

## EFFECTO DE VARIOS ANTIBIOTICOS SOBRE CEPAS PATOGENAS DE *E. COLI*

DR. PLUTARCO NARANJO y J. CARRILLO DE MORENO

Departamento de Investigaciones,  
Laboratorios LIFE, Quito

Numerosos autores<sup>1-6</sup> han encontrado que en la etiología de las diarreas, sobre todo de los niños, la *Escherichia coli* juega un papel muy importante. Por reacciones serológicas de aglutinación han podido ser identificadas muchas cepas de *E. coli*, cuyo grado de patogenicidad varía entre las distintas cepas. Cada cepa se califica con 2 números: el primero corresponde al antígeno somático (O) y el segundo, al antígeno flagelar (B).

Benton y colaboradores<sup>7</sup> encontraron, entre 1953 y 1958, que el 56% de los casos de gastroenteritis fueron ocasionados por *E. coli*, en tanto que sólo el 3,99% fue debido a *Salmonella* y el 2,5% a *Shigella*. Las cepas más frecuentes de *E. coli* fueron: la 0111 B4 (75%), la 055 B12 (13%) y la 026 B6 (8%).

En nuestro laboratorio, Muggia<sup>8</sup> encontró, por una parte, que entre 1957 y 1959, la frecuencia de *E. coli* como causa de gastroenteritis había aumentado progresivamente y, por otra, que las cepas patógenas más frecuentes

eran: 0111 B4 (20%), 0119 B14 (20%), 055 B55 (16%), 0127 B8 (10%) y 6% cada una de las cepas: 0126 B16; 0128 B12; 086 B7 y 026 B6.

Greengard y Aliseda<sup>9</sup> encontraron que en muestras de *E. coli* 0111 B4 obtenidas de pacientes, el efecto inhibitorio de la neomicina, a lo largo de un año de ensayos, rápidamente se había atenuado. Es bien conocido, además, el hecho de que para un determinado antibiótico, mientras más tiempo haya sido empleado en una población, más alta es la frecuencia de cepas bacterianas resistentes a dicho antibiótico; desde luego a más del factor tiempo, influye también la naturaleza química de la droga, ya que antibióticos como la estreptomina induce resistencia mucho más pronto que otros como el cloranfenicol.

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar el comportamiento de las principales cepas patógenas de *E. coli*, aisladas en nuestro medio, frente a varios antibióticos: el cloranfenicol y la oxitetraciclina que han sido utiliza-

dos desde hace muchos años, la kanamicina, empleada desde hace pocos años y la colimicina, de reciente uso clínico.

## MATERIALES Y METODOS

**Cepas:** Las cepas de *E. coli* fueron obtenidas de heces de pacientes que sufrían de gastroenteritis aguda o directamente del recto de dichos enfermos.

Tanto para el cultivo como para la identificación serológica de las cepas, se siguió básicamente la técnica aconsejada por el "Standard Methods for the examination of Water and Sewage"<sup>10</sup>, con algunas modificaciones sugeridas por Gerbeau<sup>11</sup>.

**Ensayos con antibióticos:** Para los ensayos de inhibición bacteriana se adoptó el mismo procedimiento descrito en trabajos previos (Naranjo y colaboradores<sup>12-14</sup>) y que esencialmente consiste en: lavar los gérmenes en solución salina y diluir hasta una concentración de  $14.500.000 \pm 2.100.000$ /ml; agregar este "inoculum" a un medio líquido de cultivo, en la proporción de 0,1 ml. por 10 ml.; incubar por 3 horas a 37°, luego agregar el antibiótico, en las concentraciones deseadas y continuar la incubación por un tiempo preestablecido. Cada concentración se ensaya en 5 duplicados y la prueba se repite 2 ó 3 veces. El grado de multiplicación bacteriana se determina cada dos horas nefelométricamente mediante un colorímetro Klett-Summerson.

**Evaluación de la actividad antibacteriana:** La actividad de los antibió-

ticos se evaluó como en trabajos previos<sup>13-14</sup>, en términos de concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) para inhibir la población bacteriana al 50% del control, a las 7 horas de incubación (4 horas bajo la acción del antibiótico). En todos los casos se calculó el valor de p para establecer si la diferencia entre la CE<sub>50</sub> de colimicina y la de los otros antibióticos era o no significativa. Finalmente, a fin de objetivizar gráficamente el grado de sensibilidad de las cepas de *E. coli* estudiadas se elaboró un nomograma en escala logarítmica utilizando para tal objeto los valores recíprocos de la potencia relativa de cada antibiótico.

