

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 7 / N° 7a / 2005 / 28-36

ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA: INFLUENCIA DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE CIPROFLOXACINA SOBRE FACTORES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA

¹Quiroga, M. / ¹Oviedo, P. / ¹Pegels, E. / ¹Husulak, E. / ¹Jordá, G. / ²Ortiz, A. / ²Ruttler, M. E. / ¹Vergara, M.

¹F.C.E.Q.y N. Universidad Nacional de Misiones. Av. M. Moreno 1375. (3300). Posadas, Mnes., Argentina.

²Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Av. Libertador 80. (5500) Mendoza, Arg.

ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*: INFLUENCE OF SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS OF CIPROFLOXACIN ON ASSOCIATED-VIRULENCE FACTORS

ABSTRACT

In this study, we investigated the influence of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence factors as motility, adherence, hemolysin production and the interaction with some mechanisms of host defenses (phagocytosis).

Adherence was investigated on *bfp* gene. The detection of *bfp* was reduced on 22% of the strains with 1/2 and 1/8 MIC, and on 11% of the strains with 1/4 and 1/16 MIC. We did not observe relevant differences on the hemolysin production, motility reduction or phagocytosis reduction on any of the studied strains.

In view of these results, it could be important to continue with this kind of studies in order to optimize simple therapeutic schemes for the treatment of uncomplicated infections, reducing the adverse reactions of some drugs on the host.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, ciprofloxacin, virulence, diarrhea.

RESUMEN

En este estudio, investigamos la influencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina sobre factores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) como la movilidad, adherencia, producción de hemolisinas y la interacción con algunos mecanismos de defensa del huésped (fagocitosis).

La adherencia se investigó sobre el gen *bfp*. La detección de *bfp* disminuyó en 22% de las cepas con 1/2 y 1/8 de CIM, y en 11% de las cepas con 1/4 y 1/16 de CIM. No observamos diferencias significativas en la producción de hemolisinas, reducción de la movilidad o de la fagocitosis en ninguna de las cepas ensayadas.

Dados estos resultados, sería importante continuar con este tipo de estudios a fin de optimizar esquemas terapéuticos simples para el tratamiento en las infecciones no complicadas, disminuyendo las reacciones adversas que puedan ocasionar algunas drogas en el huésped.

PALABRAS CLAVES: *Escherichia coli*, ciprofloxacina, virulencia, diarrea.

INTRODUCCIÓN

La virulencia bacteriana refleja la habilidad de los microorganismos, cuando estos son infectivos, para producir efectos patológicos cuando invaden un huésped susceptible.

De hecho que la severidad y la extensión de dichos efectos dependerá del inóculo bacteriano, de la habilidad para adherir y desarrollar sus mecanismos de virulencia, sean estos de invasión, toxicidad u otros y de su capacidad para enfrentar las variadas estrategias del huésped puestas en juego para la defensa frente a la agresión.

La producción de adhesinas, hemolisinas, enzimas y toxinas entre otros, son importantes factores de virulencia en la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Dichos factores pueden tener codificación plasmídica, cromosómica o por transposones y aún mediante bacteriófagos [1] [2].

Entre las bacterias involucradas en la diarrea aguda infantil, en el mundo en desarrollo, *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP) ocupa un lugar importante. Este microorganismo posee una serie de factores de virulencia codificados plasmídica y cromosómicamente que posibilitan una amplia gama de interacciones con el huésped y que actúan coordinadamente para facilitar la colonización del intestino, conduciendo a la alteración de la integridad de la membrana y otros efectos indeseables [3].

ECEP se caracteriza fenotípicamente por su habilidad de adherirse a monocapas de células en cultivo con un patrón de adherencia localizada, asociada con una fimbria llamada BFP (bundle-forming pili), codificada por el gen *bfp* [4].

Algunos antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias son capaces de modular la expresión de genes asociados a la virulencia, interfiriendo en los procesos de interacciones entre el huésped y los microorganismos, tales como en la adherencia, la producción de toxinas, hemolisinas, el mejoramiento de la fagocitosis, etc. [5].

