

Original

Disminución de la actividad bactericida del ciprofloxacino en mutantes de *Salmonella* generados tras exposición repetida a diversas fluoroquinolonas

L. Cebrián, J.C. Rodríguez, I. Escribano, M. Ruiz y G. Royo

Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante)

RESUMEN

Después de generar in vitro mutantes de *Salmonella* spp. con sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas tras su exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de estos fármacos y caracterizar las alteraciones del gen *gyrA*, hemos determinado la modificación de la actividad bactericida que presenta el ciprofloxacino sobre los mutantes obtenidos. La pérdida de la actividad bactericida del ciprofloxacino se detecta en todos los mutantes, pero es mayor en los provenientes de cepas resistentes al ácido nalidíxico. Esto puede ayudar a explicar los fracasos terapéuticos observados con algunos tratamientos con fluoroquinolonas frente a este tipo de cepas. Además, nuestro modelo evalúa las primeras interacciones que se producen entre el microorganismo y los antibióticos, y pone de manifiesto que la pérdida de actividad bactericida del ciprofloxacino es un proceso que se produce tras la exposición a cualquiera de las fluoroquinolonas probadas.

Palabras clave: *Salmonella* - Actividad bactericida - Fluoroquinolonas

Decrease in bactericidal activity of ciprofloxacin in Salmonella mutants generated following repeated exposure to various fluorquinolones

SUMMARY

Salmonella mutants with reduced fluoroquinolone susceptibility were generated in vitro following repeated exposure to subinhibitory concentrations of the drugs and the alterations in the *gyrA* gene were characterized. Afterwards, the change in bactericidal activity exhibited by ciprofloxacin against the resulting mutants was determined. A decrease in the bactericidal activity of ciprofloxacin was found in all the mutants, but was more pronounced in mutants of nalidixic acid-resistant strains. This may help to explain the therapeutic failures sometimes described when fluoroquinolones are used in the treatment of these strains. In addition, our model evaluates the first interactions produced between the microorganism and the antibiotics, and demonstrates that the loss of bactericidal activity of ciprofloxacin occurs following exposure to all of the fluoroquinolones tested.

Key words: *Salmonella* - Bactericidal activity - Fluorquinolones

INTRODUCCIÓN

La resistencia antibiótica en el género *Salmonella* es un problema de salud pública muy importante en Europa, ya que el 40% de los aislamientos presentan resistencia al menos a un fármaco y se detecta un 18% de cepas multirresistentes. La resistencia clínica al ciprofloxacino es rara (0,5% de las cepas), pero la resistencia al ácido nalidíxico es más habitual (1, 2). Este elevado porcentaje de resistencia se ha asociado en parte a la utilización de estos antimicrobianos en veterinaria, por lo que se han puesto en marcha sistemas de control para evitarlo (3-5).

Recientemente hemos caracterizado las mutaciones que aparecen en los genes *gyrA* y *parC* en mutantes generados tras exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de varias fluoroquinolonas (6). Con objeto de continuar con la caracterización de estos mutantes generados *in vitro* hemos estudiado las variaciones de la actividad bactericida del ciprofloxacino frente a éstos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

Se ensayaron dos cepas clínicas de *Salmonella enteritidis*, dos de *Salmonella hadar* y dos de *Salmonella typhimurium* obtenidas en nuestro medio. Una cepa de cada serotipo era resistente al ácido nalidíxico; el serotipo Enteritidis presentaba mutación en *Asp87/Tyr* del QRDR de *gyrA* y los otros dos serotipos en *Asp87/Asn*. No se detectaron mutaciones en *parC*. Hasta el momento del estudio, las cepas se mantuvieron congeladas a -70°C en tripticasa soja-glicerol.

Antibióticos ensayados en la generación de mutantes

El estudio se realizó con ciprofloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, esparfloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino.

Técnica utilizada para la generación de mutantes

Se generaron mutantes resistentes mediante exposiciones repetidas a concentraciones subinhibitorias y constantes de cada quinolona (1/8 de su CMI). Cuando aparecía un mutante con sensibilidad disminuida a una de ellas (elevación de 2 CMI) se confirmaba que los cambios eran estables mediante cinco pases sin antibiótico; posteriormente se volvía a determinar la CMI para confirmar esta disminución de la sensibilidad (6).