**Antibióticos:** Los antibióticos utilizados fueron: la colimicina (Colistin, Coly-mycin) en forma de metansulfonato, de un lote que tenía una actividad de 12.000 U/mg.; la kanamicina (Kantrex) en forma de sulfato, el cloranfenicol (Cloromicetin) en forma de base (microcristales hidrosolubles) y la oxitetraciclina (Terramicina), en forma de clorhidrato.

## RESULTADOS

1) **Desarrollo de cepas de *E. coli*, con y sin colimicina.**— Como puede verse en la figura 1, a pesar de que las condiciones experimentales fueron exactamente iguales, la multiplicación bacteriana fue distinta entre las 6 cepas estudiadas. Mientras con la cepa 0119 B14, que fue la que se multiplicó con mayor rapidez, a las 7 horas de incubación se llegó a una concentra-



ción de 1.545 millones de gérmenes por ml., con la cepa 0127 B8, que fue la de más lento crecimiento, se llegó sólo a 803 millones por ml.

La fase de multiplicación logarítmica fue parecida entre 4 de las 6 cepas. Se exceptuaron la cepa 055 B55, cuya fase logarítmica fue más rápida y más corta que de todos los demás y la 0127 B8 cuya fase logarítmica fue muy lenta.

La adición de colimicina no sólo inhibió la multiplicación bacteriana sino que modificó diferentemente la fase logarítmica en las distintas cepas. Las cepas 055 B55 y 0119 B14 modificaron poco la fase logarítmica y fueron las menos sensibles al antibiótico, la cepa 0126 B16, fue la más sensible y la 0111 B4 ocupó una posición intermedia.

2) **Determinación de concentraciones efectivas medias ( $CE_{50}$ ).**— En la

Tabla I se presentan los valores obtenidos así como la probabilidad de que la diferencia entre la  $CE_{50}$  de la colimicina, tomada como término de comparación, y la de los otros antibióticos, sea estadísticamente significativa.

Sobre 5 de las 6 cepas estudiadas, la actividad antibiótica de la colimicina fue superior a la de los otros tres antibióticos. En la cepa 055 B55, la actividad de la colimicina fue igual a la de la kanamicina y el cloranfenicol y ligeramente superior a la de la oxitetraciclina.

Aunque la  $CE_{50}$  de colimicina varió entre las 6 cepas, la diferencia entre la más sensible y la menos fue sólo de 3,6 veces, a diferencia del cloranfenicol, con el cual dicha diferencia fue de 12,6 veces, subiendo a 42,5 para la oxitetraciclina, cifras que revelan que