Entre esas interferencias están descritas la capacidad de actuar de anti-adhesinas al afectar la síntesis y expresión de las adhesinas bacterianas, por formación de adhesinas aberrantes o pérdida de su función específica o bien eliminar plásmidos que codifican virulencia o resistencia, como es el caso de ciprofloxacina [6]. También pueden alterar el ADN cromosómico inhibiendo la transcripción del mensaje genético necesario para la expresión de los factores anteriormente mencionados. Estos mecanismos fueron investigados con concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano, de tal modo que la bacteria, aunque viable, perdería los mecanismos que le permiten desarrollar efectos indeseables en el huésped.

La mayor parte de los trabajos se desarrollaron con *Staphylococcus coagulasa* negativa, *Pseudomonas* spp y otras bacterias gram negativas, como *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* [7] [8] [9] [10] [11].

El trabajo se realizó con el objeto de investigar la acción de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina sobre algunos factores asociados a la virulencia, como adherencia, movilidad, hemolisinas y fagocitosis en cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas estudiadas

Se seleccionaron cepas de ECEP (identificadas por sondas moleculares) que presentaban un patrón de adherencia localizada en células HEP-2.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó la CIM a ciprofloxacina (CIP), (Bayer, Argentina) por el método de dilución en medio sólido según normas e interpretación de resultados del NCCLS [12].

Como controles se utilizaron cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para control de timidina del medio de cultivo Mueller-Hinton.

Exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias (sub-CIM) de CIP

La exposición de las cepas seleccionadas de ECEP a las concentraciones subinhibitorias de CIP se realizó en medio Caldo Mueller-Hinton (CMH). Conocida la CIM a CIP que presentaban las cepas, los caldos se prepararon a fin de lograr en los mismos las concentraciones subinhibitorias de la droga. Una ansada de cada una de las cepas fue inoculada en dichos caldos, los que se incubaron a 35°C sin agitación durante 24 hs. Las concentraciones sub-CIM utilizadas fueron las correspondientes a 1/2, 1/4, 1/8 y/o 1/16 de CIM.

Prueba de viabilidad

De cada tubo se transfirió (previa agitación) una ansada a agar tripteína soya (ATS). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 hs.

Ensayo de inhibición de la movilidad

Para evaluar la acción de concentraciones sub-CIM de CIP sobre la movilidad se utilizó la metodología propuesta por Braga y col. [13] y una modificación de la misma, realizada por el grupo de trabajo.

Se trabajó con siete de las cepas ECEP seleccionadas previamente. Como controles se incluyeron: *Escherichia coli* ATCC 25922 (movilidad positiva) y un aislamiento clínico de *Shigella flexneri* (movilidad negativa).

Previamente, y a fin de estimular la movilidad de las cepas a estudiar, se decidió utilizar la metodología propuesta por Craigie [14]: todas las cepas se sembraron con ansa aguja en un tubo contenido dentro de otro con medio de Craigie (caldo nutritivo 8 gr, extracto de levadura 2 gr, cloruro de sodio 5 gr, nitrato de potasio 1 gr, agar-agar 3 gr, agua destilada 1000 ml, pH 7,6). Los tubos se incubaron 24 hs a 35°C. Luego se realizó un primer pasaje que consistió en transferir la cepa que había desarrollado a los lados externos del tubo central a un nuevo tubo con medio de Craigie. Dicho proceso se llevó a cabo durante siete días.

Una vez estimuladas las cepas de ECEP, 10 µl de un inóculo de trabajo, de cada una de las cepas, conteniendo aproximadamente 30×10^8 UFC/ml, seleccionado previos ensayos con suspensiones de diferentes concentraciones, fue inoculado en CMH durante toda la noche a 37°C. Luego, 5 µl de cada una de estas suspensiones fue sembrado en el centro de una placa de Petri conteniendo 10 ml de agar movilidad (tripteína 1%, NaCl 0.5%, agar-agar 0.25% en agua destilada pH 7.1), a las que se adicionó CIP a fin de lograr en las mismas las concentraciones sub-CIM de 1/2 y 1/4 CIM. Se incluyeron siembras de cepas sin antimicrobiano.

