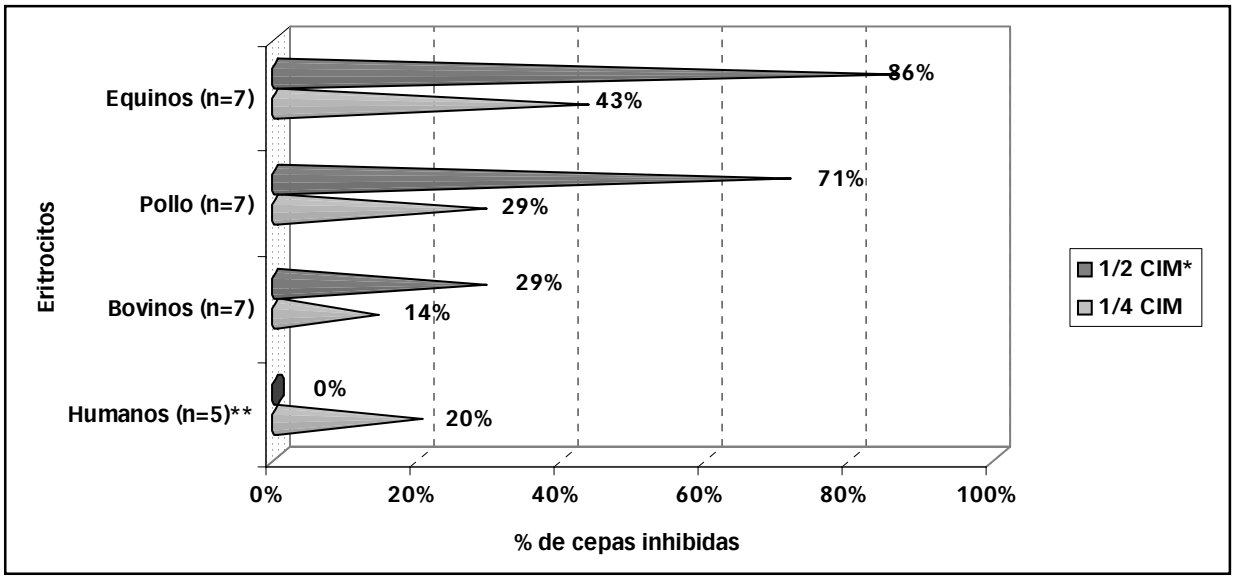

FIGURA 2: inhibición de la hemaglutinación de cepas de Escherichia coli enterotoxigénico. Porcentaje de cepas inhibidas luego de la exposición a concentraciones subinhibitorias de rifampicina. *Concentración Inhibitoria Mínima **Número de cepas que hemaglutinaron en ausencia de rifampicina

mente dicha expresión, respecto a los niveles de expresión de las cepas no tratadas con el antibiótico (Figura 3).

Las ocho cepas de ECET en estudio presentaron una media de CIM para rifampicina de 16 µg/ml.

Si bien ha sido planteado el riesgo de alcanzar concentraciones subinhibitorias en la sangre y tejidos, cual sería el de la emergencia de resistencia bacteriana, diversos estudios demostraron que la resistencia adquirida por la exposición de bacterias a concentraciones subletales de antimicrobianos es reversible al ser removido el antimicrobiano, y que aquellas cepas que presentan resistencia adquirida por este tipo de exposición a drogas subletales tienen una virulencia disminuida, manifestada por su curva de crecimiento disminuido y una reducción en la expresión de sus enzimas [15].

Podemos concluir que, concentraciones subinhi-bitorias de rifampicina producirían una disminución en la expresión de fimbrias, (determinada en este estudio por una disminución en la hidrofobicidad y cambios en los patrones de hemaglutinación) y en la expresión de toxina LT.

