

Medicentro 2000;4(1)

UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS VILLAS

ARTÍCULO ORIGINAL

## Inducción de la resistencia “in vitro” al G-1. Estudio preliminar

Por:

Dr. Ricardo Medina Marrero<sup>1</sup>, Dra. Milagros García Bernal<sup>2</sup> y Dr. José Antonio Rodríguez Rodríguez<sup>3</sup>

1. Lic. Ciencias Farmacéuticas. Profesor Adjunto de la Facultad Química-Farmacia. Aspirante a Investigador del Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Villa Clara.
2. Lic. Ciencias Farmacéuticas. Master en Bacteriología-Micología. Aspirante a Investigador del Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas. Villa Clara.
3. Dr. Medicina. Especialista de II Grado en Microbiología. Laboratorio de Microbiología. Hospital "Arnaldo Milián Castro". Santa Clara. Villa Clara. Profesor Titular. ISCM-VC.

### RESUMEN

**Introducción:** El 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) es un nuevo compuesto vinilfuránico de amplia actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras del género *Candida* y hongos filamentosos.

**Objetivo:** Inducir la resistencia “in vitro” al G-1 para predecir cuán factible será su uso en la práctica clínica.

**Métodos:** Se realizó la inducción “in vitro” de resistencia al producto vinilfurano 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1), a través de pases sucesivos en caldo Mueller-Hinton con G-1, en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

**Resultados:** Un primer estudio arrojó que después de 15 pases consecutivos no hubo incremento significativo de valor de la mínima concentración inhibitoria respecto al valor inicial para cada una de las cepas. Un segundo estudio comparativo entre el G-1 y la gentamicina en *Staphylococcus aureus* mostró que después de 20 pases consecutivos, hubo un ligero incremento del valor de la mínima concentración inhibitoria de 8 a 32 µg/ml, mientras que para la gentamicina el aumento fue de 0,125 y 0,25 µg/ml hasta 4 y 2 µg/ml, en las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas, respectivamente. Conjuntamente se determinó la frecuencia de mutación espontánea al *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al G-1, a una concentración igual a 2, 4 y 8 veces el valor inicial de la misma. No se aislaron mutantes resistentes al G-1 a ninguna de las concentraciones ensayadas.

**Conclusiones:** Este estudio indica que es difícil inducir la resistencia “in vitro” al G-1, lo cual puede ser un buen augurio para su uso en la terapéutica.

**Descriptores DeCS:** resistencia microbiana a las drogas, tests de sensibilidad microbiana, antibióticos

## SUMMARY

**Introduction:** The 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) is a new vinylfuranic compound of wide antimicrobial activity for grampositive and gramnegative bacteria, yeast of *Candida* species and filamentous fungi.

**Objective:** Induction of "in vitro" resistance to G-1 to predict its practical use in the clinical practice.

**Method:** The induction of "in vitro" resistance to the vinylfuranic product 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene (G-1) was carried out using successive passes in Mueller-Hinton's culture broth in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains.

**Results:** In a first study it was found that after 15 successive passes there was not significant increase in the value of minimal inhibitory concentration regarding the initial value for each of the strains. A second comparative study of G-1 and Gentamicin in *Staphylococcus aureus* showed that after 20 successive passes there was a slight increase of the value of the minimal inhibitory concentration from 8 to 32 µg/ml, while for Gentamicin the increase was from 0,125 and 0,25 µg/ml to 4 and 2 µg/ml in the *Staphylococcus aureus* strains studied, respectively. At the same time, the spontaneous mutation rate of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 to G-1 was determined at a concentration of 2,4 and 8 fold the initial value. No mutants resistant to G-1 were found in any of the essay concentrations.

**Conclusion:** This study shows that it is difficult to induce "in vitro" resistance to G-1, what can be a good prediction feature for its use in therapy.

**Subject headings:** drug resistance, microbial, microbial sensitivity tests, antibiotics

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos es un grave problema terapéutico, agudizado por el uso masivo e indiscriminado de los antibióticos, lo que propicia la selección de bacterias resistentes<sup>1</sup>.

La emergente resistencia bacteriana a múltiples antibióticos es un fenómeno que concierne a la clínica e industria farmacéutica, ya que ésta es la mayor causa del fracaso en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Es igualmente preocupante la relativa carencia de nuevos agentes antibióticos en el mercado; particularmente aquellos con mecanismos de acción novedosos a los que las bacterias presumiblemente les sería más difícil desarrollar resistencia. Por esto se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes, contra aquellos microorganismos altamente resistentes que sean capaces de no inducir el desarrollo de resistencia rápidamente en las bacterias contra ellos mismos.