Las placas se ubicaron en un recipiente preparado para mantener una atmósfera húmeda que se incubó a 35°C. Las lecturas de las zonas de movilidad se realizaron cada hora con un calibre y luz oblicua.

Paralelamente, con igual lote de medio de movilidad, lote de CIP e inóculo, se procedió a realizar una ligera variación de la técnica tomada como referencia. Las modificaciones se realizaron con la finalidad de evaluar, en caso de observarse inhibición de la movilidad, si esta era reversible o irreversible, o sea, si dependía o no de la presencia de antimicrobiano en el medio.

Las cepas desarrolladas en CMH con y sin concentraciones sub-CIM de CIP, fueron lavadas tres veces con buffer PBS (pH 7,2) antes de proceder al ajuste del inóculo y la siembra en el medio de movilidad. Las suspensiones obtenidas fueron sembradas en agar movilidad sin el agregado del antimicrobiano.

Cada test fue realizado entre 6 y 9 veces para cada cepa y para cada concentración sub-CIM y control. Los valores están expresados como la media de todos los datos +/- el error estándar de las medias. Las diferencias significativas fueron calculadas usando el test de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el test presentó un valor menor o igual a 0,05.

Ensayo de fagocitosis

A fin de evaluar la fagocitosis de ECEP sometidas a concentraciones sub-CIM de CIP, se trabajó de acuerdo a Braga y col. [13]. En este ensayo se incluyeron seis de las cepas ECEP seleccionadas.

Se procedió a la extracción de sangre humana sin anticoagulante. La sangre entera (2 ml) se colocó sobre portaobjetos, con bordes previamente sellados para evitar el desborde. Los portaobjetos se incubaron a 35°C, durante 2 horas, en cámara húmeda a fin de lograr la formación de coágulo de fibrina y adhesión de polimorfonucleares (PMN). El coágulo fue retirado cuidadosamente con una aguja y los portaobjetos fueron lavados con Solución de Hanks (NaCl 8 gr, KCl 400 gr, PO_4HNa_2 60gr, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 60 gr, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 gr, Cl_2Ca 140 gr, Cl_2Mg 100 gr, Glucosa 1gr, CO_3HNa 350 gr, rojo fenol 2.5 gr, H_2O bidestilada csp. 1000 ml).

Las cepas ECEP, cultivo fresco de 24 hs., en agar tripticosa soya (ATS), fueron suspendidas en solución fisiológica (SF) hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland.

Las suspensiones bacterianas se enfrentaron a los PMN adheridos a los portaobjetos durante 30 min., a una temperatura de incubación de 35°C.

Cumplido este paso, los portaobjetos fueron fijados y coloreados con Naranja de Acridina según se describe en [15]. La observación se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia y se procedió al recuento de las bacterias fagocitadas por los PMN.

Ensayo de inhibición de la adherencia

Se trabajó con 9 de las cepas ECEP seleccionadas y con la finalidad de evaluar la acción de CIP en concentraciones sub-CIM sobre el gen *bfp*. En cada ensayo se usó un control positivo: *Escherichia coli* 2348/69 y un control negativo: *Escherichia coli* HS.

La investigación de la presencia del *bfp* se realizó por la técnica de PCR [16] utilizando un set de "primers" (cebadores) que amplifican una región de 324 pares de bases del gen *bfp*:

```
START    5'CAATGGTGCTTGCGCTTGCT3'
STOP     5'GCCGCTTTATCCAACCTGGT3'
```

Las cepas sometidas a las concentraciones sub-CIM deseadas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) se lavaron 3 veces con PBS pH 7,2. Los sedimentos obtenidos se re-suspendieron en PBS pH 7,2 hasta alcanzar una concentración final equivalente al 4 de Mc Farland.

