

Actividad *in vitro* de vancomicina, colistina, nistatina (VCN) y ciprofloxacino contra micoplasmas

José Antonio Rivera-Tapia,* Lilia Cedillo-Ramírez,*
Luz del Carmen Lechuga-Licona,** Gabriela Fuentes-García**

RESUMEN

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños de vida libre, presentan un diámetro en promedio de 300 nm, están limitados por una membrana y carecen de pared celular. No muestran susceptibilidad a la penicilina y otros antibióticos que actúan a nivel de la pared celular. Los micoplasmas son susceptibles a antibióticos de amplio espectro, los cuales sólo inhiben su multiplicación, pero no los matan. **Objetivo:** Evaluar la actividad *in vitro* de vancomicina, colistina, nistatina (VCN) y ciprofloxacino contra micoplasmas de interés médico con la finalidad de valorar si no interfieren en su metabolismo, lo cual permita su aislamiento. **Material y métodos:** La concentración inhibitoria mínima fue determinada por el método de inhibición metabólica en microplacas de 96 pozos. **Resultados:** Se obtuvieron las concentraciones inhibitorias mínimas en las especies de micoplasmas evaluadas ($\mu\text{g/mL}$), para VCN (3.3, 7.5, 12.5) y ciprofloxacino (0.1-1 para *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma pneumoniae*) y (1-10 para *Mycoplasma penetrans*). **Conclusión:** La viabilidad que presentaron los micoplasmas evaluados en presencia de estos compuestos permite considerar su adición al medio de cultivo cuando se requiera el aislamiento a partir de muestras clínicas.

Palabras clave: Vancomicina, colistina, nistatina, VCN, ciprofloxacino, micoplasmas, viabilidad.

ABSTRACT

Mycoplasmata are the smallest free-living microorganisms, being about 300 nm in diameter. They are bound by a triple-layered membrane, and unlike conventional bacteria, do not have a rigid cell wall. Hence, they are not susceptible to penicillins and other antibiotics that act on this structure. They are, however, susceptible to a variety of other broad-spectrum antibiotics, most of which only inhibit their multiplication and do not kill them. Objective: The activity in vitro of vancomycin, colistin, nistatin (VCN) and ciprofloxacin against mycoplasma species was analyzed in this study, with the purpose to make their isolation possible. Material and methods: The MIC were determined by the metabolic inhibition method performed in 96-well microtiter plates. Results: MIC of the mycoplasma species tested ($\mu\text{g/mL}$) were obtained for VCN (3.3, 7.5, 12.5) and ciprofloxacin (0.1-1 Mycoplasma fermentans and Mycoplasma pneumoniae) and (1-10 Mycoplasma penetrans). Conclusions: The viability of the mycoplasma evaluated in presence of the antibiotics allows considering its addition to the cultures medium when isolation of clinical samples is required.

Key words: Vancomycin, colistin, nistatin, VCN, ciprofloxacin, mycoplasmata, viability.

INTRODUCCIÓN

Las dificultades que presenta el aislamiento de micoplasmas y ureaplasmas a partir de muestras clínicas se deben a las exigencias nutricionales de estos microorganismos y al desarrollo invasor de

la abundante flora saprofita.¹ En 1964, Thayer-Martin formularon un medio selectivo adicionado con antibióticos como agentes inhibidores: Vancomicina, colistina y nistatina (VCN), permitiendo así el correcto aislamiento de las neisserias patógenas dentro de las 24 horas, con una ausencia

* Laboratorio de Micoplasmas, Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

** Escuela de Biología de la BUAP.

Recibido para publicación: 13/07/07. Aceptado: 39/07/07.

Correspondencia: M. en C. José Antonio Rivera Tapia

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones Microbiológicas, Edificio 76 Complejo de Ciencias. Ciudad Universitaria 72570, Puebla, México.
E-mail: jart70@yahoo.com

casi total de contaminantes. La vancomicina inhibe microorganismos Gram positivos, impidiendo la biosíntesis de la pared celular, uniéndose al fragmento D alanina- D alanina del pentapéptido que genera y sustenta la interconexión entre las cadenas poliméricas fundamentales de la cubierta bacteriana. La colistina inhibe Gram negativos actuando a nivel de las membranas celulares donde causa su disrupción por un efecto surfactante. La nistatina suprime el crecimiento de hongos, desorganizando su membrana celular, uniéndose a los esteroides de la pared, generando la salida de iones intracelulares.^{2,3}

Ciprofloxacino es un derivado quinolónico que se caracteriza por presentar un núcleo piperazínico en la posición 7 del anillo quinolónico, que es el que le confiere actividad antipseudomonas y un átomo de flúor en la posición 6 que, de acuerdo a estudios de estructura-actividad, le entrega una mayor eficacia contra agentes patógenos Gram negativos y amplía discretamente el espectro de acción hacia los gérmenes Gram positivos. El efecto antibacteriano del ciprofloxacino se debe principalmente a la capacidad de bloquear la actividad de una enzima esencial para las bacterias, la ADN-girasa (topoisomerasa). Este antimicrobiano también parece ser capaz de provocar daño en la membrana celular con la posterior pérdida del contenido celular de las bacterias. Este mecanismo de acción hace que el ciprofloxacino sea más potente que otras quinolonas y le permite tener un amplio espectro de acción bactericida. Presenta cierta actividad frente a *Plasmodium falciparum*, micobacterias, rickettsias y micoplasmas. Siendo considerados como resistentes *Nocardia asteroides* y *Ureaplasma urealyticum*.^{4,5}