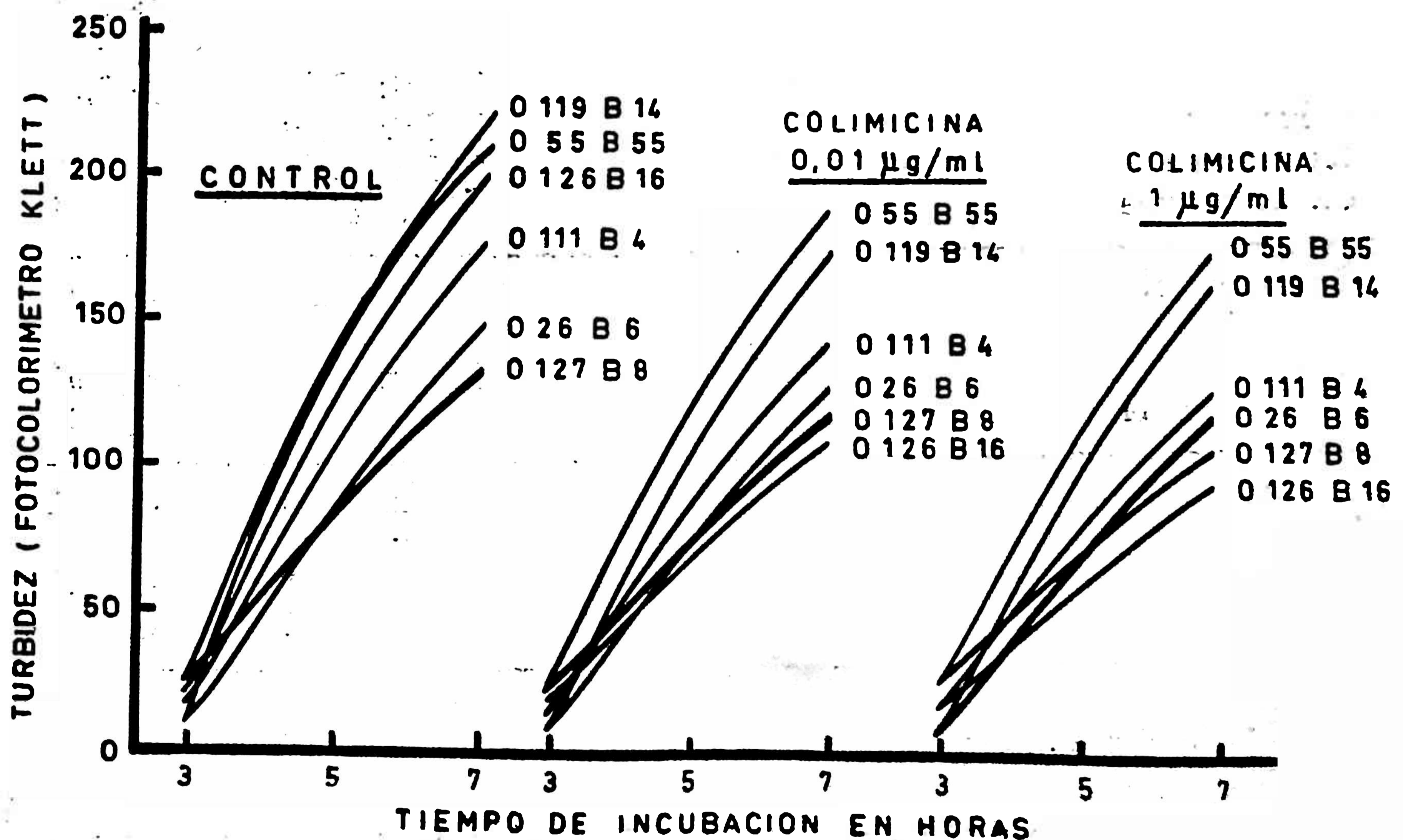


Fig. 1.—Curvas de crecimiento de varias cepas *E. coli*.—A la izquierda, crecimiento normal; a la derecha, crecimiento bajo la influencia inhibitoria de colimicina.

TABLA I

CONCENTRACION EFECTIVA MEDIA DE VARIOS ANTIBIOTICOS PARA INHIBIR EL DESARROLLO DE VARIAS CEPAS DE E. COLI, AL 50% DE LA POBLACION BACTERIANA, DESPUES DE 7 HORAS DE INCUBACION

Antibiótico	Cepa	CE <sub>50</sub> ± S <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
Cloranfenicol	0119 B14	10,29 ± 0,12	< 0,01
Colimicina		1,95 ± 0,14	
Kanamicina		2,93 ± 0,43	< 0,05
Oxitetraciclina		2,88 ± 0,19	< 0,02
Cloranfenicol	0111 B4	3,82 ± 0,41	< 0,01
Colimicina		1,46 ± 0,08	
Kanamicina		2,32 ± 0,11	< 0,01
Oxitetraciclina		3,28 ± 0,31	< 0,01
Cloranfenicol	055 B55	2,85 ± 0,27	> 0,5
Colimicina		3,01 ± 0,28	
Kanamicina		2,81 ± 0,23	> 0,1
Oxitetraciclina		3,58 ± 0,31	> 0,05
Cloranfenicol	0127 B8	1,18 ± 0,1	> 0,1
Colimicina		0,96 ± 0,09	
Kanamicina		2,11 ± 0,11	< 0,02
Oxitetraciclina		123,20 ± 10,03	< 0,01
Cloranfenicol	026 B6	14,82 ± 1,18	< 0,01
Colimicina		1,28 ± 0,12	
Kanamicina		4,98 ± 0,21	< 0,01
Oxitetraciclina		4,38 ± 0,32	< 0,01
Cloranfenicol	0126 B16	5,28 ± 0,62	< 0,01
Colimicina		0,82 ± 0,01	
Kanamicina		1,93 ± 0,21	< 0,01
Oxitetraciclina		6,48 ± 0,43	< 0,01

1.— S = Desviación estándar.