Para la preparación del templado, a 100 µl de cada uno de los sedimentos se agregó 150 ml de Tritón 1% y se los sometió a Baño María hirviendo (100°C) durante 10 minu-

tos. El sobrenadante obtenido, luego de centrifugarlos a 10000 r.p.m. durante 10 minutos, fue el que se utilizó como templado.

El esquema de ciclado consistió en: un primer ciclo de desnaturalización de 2 min. a 94°C, 30 ciclos de 1 in a 94°C, 2 in a 56°C y 1 in a 72°C, y un ciclo de extensión final de 3 in a 72°C.

Los fragmentos de amplificación fueron separados mediante corrida electroforética sobre gel de agarosa al 2% (p/v), visualizados por transiluminación UV previa coloración con bromuro de etidio y fotografiados con cámara Polaroid. En cada corrida se utilizó un marcador de peso molecular (100 bp Ladder, Promega, USA) para identificar los fragmentos de 324 pares de bases correspondientes a la región del gen *bfp* amplificado.

Ensayo de inhibición de hemolisinas

Para dicho ensayo se trabajó con tres cepas de ECEP seleccionadas por producir a-hemolisinas según metodología descrita por Gyles y col. [17], quienes proponen que si se observa la presencia de hemólisis en agar sangre oveja, preparado tanto con eritrocitos lavados como sin lavar a las 3 hs. de incubación estamos en presencia de un fenotipo alfa-hemolítico. Se incluyeron como controles *Escherichia coli* ATCC 25922 (no productora de hemolisinas) y *Escherichia coli* 32511 E-Hly+ (cepa productora de hemolisinas) provista gentilmente por la Dra. Marta Rivas del ANLIS-Malbrán.

Las cepas (estrías de 24 hs.) se sembraron en CMH sin antibiótico y con concentraciones de CIP equivalentes a 1/2, 1/4 y 1/8 de la CIM de las cepas. Los caldos se incubaron en estufa sin agitación a 35°C, durante toda la noche. Al día siguiente se realizó, de cada uno de ellos, una dilución 1/100 en CMH fresco luego de ajustar previamente el inóculo a una concentración equivalente al 2 de Mc Farland. Los nuevos cultivos se incubaron con agitación en Shaker (120 r.p.m.) a 35°C durante 6 horas.

Finalizado este período, una alícuota se transfirió a placas de ATS con ansa calibrada a fin de comprobar si la concentración de gérmenes presentes era equivalente en todos los tubos con y sin el agregado de CIP así como la pureza de los cultivos, y se evaluó la producción de hemolisinas según la metodología propuesta por May y col. [18] trabajando con eritrocitos ovinos. La lectura se realizó en espectrofotómetro a una absorbancia de 543 nm y como blancos de reacción se utilizaron: 400 µl de agua + 400 µl de eritrocitos (100% de hemólisis) y 400 µl de SF + 400 µl de eritrocitos (0% de hemólisis).

Cada test fue realizado 6 veces para cada cepa y para cada concentración sub-CIM y control. A los resultados de absorbancia obtenidos se les restó el valor de correspondiente al blanco de reacción (0% de hemólisis). Los

valores están expresados como la media de todos los datos +/- el error estándar de las medias. Las diferencias significativas fueron calculadas usando el test de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el test presentó un valor menor o igual a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen numerosas evidencias de la acción de algunos antimicrobianos en concentraciones sub-inhedoras sobre diversos factores asociados a la virulencia, como la movilidad, la adherencia, la capacidad de producir toxinas y también sobre las interacciones con las defensas del huésped, como la fagocitosis [19].

Ensayo de inhibición de la movilidad

Dada la posibilidad de que al disminuir la movilidad se disminuye la diseminación de la infección, es la movilidad un importante factor asociado a la virulencia.

Son muy escasas las referencias a la alteración de la movilidad en *Escherichia coli* sometidas a concentraciones sub-inhedoras de CIP.

La acción de algunas quinolonas sobre la movilidad fue estudiada por Braga y col. [13]. Estos autores demuestran una significativa reducción de la movilidad luego de que las cepas fueran tratadas con diluciones de CIM desde 1/2 a 1/16.