El producto 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroeteno, denominado G-1<sup>2-6</sup> es un nuevo compuesto vinilfuránico sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas con un amplio espectro de actividad (Silveira EA y col. Efecto antimicrobiano de la combinación "in vitro" y su principal impureza /Tesis/. Universidad Central, Santa Clara, 1999). En estudios "in vitro" se ha demostrado que el G-1 es altamente activo contra un amplio rango de bacterias patógenas, incluyendo a aquellas cepas resistentes a antibióticos usados convencionalmente, por lo que se hace necesaria la inducción de la resistencia microbiana a este agente para investigar a través de qué mecanismos la misma se desarrollará en la práctica. En este trabajo nos trazamos como objetivo inducir la resistencia in vitro al G-1 en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*<sup>3</sup> y *Escherichia coli*<sup>1</sup> procedentes del Hospital Provincial Clínico Quirúrgico "Arnaldo Milián Castro" de Santa Clara y dos cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. La sustancia de ensayo fue el producto 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1), principio activo sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas. La sustancia de referencia fue la solución de sulfato de gentamicina producida por la Merck. Se emplearon caldo y agar Mueller-Hinton recomendados para las pruebas de susceptibilidad "in vitro" a agentes antimicrobianos según las NCCLS<sup>7</sup>.

Se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) a cada una de las cepas en caldo Mueller-Hinton, por el método de macrodilución en caldo<sup>7</sup>. Se ensayó un rango de concentraciones de 128-2 µg/mL para el G-1 y de 16-0.0078 µg/mL para la gentamicina, utilizando un inóculo de aproximadamente  $2 \times 10^5$  UFC/mL.

En un primer experimento, después de determinar la MCI inicial e incubar toda la noche a 37°C, el tubo de cada serie que mostró turbidez a la más alta concentración de G-1 y gentamicina, fue subcultivado en una nueva serie de dilución del mismo producto<sup>8</sup>. Este procedimiento se realizó 15 veces para el G-1 frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En un segundo experimento se realizó un estudio comparativo entre el G-1 y la gentamicina, siguiendo la misma metodología, excepto que los subcultivos se realizaron durante 20 pases consecutivos frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico y la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para determinar la frecuencia de mutación espontánea (FME) se preparó un inóculo denso del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se realizaron diluciones seriadas del mismo.

Posteriormente se procedió a sembrar 0,1 ml de cada tubo con espátulas de Drigalsky en tres placas con agar Mueller-Hinton que contenían 2, 4 y 8 veces el valor de la MCI inicial del G-1. La FME se calculó dividiendo el número de mutantes entre el total de viables del inóculo denso. Esta determinación se realizó para cada múltiplo de MCI ensayado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla muestra los valores de MCI inicial de las cepas estudiadas frente al G-1. La MCI para el G-1 frente a las cepas de ensayo fue de 8 y 16 µg/mL.

**Tabla** Valores de la mínima concentración inhibitoria inicial del G-1 frente a los microorganismos de ensayo.

Organismo	MCI (µg/m)
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	16
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	8
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8
<i>Escherichia coli</i> 1	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16

Estas pruebas preliminares de susceptibilidad coincidieron con los resultados informados por otros investigadores, tanto en Cuba<sup>9,10</sup> como en Canadá<sup>11,12</sup>.

Nuestros resultados coinciden con Blondeau et al<sup>11</sup>, quienes evaluaron 222 cepas de *Escherichia coli* y 198 de *Staphylococcus aureus*, por el método de microdilución en caldo donde encontraron valores de MCI para el G-1 en el rango de 4-32 µg/mL.

En nuestro estudio los valores de MCI para la gentamicina frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 0,125 µg/mL; dicho valor está comprendido en el rango que establece las NCCLS; mientras que en la cepa clínica la MCI fue de 0,25 µg/mL. Blondeau et al<sup>11</sup> compararon la actividad "in vitro" del G-1 y la gentamicina frente a bacterias grampositivas y gramnegativas incluyendo cepas de *Staphylococcus aureus*, y obtuvieron valores de MCI para la gentamicina en el rango de 2-8 µg/mL.