2.— p = Probabilidad de que la diferencia entre la CE<sub>50</sub> de la colimicina en comparación a la de los otros antibióticos, sea estadísticamente significativa.



la colimicina es bastante uniformemente activa sobre las varias cepas patógenas de *E. coli*.

3) **Comparación de la sensibilidad a los 4 antibióticos.**—El nomograma de la figura 2, permite visualizar fácilmente el distinto grado de sensibilidad de cada cepa de *E. coli* a los antibióticos en estudio. Se aprecia que no hay ninguna correlación entre cepa y sensibilidad a los distintos antibióticos. La cepa 055 B55 es sensible casi igualmente a los 4 antibióticos, mientras la cepa 0127 B8, es muy sensible a colimicina, casi tan sensible al cloranfenicol pero bastante resistente a la oxitetraciclina. La cepa 026 B6, con respecto a estos dos últimos antibióticos ofrece, en cambio, el caso inverso, es decir es mucho más sensible a la oxitetraciclina que al cloranfenicol. La sensibilidad a la kanamicina en 5 de las 6 cepas, fue intermedia entre aquella de la colimicina, la más alta, y la de los otros dos antibióticos.

## DISCUSION

Aunque el método de determinar la concentración mínima inhibitoria, que impide la multiplicación de una bacteria, por su rapidez y facilidad, es el método más comúnmente empleado, tiene la desventaja de una menor precisión que el de buscar la  $CE_{50}$  y sobre todo de no dar ninguna información sobre tiempo-curso de evolución de una población bacteriana sometida a la acción de un antibiótico. El método que hemos adoptado aporta algu-