En nuestra experiencia, si bien se observa en valores absolutos (Tabla 1), una disminución en el diámetro de la zona de "swarming" (o movilidad) en las cepas sometidas a concentraciones sub-inhedoras, al aplicar tratamiento estadístico dichas disminuciones no fueron significativas. A partir de las 3 horas de incubación, la disminución fue mayor con el método propuesto por Braga [13], en especial al someter las cepas a concentraciones sub-inhedoras de 1/2 CIM.

En la modificación realizada por la Cátedra (Tabla 2), observamos que la disminución se produjo a partir de las 4 horas, siendo menos marcada que la ocurrida siguiendo el método de Braga [13]. También se observó que las cepas previamente sometidas a 1/4 CIM al eliminar la acción del antimicrobiano, no veían afectada su capacidad de movilidad.

Ensayo de fagocitosis

Existen evidencias acerca de los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en las bacterias cuando son tratadas con concentraciones sub-letales de algunos antimicrobianos, lo que conduciría a hacerlas más susceptibles a la fagocitosis y a la muerte celular.

La mayoría de las publicaciones en el tema están referidas a estos cambios en bacterias gram positivas, siendo muy escasas las referidas a *Escherichia coli*, como las de Braga y col. [13], quienes trabajando con fleroxacina y ciprofloxacina en concentraciones 1/2 de la CIM observaron un aumento de la fagocitosis en cepas capsuladas del germen, no así cuando la quinolona ensayada fue rifloxacina. Para esta quinolona, solo obtuvieron un incremento significativo de la muerte celular hasta una dilución de 1/8 de la CIM.

En nuestra experiencia, cuando investigamos la fagocitosis de las cepas de ECEP tratadas con diferentes concentraciones sub-letales de CIP (Tabla 3) ninguna de las seis cepas estudiadas mostró modificación estadísticamente significativa de la misma.

Ensayo de inhibición de la adherencia

La acción de antibióticos a concentraciones sub-inhedoras sobre fimbrias, ha sido relatada por diversos

autores. Entre ellos, Abalia y col. [20] trabajando con CIP y *Escherichia coli* uropatógena, no encontraron diferencias cualitativas en las proteínas fimbriales, de las cepas sometidas a concentraciones sub-inhedoras del antimicrobiano, aunque sí una significativa disminución en el porcentaje de fimbriación que condujo a un importante riesgo de la formación de células sin fimbrias. Estos autores le atribuyen a CIP, la capacidad, a dosis subinhedoras, de inhibir la síntesis proteica fimbrial, mediante la represión de la transcripción de los genes de las fimbrias sin producir modificaciones cualitativas en las mismas, proceso que ocurriría *a posteriori* de la reacomodación, reparación, de la bacteria al ambiente con la droga.

Aprovechando la capacidad de afectar la pérdida de fimbrias de quinolonas, ya observada por nosotros [1], investigamos la acción de concentraciones subinhedoras de CIP sobre la alteración, borramiento o aparición de adhesinas aberrantes en cepas de ECEP.

Tabla 1: Diámetro de la zona de "swarming" de cepas de ECEP sometidas a concentraciones sub-inhedoras de ciprofloxacina a diferentes horas según método de Braga y col. [13]

	Control	Promedio ± DS Concentraciones sub-inhedoras	
		¼ CIM	½ CIM
T0	4,21 ± 0,20	4,40 ± 0,27	4,03 ± 0,21
T1	4,21 ± 0,20	4,40 ± 0,27	4,03 ± 0,21
T2	4,20 ± 0,22	4,38 ± 0,27	4,05 ± 0,22
T3	6,86 ± 1,84	6,33 ± 0,79	5,93 ± 0,90
T4	11,76 ± 1,67	11,09 ± 2,75	8,45 ± 1,55
T5	20,63 ± 2,65	15,92 ± 3,87	11,62 ± 2,75
T6	27,65 ± 4,08	21,82 ± 5,64	15,14 ± 4,73

T: tiempo. DS: Desvío Standard. CIM: concentración inhibitoria mínima.