Estudio de la variación de la actividad bactericida del ciprofloxacino

Realizamos esta determinación en las cepas salvajes y en los mutantes generados *in vitro*. En 5 ml de caldo Mueller-Hinton con 4 mg/l de ciprofloxacino se incubaron las cepas durante 5 horas y se cuantificó el crecimiento bacteriano a las 0, 1, 3 y 5 horas. Como controles se realizaron las mismas determinaciones en un tubo sin antibiótico. La actividad bactericida se expresa mediante la diferencia de UFC/ml entre el tubo control y el tubo con ciprofloxacino (expresado en logaritmos) a distintos intervalos de tiempo ($D_{\text{control-cipro}}$).

Análisis estadístico

Tras comprobar que los datos presentaban distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, el análisis estadístico se realizó con tablas ANOVA y el programa informático SSPS.

RESULTADOS

Variación en la actividad bactericida del ciprofloxacino frente a los mutantes generados

La actividad bactericida de 4 mg/l de ciprofloxacino disminuye en todos los mutantes generados, tanto si provienen de cepas inicialmente sensibles al ácido nalidíxico (CMI de ciprofloxacino $<0,125$ mg/l) como de cepas resistentes a este antibiótico (CMI de ciprofloxacino entre 0,125 y 1 mg/l).

El ciprofloxacino presenta mayor actividad bactericida frente a las cepas salvajes sensibles al ácido nalidíxico ($D_{\text{control-cipro}} = 5,69$) que frente a las cepas salvajes resistentes a éste ($D_{\text{control-cipro}} = 3,65$). También presenta mayor actividad bactericida frente a mutantes de cepas sensibles al ácido nalidíxico ($D_{\text{control-cipro}} = 5,29$) que frente a mutantes de cepas resistentes ($D_{\text{control-cipro}} = 4,20$).

La actividad bactericida del ciprofloxacino fue variable en función del serotipo, siendo más activa frente al Enteritidis. Los datos se detallan en la Tabla 1 y no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La resistencia de *Salmonella* a las fluoroquinolonas es un proceso complejo. Existen en la naturaleza muchas cepas con sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas y

Tabla 1. Variaciones de la actividad bactericida del ciprofloxacino en los distintos mutantes desarrollados.

Cepas	(D _{control-cipro}) a 1 hora	(D _{control-cipro}) a 3 horas	(D _{control-cipro}) a 5 horas
Cepas salvajes sensibles al ácido nalidíxico	1,70	3,56	5,69
Cepas salvajes resistentes al ácido nalidíxico	0,48	2,98	3,65
Mutantes de las cepas sensibles al ácido nalidíxico	1,88	4,59	5,40
Mutantes de las cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,54	3,41	4,73
Mutantes de <i>S. hadar</i> sensibles al ácido nalidíxico	1,82	4,90	5,41
Mutantes de <i>S. typhimurium</i> sensibles al ácido nalidíxico	0,71	3,47	3,81
Mutantes de <i>S. enteritidis</i> sensibles al ácido nalidíxico	3,1	5,41	7,0
Mutantes de <i>S. hadar</i> resistentes al ácido nalidíxico	0,39	3,55	4,17
Mutantes de <i>S. typhimurium</i> resistentes al ácido nalidíxico	0,89	3,72	5,56
Mutantes de <i>S. enteritidis</i> resistentes al ácido nalidíxico	0,34	2,96	4,63
Mutantes seleccionadas por ciprofloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	1,47	4,69	5,41
Mutantes seleccionadas por ofloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	3,18	4,13	5,23
Mutantes seleccionadas por esparfloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	0,89	3,96	4,79
Mutantes seleccionadas por moxifloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	2,07	6,25	6,33
Mutantes seleccionadas por trovafloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	1,88	3,70	4,83
Mutantes seleccionadas por gatifloxacino a partir de cepas sensibles al ácido nalidíxico	1,77	5,06	5,84
Mutantes seleccionadas por ciprofloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	1,24	3,8	4,39
Mutantes seleccionadas por ofloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,59	3,61	5,15
Mutantes seleccionadas por esparfloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,28	2,64	5,41
Mutantes seleccionadas por moxifloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,26	3,11	4,65
Mutantes seleccionadas por trovafloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,33	3,26	4,22
Mutantes seleccionadas por gatifloxacino a partir de cepas resistentes al ácido nalidíxico	0,48	4,01	4,89

resistentes al ácido nalidíxico, pero muy pocas que presenten resistencia elevada a las fluoroquinolonas. Generalmente estas cepas presentan mutaciones en *gyrA*, aunque también están implicados mecanismos que disminuyen la acumulación de fluoroquinolonas en la bacteria (7).