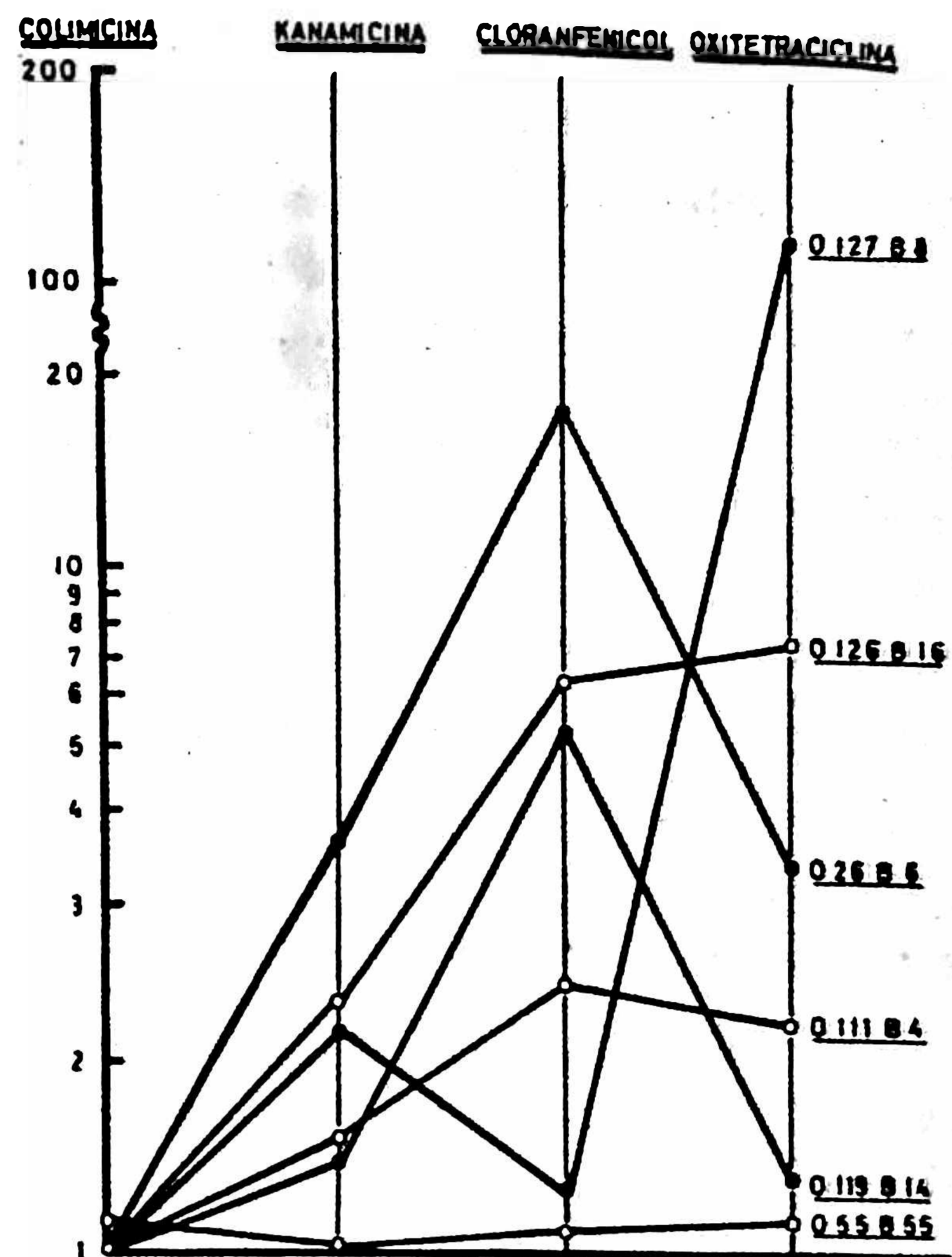


Fig. 2.—Sensibilidad relativa de varias cepas *E. coli* a los 4 antibióticos.— El valor 1 corresponde a la máxima sensibilidad relativa e inversamente los valores más altos.

nos datos adicionales de interés. Ha sido posible, por ejemplo, establecer que la velocidad de multiplicación de las distintas cepas de *E. coli* es diferente y que la colimicina modifica también diferentemente en las varias cepas, la fase de multiplicación logarítmica.

Los valores encontrados de  $CE_{50}$ , confirman trabajos de otros autores<sup>15-18</sup> de que la colimicina es altamente efectiva para inhibir el desarrollo de *E. coli*, así como de otros gérmenes Gram-negativos, en particular *Salmonella*, *Klebsiella* y *Shigella*. Schwartz y colaboradores<sup>15</sup> encontraron que la colimicina era más activa que la polimixina B y la estreptomina sobre varias cepas de *E. coli*. Resultados se-

mejantes han sido comunicados por Wright y Welch<sup>16</sup> y otros autores<sup>9-16</sup>. También en los trabajos de estos autores, las cepas de *E. coli* que cada uno utilizó en sus experiencias fueron regular y casi uniformemente sensibles a la colimicina, hecho que se ha confirmado en el presente trabajo, y que contrasta grandemente con lo que sucede con el cloranfenicol y la oxitetraciclina. Ya sea por mutación, por simple selección o por ambos fenómenos biológicos, lo cierto es que mayor es el tiempo de uso terapéutico de un antibiótico, mayor también la frecuencia de cepas bacterianas resistentes a tal antibiótico. Es de preverse, por lo tanto, que esta uniformidad de acción de la colimicina sobre varias cepas patógenas, ha de ser temporal y que conforme se la emplee en el campo clínico comenzarán a aparecer también cepas resistentes.

### RESUMEN

Se estudió in-vitro la actividad antibiótica de la colimicina, la kanamicina, el cloranfenicol y la oxitetraciclina, sobre varias cepas patógenas de *Escherichia coli*.

Se encontró que la velocidad de multiplicación de las distintas cepas de *E. coli*, fue diferente así como la modificación que la colimicina produjo en la fase logarítmica.

La actividad antibiótica se evaluó en términos de  $CE_{50}$  y se encontró que con excepción de una cepa, en las demás, la colimicina fue la droga más

activa. La sensibilidad de las varias cepas fue bastante uniforme a colimicina en tanto que con relación al cloranfenicol y oxitetraciclina fue muy variable.

### SUMMARY

The antibacterial activity of colistin (Colymycin), kanamycin, chloramphenicol and oxytetracycline was studied in-vitro, against several pathogenetic strains of *Escherichia coli*.

It was found that there are differences in the growth rate of the strains and also in the effects of colistin on the log-phase of microbial multiplication.