El comportamiento de las cepas de ensayo después de 15 días de subcultivo repetido en caldo con G-1 en el rango de concentraciones desde 128-2 µg/mL, se encuentra representado en las figuras 1 y 2. El valor de MCI para las cepas de *Staphylococcus aureus* 2, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* 1, tuvo un ligero aumento desde 8 hasta 16 µg/mL. La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y la de aislamiento clínico *Staphylococcus aureus* 1 mantuvieron invariable el valor de la MCI durante los 15 pases sucesivos (16 µg/mL). Sin embargo, en los estudios de mecanismo de acción del G-1 con cepas de *Candida* hubo un incremento del valor de la MCI de 8 veces su valor inicial, al exponer dicho microorganismo a concentraciones incrementadas de G-1<sup>12</sup>.

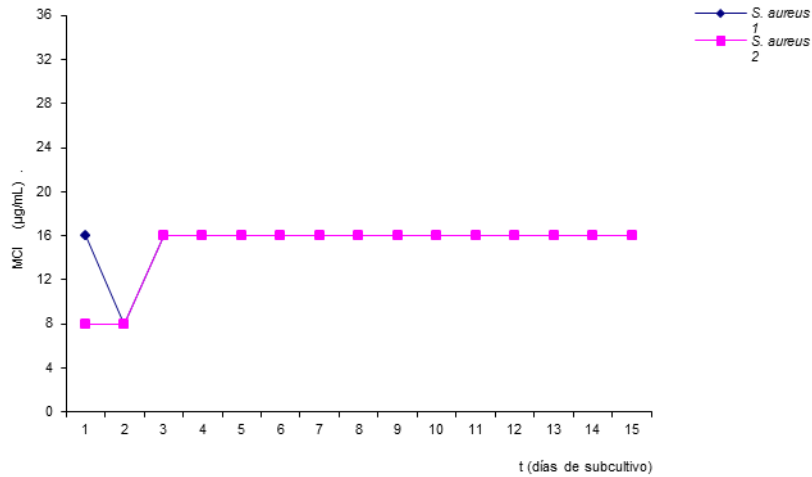


Fig. 1 Subcultivo en caldo + G-1

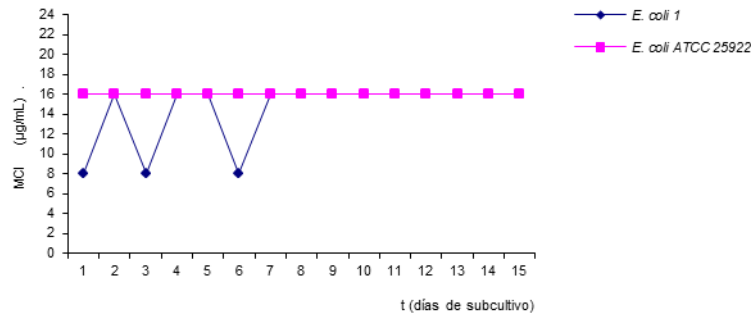


Fig. 2 Subcultivo en caldo + G-1

Medina et al realizaron un estudio con *Pseudomonas aeruginosa*, donde se mantuvo invariable el valor de MCI durante 20 pases sucesivos (8 µg/mL); lo cual unido con un valor de frecuencia bajo, avalan la marcada sensibilidad de este microorganismo frente al G-1. (Medina R y col. Inducción de resistencia "in vitro" al G-1 frente a cepas de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. /Tesis/. Universidad Central. Santa Clara, 1999).

En las figuras 3 y 4 aparece el comportamiento del G-1 y la gentamicina en una cepa de aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* 3 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sometidas a 20 pases sucesivos. En el caso del G-1, la MCI aumentó solamente de un valor inicial de 8 µg/mL a 16 y 32 µg/mL al final del experimento, lo que representa 2 y 4 veces el valor inicial de la MCI, respectivamente. Sin embargo, para la gentamicina hubo un incremento del valor de la MCI desde 0,125 y 0,25 µg/mL hasta 4 y 2 µg/mL, lo que representa 8 y 128 veces el valor inicial de la MCI, respectivamente.