Al evaluar la actividad bactericida del ciprofloxacino observamos que está relacionada con la resistencia al ácido nalidíxico, aunque todos los mutantes con sensibilidad disminuida al ciprofloxacino, generados tras exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de fluoroquinolonas, adquieren mecanismos de resistencia que disminuyen la actividad bactericida del ciprofloxacino sobre ellos, independientemente de la resistencia al ácido nalidíxico de la cepa salvaje.

La pérdida de la actividad bactericida del ciprofloxacino es un proceso que se produce en varios pasos, ya que se mantienen las diferencias entre mutantes provenientes de cepas sensibles y resistentes al ácido nalidíxico.

Recientemente el CLSI ha modificado la interpretación del punto de corte de las fluoroquinolonas y *Salmonella* para prevenir los fracasos terapéuticos (8), y nuestro traba-

jo apoya esta propuesta, ya que hemos diseñado un modelo que simula la aparición de mutantes resistentes tras la exposición a concentraciones subinhibitorias de fluoroquinolonas y hemos observado que la actividad bactericida del ciprofloxacino disminuye. Esta modificación en la interpretación de la sensibilidad al ciprofloxacino fue propuesta previamente por el grupo MENSURA (9, 10).

La resistencia de *Salmonella* a las fluoroquinolonas es un proceso en el que participan distintos mecanismos. El momento de la aparición de estos mecanismos y su importancia en la resistencia es un hecho poco conocido, pero que puede estar influido por el serotipo, la resistencia previa al ácido nalidíxico, la forma de exposición, las características del huésped y la estructura química de los antibióticos, aunque nuestro trabajo no encuentra diferencias entre los diferentes fármacos estudiados. Nuestro modelo evalúa las primeras interacciones que se producen entre el microorganismo y las concentraciones subinhibitorias constantes del antibiótico, y aporta datos que pueden ayudar a valorar la forma de interpretar los criterios de sensibilidad de *Salmonella* al ciprofloxacino.

Correspondencia: Juan Carlos Rodríguez Díaz, Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Camí de L' Almàssera nº 11, 03203 Elche (Alicante). Tel.: 966 67 90 48, e-mail: micro_elx@gva.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Threlfall, E.J., Fisher, I.S., Berghold, C. y cols. *Antimicrobial drug resistance in isolates of Salmonella enterica from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: Results of international multi-centre surveillance*. Euro Surveill 2003; 8: 41-45.
2. Stock, I., Wiedemann, B. *Natural antibiotic susceptibility of Salmonella enterica strains*. Int J Antimicrob Agents 2000; 16: 211-217.
3. Witte, W. *Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment*. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 321-325.
4. Moreno, M.A., Domínguez, L., Teshager, T., Herrero, I.A., Porrero, M.C. *Antibiotic resistance monitoring: The Spanish programme. The VAV Network. Red de vigilancia de resistencias antibióticas en bacterias de origen veterinario*. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 285-290.
5. Martel, J.L., Tardy, F., Brisabois, A., Lailier, R., Coudert, M., Chaslus-Dancla, E. *The French antibiotic resistance monitoring programs*. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 275-283.
6. Cebrián, L., Sirvent, E., Rodríguez Díaz, J.C., Ruiz, M., Royo, G. *Characterization of Salmonella spp. mutants following exposure to various fluorquinolones*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 134-139.
7. Piddock, L.J., Ricci, V., McLaren, I., Griggs, D.J. *Role of mutation in the gyrA and parC genes of nalidixic-acid-resistant Salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 635-641.
8. Aarestrup, F.M., Wiuff, C., Molbak, K., Threlfall, E.J. *Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for Salmonella spp.?* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 827-829.
9. Hakanen, A., Kotilainen, P., Jalava, J., Siitonen, A., Houvinen, P. *Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in Salmonella and validation of nalidixic acid screening test*. J Clin Microbiol 1999; 37: 3572-3577.
10. Ruiz, M., Sirvent, E., Hernández, C., Rodríguez, J.C., Royo, G. *Evolución de las resistencias de las quinolonas en Salmonella enterica en nuestro medio*. Rev Esp Quimioterap 1999; 12: 366-368.