The antibacterial effect was evaluated in terms of  $EC_{50}$  and it was found that colistin was the most effective agent against all but one of the strains of *E. coli* studied. The susceptibility of the different strains to colistin was relatively uniform, whereas wide variations were observed with the other antibiotics.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.—BAQUERIZO, L.: *Escherichia coli* (Bacilo coli) como agente patógeno en gastroenteritis infantiles. Rev. Ecuatoriana de Hig. y Med. Trop. 12: 1, 1955.
- 2.—STULBERG, C. S., ZUELZER, W. W., and PAGE, R. H.: *Escherichia coli* 0127 B8, a serotype causing infantile diarrhea. III: The antibody response of infants. J. Immunol. 76: 281, 1956.
- 3.—THOMPSON, S., WATKINS, A. G., and GRAY, P. O.: *Escherichia coli* gastroenteritis, Arch. Dis. Child. 31: 340, 1956.



- 4.—ANDREONI, O., GROSSO, E.: L'Escherichia coli 027 in un episodio epidemico di gastroenterite infantile. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 36: 659, 1957.
- 5.—OCKLITZ, H. W., and SCHMIDT, E. F.: Enteropatogenic Escherichia coli serotypes: infection of newborn through mother. *Brit. Med. J.* II: 1036 (Nov. 2), 1957.
- 6.—HINTON, N. A., and MacGREGOR, R. R.: A study of infections due to pathogenic serogroups of Escherichia coli. *Canad. M. A. J.* 79: 359, 1958.
- 7.—BRETON, A., GAUDIER, B., PONTE, C., and POINGT, O.: Colimicina e infezione enterica da Escherichia coli G. E. I., *Minerva Med.*, 49: 4479, 1958.
- 8.—MUGLIA, A.: Etiología de las diarreas infantiles agudas. *Rev. Ecuat. Ped. Puericultura*, 4: 235, 1959.
- 9.—GREENGARD, J., and ALISEDA, A. F.: Treatment of acute diarrhea of infancy with oral colistin sulfate. In: *Antibiotics Annual 1959 - 1960.* Ed. Antibiotica, New York, p. 101, 1960.
- 10.—WADSWORTH, A. B.: *Standard Methods.* 3rd Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 990 p., 1947.
- 11.—GERBEAU, C.: Milieu d'enrichissement et technique d'isolement des E. coli da gastroenterites infantiles. *Ann. de l'Institut Pasteur* 88: 790, 1955.
- 12.—NARANJO, P., e CARRILLO DE MORENO, J.: Sull'inibizione dello sviluppo di germi penicillino-resistenti per azione del cobalto aggiunto alla penicillina. *Minerva Med.* 49: 1124, 1958.
- 13.—NARANJO, P., MUÑOZ, A., DE MORENO, J. C.: Sull'inibizione dello sviluppo di germi penicillino-resistenti per azione del cobalto aggiunto alla penicillina. *Minerva Med.* 49: 468, 1958.
- 14.—NARANJO, P., MUÑOZ, A., and CARRILLO DE MORENO, J.: Study of the combined action of cobalt with various antibiotics. *Arch. int. pharmacodyn. Therap.* 116: 1, 1958.
- 15.—SCHWARTZ, B. S., WARREN, M. R., BARKLEY, F. A., and LANDIS, L.: Microbiological and pharmacological studies of colistin sulfate and sodium colistinmethanesulfonate. In: *Antibiotics Annual 1959 - 1960.* Ed. Antibiotica, New York, p. 41, 1960.
- 16.—WRIGHT, W. W., and WELCH, H.: Chemical, biological and clinical observations of colistin. In: *Antibiotics Annual 1959 - 1960.* Ed. Antibiotica, New York, p. 61, 1960.
- 17.—McCABE, W. R., JACKSON, G. G., and KOZIJ, V. M.: Clinical and laboratory observations on the use of colistin in infections by Gram-negative bacilli. In: *Antibiotics Annual 1959 - 1960.* Ed. Antibiotica, New York, p. 80, 1960.
- 18.—WEILL, J., BARUCH, J., et COSTIN, M.: Un nouvel antibiotique pour le traitement des diarrhées infantiles: la colimycine, *Arch. franc. pediat.* 15: 1227, 1958.