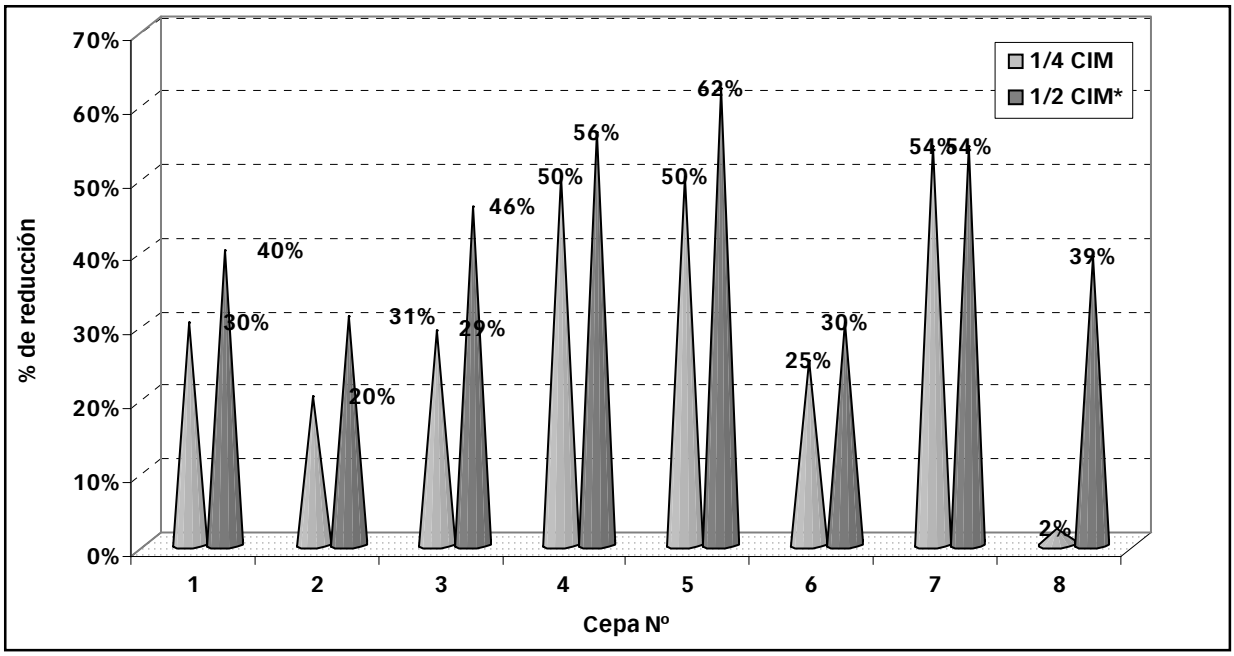

FIGURA 3: acción de concentraciones subinhibitorias de rifampicina sobre la producción de toxina LT en cepas de Escherichia coli enterotoxigénico. *Concentración Inhibitoria Mínima

Si bien rifampicina no es un antibiótico usado en la terapéutica de infecciones ocasionadas por *Escherichia coli*, este ensayo resultaría un buen modelo para aplicar a otros agentes antimicrobianos de uso en dichas infecciones.

El soporte científico del uso de agentes antimicrobianos en el tratamiento de enfermedades infecciosas está dado por la certeza de la eliminación de la virulencia por la muerte del microorganismo, una vez alcanzada la CIM en el sitio de la infección. Distintas evidencias soportan el hecho de la reducción de la virulencia, sin muerte del microorganismo, mediante el uso de concentraciones inferiores a la concentración inhibitoria mínima convencional, sugiriendo que dichas concentraciones pueden resultar eficaces al alterar funciones o estructuras involucradas en el desarrollo de la misma [16].