La lectura de los radios de la zona de "swarming", a diferentes tiempos, representan la medida de la movilidad de las cepas.

Tabla 2: Diámetro de la zona de "swarming" de cepas de ECEP sometidas a concentraciones sub-inhedoras de ciprofloxacina a diferentes horas según modificación de la Cátedra.

Tiempo	Control	Promedio ± DS Concentraciones sub-inhedoras	
		¼ CIM	½ CIM
T0	3,84 ± 0,20	4,07 ± 0,35	4,20 ± 0,54
T1	3,84 ± 0,20	4,07 ± 0,35	4,20 ± 0,54
T2	3,83 ± 0,22	4,17 ± 0,41	4,15 ± 0,54
T3	6,36 ± 1,77	6,53 ± 1,23	6,33 ± 1,32
T4	11,09 ± 1,95	12,34 ± 1,72	10,57 ± 1,56
T5	19,66 ± 2,84	19,49 ± 2,87	16,75 ± 3,87
T6	26,71 ± 4,45	27,45 ± 4,80	19,75 ± 5,20

T: tiempo. DS: desvío Standard. CIM: concentración inhibitoria mínima.

La lectura de los radios de la zona de "swarming" a diferentes tiempos, representan la medida de la movilidad de las cepas.

Cuando investigamos la acción de CIP en diferentes concentraciones sub-CIM sobre el gen *bfp*, que codifica la fimbria BFP (asociada al patrón de adherencia localizada) en las nueve cepas de ECEP seleccionadas, encontramos que en concentración de 1/2 de CIM disminuye la detección de *bfp* en un 22% (2/9), a 1/4 de CIM el 11% (1/9), a 1/8 de CIM el 22% (2/9) y a 1/16 el 11% (1/9). (Tabla 4).

Estos hallazgos nos permiten afirmar que, en las condiciones de nuestro estudio, la disminución en la detección del gen *bfp*, no fue de magnitud tal que nos posibilite especular sobre la alteración de este importante factor de virulencia involucrado en la adhesión.

Autores como Kovarik, Hoepelman y Verhoef en 1989 [21] no encontraron una significativa inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* por CIP. Mientras que Lobubeyre y col. [2] trabajando con pefloxacina refieren el requisito del magnesio para que la pefloxacina alcance el LPS (lipopolisacárido) de la bacteria y ejerza la acción de antiadhesión, ya que la asociación magnesio-LPS induci-

ría a la desorganización de la membrana externa, con la consecuente pérdida de fimbrias. Otras posibles variables, como la concentración de magnesio usada, deben ser nuevamente estudiada, dada la importancia de este catión en el mecanismo de antiadhesión de antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias como quinolonas particularmente.

Ensayo de inhibición de hemolisinas

Nosotros hemos realizado un trabajo [22] en el que evaluamos la actividad subinhibitoria de rifampicina sobre la capacidad hemolítica de especies de *Aeromonas* spp. provenientes de niños con y sin diarrea, donde se logró la reducción de la capacidad hemolítica (posiblemente ligada a la enterotoxigenidad) en por lo menos el 75% de las cepas

Si bien rifampicina no es un antibiótico usado en la terapéutica de infecciones ocasionadas por *Escherichia coli* diarrogénico, este ensayo lo tomamos como un buen modelo para aplicar a otros agentes antimicrobianos de uso en dichas infecciones, por lo que decidimos ampliar

Tabla 3: Fagocitosis de polimorfonucleares de cepas ECEP sometidas a concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina

Cepa Nº	sin ATB	con ATB	
		¼ CIM	½ CIM
2	9*	8	5
3	16	19	18
4	15	6	6
5	5	3	3
7	13	14	11
8	28	13	11

* Número de bacterias cada 100 PMN observados.

Tabla 4: Detección del gen *bfp* en las cepas tratadas con diferentes concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina.