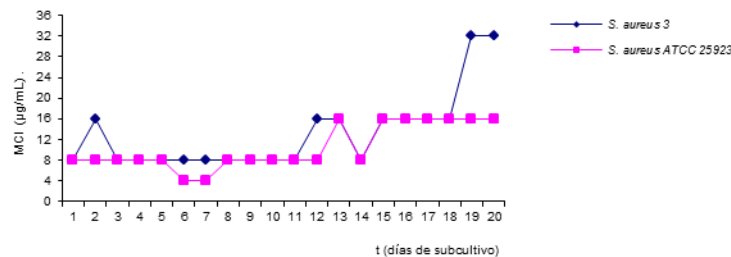


Fig. 3 Subcultivo en caldo + G-1

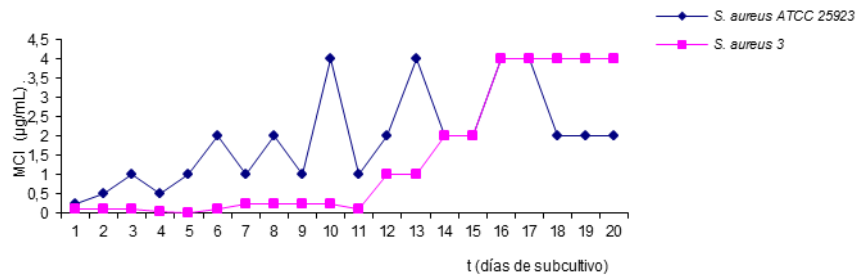


Fig. 4 Subcultivo en caldo + gentamicina

Reeves et al<sup>13</sup> realizaron un estudio de inducción de resistencia frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* por exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino; donde la MCI final después de 10 días fue 16 veces mayor que la observada inicialmente.

En los ensayos de frecuencia de mutación espontánea de la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al G-1, no se aislaron mutantes resistentes al G-1 a ninguna de las concentraciones ensayadas.

En el estudio de Medina et al realizado con cepas de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, los valores de frecuencia obtenidos fueron bajos; los valores de frecuencia más bajos se obtuvieron cuando se ensayó el G-1 a concentraciones de 8 x MCI, especialmente para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Estos estudios indican que parece ser difícil inducir la resistencia al G-1 "in vitro", lo cual puede ser un buen augurio para su uso en la terapéutica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García-Rubí E, Sierra MJG, Ponce DL. Uso de antibióticos en la consulta externa del Instituto Nacional de la nutrición "Salvador Zubirán" Rev Invest Clin 1991;43:113-118.
2. Castañedo NR, Goizueta RD, González O, Pérez JA, González J, Silveira EA, et al. Inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. US solicitud 60-008,011. 1995.p. 27.
3. Castañedo NR, Goizueta RD, González O, Pérez JA, González J, Silveira EA, et al. Inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. European solicitud 95 500056.7/1270. 1995.p.21.
4. Castañedo NR, Goizueta RD, González O, Pérez JA, González J, Silveira EA, et al. Inventores. Procedimiento de obtención del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno y su acción como microcida. Certificado No. 22446 Resolución No, 2190/1996. ONITEM. Oficina Nacional de Invencciones, Información Técnica y Marcas. Ciudad de La Habana. Cuba. 1996.
5. Castañedo NR, Goizueta RD, González O, Pérez JA, González J, Silveira EA, et al. Inventores Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. Canadá patent 2, 147,594. 1999.
6. Castañedo NR, Goizueta RD, González O, Pérez JA, González J, Silveira EA, et al. Inventores. Procedure for the obtention of 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno and its action as microcide. Japan patent 2, 875,969. 1999.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test (NCCLS). Document M7-A3. Villanova, Pensylvania : National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
8. Watanakunakorn CH. In –vitro selection of resistance of Staphylococcus aureus to teicoplanin and vancomycin. J Antimicrobial Chemotherapy 1990;25:69-72.
9. González O, Silveira EA, Medina R, Machado R, Delgado MS, Castañedo NR, et al. Mínima Concentración inhibitoria (MCI) del G-1 frente a bacterias y levaduras del género Candida. En: Queratofural. Registro de Medicamento de Uso Veterinario No. 211. Laboratorio de Control Estatal de Medicamento Veterinario. Ministerio de la Agricultura. La Habana, 1993.
10. González O, Silveira EA, Conde N, Rodríguez M, Castañedo NR, Estrada A, et al. Actividad antimicrobiana del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno. En: Queratofural. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No. 211. Laboratorio de Control Estatal de Medicamentos Veterinarios. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana 1993.
11. Blondeau J, Castañedo NR, González O, Medina R, Silveira EA. In vitro evaluation of G-1. A novel antimicrobial compound. Antimicrob Agents Chemother 1999;11(2):1663-1669.
12. Craig B. G-1 Mechanism of Action. York Medical Inc. Canadá; 1998. Report No. 11.
13. Reeves DS, Bywater MJ, Holt HA, White LA. In vitro studies with ciprofloxacin, a new 4-quinolone compound. J Antimicrob Chemotherapy 1984;13:333-346.