Se hace evidente la necesidad de continuar con estos estudios a fin de establecer la interacción de agentes antimicrobianos de uso en clínica, en concentraciones subletales, sobre algunos factores de virulencia, y relacionarla con la farmacocinética de las drogas a fin de optimizar esquemas terapéuticos simples para el tratamientos en las infecciones no complicadas. Este mecanismo podría tener implicancia en la terapéutica con drogas (como quinolonas) no especificadas para la diarrea aguda infecciosa en niños, que podrían ser administradas en concentraciones subinhibitorias disminuyendo las reacciones adversas que pudieran ocasionar en el huésped.●

REFERENCIAS

1. **Gaastra**, W; **Svennerholm**, A. M. *Colonization factors of human enterotoxigenic E. coli (ETEC).* Trends in Microbiology 4(11): 444-452, 1996.
2. **Loubeyre**, C; **Desnottes**, J. F; **Moreau**, N. *Influence of sub-inhibitory concentrations of antibacterial on the surface properties and adhesion of Escherichia coli.* J. Antimicrob. Chemother. 31: 37-45, 1993.
3. **Breines**, D. M.; **Burnham**, J. C. *Modulation of Escherichia coli type 1 fimbrial expression and adherence to uroepithelial cells following exposure of logarithmic phase cells to quinolones at subinhibitory concentrations.* J. Antimicrob. Chemother. 34: 205-221, 1994.
4. **Hybenova**, D.; **Majtan**, V. *The effect of subinhibitory concentrations of quinolone and macrolide antibiotics on production of termolabile hemolysins in Pseudomonas aeruginosa.* Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 44: 169-170, 1995.
5. **Reid**, G.; **Sharma**, S.; **Adikolanu**, K.; **Tieszer**, C.; **Martin**, R.; **Bruce**, A. *Effects of ciprofloxacin, norfloxacin, and ofloxacin on in vitro adhesion and survival of Pseudomonas aeruginosa AK1 on urinary catheters.* Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1490-1495, 1994.
6. **Nomura**, S.; **Murata**, K.; **Nagayama**, A. *Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on the cell surface of Klebsiella pneumoniae and phagocytic killing activity*. J. Chemother. 7: 406-413, 1995.
7. **Nomura**, S.; **Nagayama**, A. *Mechanisms of enhancement of bactericidal activity of phagocytes against Klebsiella pneumoniae treated with subminimal inhibitory concentrations of cefodizime.* Chemotherapy 41:267-275,1995.
8. **Gómez García**, A. C, **Pérez Giraldo**, C.; **Rodríguez Benito**, A. *Antimicrobianos y adherencia de estafilococos coagulasa-negativos.* Enf. Infec. Microbiol. Clin. 14: 261-266, 1996.
9. **Methar**, S. *Influence of 4-quinolones on the dissemination of resistance plasmids.* Quinolones Bull. 6(4):21-22, 1990.
10. **Quiroga**, M.; **Farinati**, A.; **Pegels**, E.; **Lubaczewski**, L.; **Vergara**, M. *Rifampicin sub-inhibitory concentrations reduce the expression of haemolysin in Aeromonas spp.* Int. J. Antimicrob. Agents [letter] 15: 243-244, 2000.
11. **Wehrli**, W. *Rifampin: Mechanisms of action and resistance.* Rev. Infect . Dis. 5 (supp.3): S407-S411, 1983.
12. *National Committee for Clinical Laboratory Standards.* NCCLS Publication M100-S6, 15(4), NCCLS Villanova, Pa. 1995.
13. **Oviedo**, P.; **Quiroga**, M.; **Pegels**, E.; **Husulak**, E.; **Vergara**, M. *Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors.* J. Chemother. 12(6):487-490, 2000.
14. **Svennerholm**, A. M.; **Wiklung**, G. *Rapid GM1-Enzyme-Linked identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin.* J. Clín. Microbiol 17: 596:600, 1983.
15. **Zhanel**, G.; **Nicolle**, L. *Effect of subinhibitory antimicrobial concentrations (sub-MICs) on in-vitro bacterial adherence to uroepithelial cells.* J. Antimicrob. Chemother 29: 617-627, 1992.
16. **Braga**, P. C., **Sala**, M. T.; **Dal Sasso**, M. *Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rufloxacin on bacterial virulence factors.* Antimicrob. Agents Chemother. 43(5): 1013-1019, 1999.