Cepa Nº	Concentraciones de ciprofloxacina			
	1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM	1/16 CIM
1	+	-	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	+	-
4	-	+	+	+
5	+	+	+	+
6	-	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+

(+)= Ensayos en los que se detectó el gen *bfp*. (-)= Ensayos en los que no se detectó el gen *bfp*. CIM: concentración inhibitoria mínima.

las experiencias a otros microorganismos involucrados en la diarrea bacteriana, que se aíslan frecuentemente en nuestro medio, como ECEP e investigar la acción de CIP sobre las hemolisinas.

En todos los casos (cepas no sometidas y sometidas a concentraciones subinhibitorias de CIP) el número de células presentes permaneció superior a 10^5 UFC/ml (estimado por recuento).

Al analizar los resultados obtenidos y aplicar tratamiento estadístico no se observaron diferencias significativas en la producción de hemolisinas de las cepas sometidas a concentraciones subinhibitorias de CIP (Tabla 5).

Aunque 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 sub-letales de antimicrobianos, es reversible, al ser removido el antimicrobiano, y que dichas cepas, con resistencia adquirida por este tipo de exposición a drogas sub-letales, tienen una virulencia disminuida, manifestada por su curva de crecimiento disminuido y una reducción en la expresión de sus enzimas [21].

Si bien 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 mínima concentración de la droga (CIM) en el sitio de la infección, ya enumeramos numerosas evidencias que 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 (CIM) sugiriendo que dichas concentraciones, pueden ser eficaces al alterar funciones o estructuras involucradas en el desarrollo de la misma.

Dados algunos resultados aportados en este trabajo, apostamos a esta última propuesta y creemos que se hace evidente la necesidad de continuar con estos estudios, dada la complejidad de bacterias como ECEP, que ya no constituyen un grupo homogéneo de microorganismos, desde que fueran identificadas cepas típicas y atípicas que difieren en características genéticas, serotipos y factores de virulencia [23].

El continuar con estos estudios ampliando el número de cepas y ensayando otros agentes antimicrobianos de uso en clínica, nos posibilitaría establecer su interacción, en concentraciones sub-letales, sobre algunos factores de virulencia y relacionarla con la farmacocinética de las drogas a fin de optimizar esquemas terapéuticos simples para el tratamiento en las infecciones no complicadas, disminuyendo las reacciones adversas que puedan algunas drogas ocasionar en el huésped. Aquellos agentes que interfieran o alteren estos factores, podrían tener efectos beneficiosos en la profilaxis o en la terapéutica de estas enfermedades.

La importancia de estudiar este efecto radica en la utilidad de poder abordar la enfermedad diarreica con antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias, los que, al alterar factores de virulencia, (que son los que producen los efectos no deseados en el huésped) sin necesidad de eliminar la bacteria, (lo que sí requeriría concentraciones inhibitorias), sería beneficioso.

Este hecho podría tener implicancia en la terapéutica anti-infecciosa con otros antimicrobianos a ensayar, los que podrían ser administrados en concentraciones subinhibitorias, disminuyendo el riesgo de su uso, a dosis terapéuticas. ●

Tabla 5: Acción de concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina sobre la producción de hemolisinas de cepas ECEP.

Cepa Nº:	sin antibiótico	Concentración de ciprofloxacina		
		1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM
4	0.665	0.656	0.726	0.654
5	0.687	0.656	0.695	0.646
8	0.670	0.676	0.700	0.645
Promedio	0.67	0.66	0.71	0.65
Desviación estándar	0.01	0.01	0.02	0.005
Control (+)	0.725	ND	ND	ND
100% Hemólisis	0.760	ND	ND	ND
0% Hemólisis	0.075	ND	ND	ND

CIM: concentración inhibitoria mínima. ND: no determinada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oviedo, P.; Quiroga, M.; Pegels.; Husulak, E.; Vergara, M.
Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors. J. Chemother. 12(6): 487-490. 2000.
2. Loubeyre, C.; Desnottes, J.; 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. Parissi-Crivelli, A.; Parissi-Crivelli, J.; Girón, J.
Recognition of enteropathogenic Escherichia coli virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. J. Clin. Microbiol. 38(7): 2696-2700. 2000.
4. Nataro, J.; Kaper, J.
Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 11(1):142-201.1998.
5. Ohlsen, K.; Ziebuhr, W.; Koller, K-P.; Hell, W.; Wichelhaus, T.A.; Hacker, J.
Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 42(11):2817-2823. 1998.
6. Sonstein, S.; Burnham, J.
Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 16(4):277-289. 1993.
7. Hacker, J.; Ott, M.
Effects of low subinhibitory concentrations of antibiotics on expression of virulence gene cluster of pathogenic Escherichia coli by using a wild-type gene fusion. Int. J. Antimicrob. Agents. 2:263-270. 1993.
8. Khardouri, N.; Wong, E.; Nguyen, H.; Jeffery-Wiseman, C.; Wallin, E.; Tewari, R.; Bodey, G.
Effect of subinhibitory concentrations of clindamycin and trospectomycin on the adherence of Staphylococcus epidermidis an in vitro model of vascular catheter colonization. J. Infect. Dis. 164:108-113. 1991.
9. Hatano, K.; Nishino, T.
Morphological alterations of Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes exposed to cefdinir a new oral broad spectrum cephalosporin. Chemotherapy (Tokyo). 40:73-79. 1994.
10. Hammami, A.; Agueda, L.; Archambaud, M.; Matry, N.; Lapchine, L.; Chabanon, G.
In vitro study of the effects of oxolinic acid at subinhibitory concentration on activity of hemagglutinins and adhesion to uroepithelial cells by Escherichia coli. Pathol. Biol. (Paris). 35:545-550. 1987.
11. Reid, G.; Sharma, S.; Advikolanu, K.; Tieszer, C.; Martin, R.; Bruce, A.
Effects of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin on in vitro adhesion and survival of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 38(7): 1490-1495. 1994.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S12. Vol 22 N° 1 January 2002.
13. Braga, P.; Sala, M.; Dal Sasso, M.
Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rufloxacin on bacterial virulence factors. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1013-1019. 1999.
14. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos Malbrán".
Diagnóstico de Escherichia coli productor de Tox Shiga. Manual de Procedimientos. 2000.
15. Koneman, E.; Stephen, D.; Dowell, V.R.; Janda, W.; Sommers, H.; Winn, W.
Diagnóstico Microbiológico. 3° edición. Editorial Panamericana.
16. Gunzburg, S.; Tornieporth, T.; Riley Lee, W.
Identification of enteropathogenic Escherichia coli for PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. J. Clin. Microbiol. 33:1375-1377. 1995.
17. Gyles, C.; Johnson, R.; Gao, A.; Ziebell, K.; Pierard, D.; Aleksic, S.; Boerlin, P.
Association of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing Escherichia coli of human and bovine origins. Appl. Environ. Microbiol. 64(11):4134-4141. 1998.
18. May, A.; Gleason, T.; Sawyer, R.; Pruett, T.
Contribution of Escherichia coli alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. Infect. Immun. 68(1):176-183. 2000.
19. Braga, P.C.; Dal Sasso, M.; Maci, S.; Reggio, S.; Piatti, G.
Influence of subinhibitory concentrations of brodimoprim and trimethoprim on the adhesiveness, hydrophobicity, hemoagglutination and motility of Escherichia coli. Chemotherapy. 41:50-58. 1995.

20. Abalia, I.; Rodríguez, E.; Umaran, A.; Lacalle, J.; Sarasua, A.; Huarte, M.; Bilbao, J.R.

Modulación de la fimbriación P por ciprofloxacina en Escherichia coli uropatógena. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 15:255-259. 1997.

21. Kovarik, J.M.; Hoepelman, I.M.; Verhoef, J.

Influence of fluoroquinolones on expression and function of P fimbria in uropathogenic Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 684-688. 1989.

22. 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. 15:243-244. 2000.

23. Trabulsi, L.; Keller, R.; Tardelli Gomes, T.

Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerging Infect. Dis. 8:508-513. 2002.

Recibido: 08 de Octubre de 2003.

Aprobado: 19 de Mayo de 2004.