Los micoplasmas y ureaplasmas son un grupo de microorganismos que exhiben características morfológicas, metabólicas y moleculares muy particulares. Su importancia ha generado interés en el estudio de enfermedades relacionadas con el humano, ya que durante la práctica clínica diaria se relacionan con enfermedades tanto agudas como crónicas, que en ciertas ocasiones llegan a términos fatales. Se han detectado en diversos sitios anatómicos, tanto en sujetos con diferentes padecimientos como en individuos sanos. Su presencia

se ha observado en tracto respiratorio, tracto genitourinario, trastornos articulares, biopsias gastrointestinales y en complicaciones neurológicas.⁶ Es importante mencionar que el aislarlos es difícil debido a sus requerimientos nutricionales y por la presencia de flora que acompaña a las muestras, lo que interfiere en su viabilidad. Por tanto, el objetivo del presente trabajo es estudiar la actividad *in vitro* de VCN y ciprofloxacino contra micoplasmas de interés médico con la finalidad de valorar si no interfieren en su metabolismo, lo cual permita su aislamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico: *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma penetrans* fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Micoplasmas del Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Cultivo de los micoplasmas: Los micoplasmas se cultivaron en caldo Eaton (65 mL de agua destilada, 2 g de base para micoplasmas DIFCO Laboratories, 1 mL de rojo de fenol al 0.4%, 10 mL de dializado de levadura, 25 mL de suero de caballo *Hy Clone*, 200 UI/mL de penicilina), incubándose a 37 °C bajo condiciones aerobias. La concentración del inóculo (1×10^6 UFC/mL) se ajustó por medio de diluciones decimales.

Agentes antimicrobianos: Se preparó solución stock del inhibidor VCN (Bioxon) a una concentración de vancomicina 33 ug, colistina 75 µg y nistatina 125 unidades/mL en medio de cultivo Eaton y solución stock de ciprofloxacino (Bayer) a una concentración de 1 mg/mL en medio de cultivo Eaton. Las soluciones se dejaron a prueba de esterilidad a 37 °C durante 24 horas, descartando con esto el posible vire inespecífico del medio de cultivo Eaton por la presencia de VCN y ciprofloxacino.

Prueba de susceptibilidad: La prueba se realizó en microplacas de titulación de 96 pozos, en la primera columna se colocaron 150 µL de la solución stock del inhibidor VCN y de la columna dos a la siete se colocaron 135 µL de medio de cultivo Eaton, y a partir de la columna uno se realizaron di-

luciones decimales. En las siete columnas se adicionaron 50 µL de cultivo de *Mycoplasma fermentans* con una concentración entre 10^5 y 10^6 UFC/mL. Se incluyeron tres pozos con medio de cultivo Eaton libre de VCN (100 µL cada uno), adicionándose 50 µL de cultivo de *Mycoplasma fermentans* con una concentración entre 10^5 y 10^6 UFC/mL (estos pozos indican el momento en que se debe leer la prueba). Tres pozos con 150 µL de solución stock (estos pozos representan el control de VCN, para verificar si no se presenta vire inespecífico en el medio de cultivo Eaton). Se incluyeron tres pozos más como control de medio de cultivo Eaton (150 µL cada uno). Las placas se incubaron a 37 °C y se interpretó la prueba en el momento cuando los pozos que contienen el medio de cultivo Eaton libre de VCN más cultivo bacteriano presentó el vire del indicador de pH. A continuación se sembraron 5 µL en agar Eaton de cada una de las muestras e incubaron a 37 °C durante ocho días, diariamente se revisaron al microscopio estereoscópico con la finalidad de hacer el recuento de UFC/mL. Con la solución stock de ciprofloxacino se realizó el mismo esquema de trabajo, y las cepas de *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma penetrans* se evaluaron de la misma forma.

RESULTADOS

El inhibidor VCN permitió la viabilidad de *Mycoplasmas fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma penetrans* a una concentración de 3.3 µg de vancomicina, 7.5 µg de colistina y 12.5 unidades de nistatina por mililitro de caldo Eaton. El estudio microscópico de las resiembra en agar Eaton reveló que las tres especies de micoplasmas presentaron crecimiento colonial $> 1 \times 10^6$ UFC/mL a partir de una concentración de 0.15 µg de vancomicina, 0.35 µg de colistina y 0.6 unidades de nistatina por mililitro de caldo Eaton.

La evaluación de la actividad *in vitro* de ciprofloxacino mostró diferentes valores en la concentración inhibitoria mínima (CIM) en las tres especies de micoplasmas (Cuadro I).

El estudio microscópico de las resiembra mostraron que *M. fermentans* y *M. pneumoniae* tienen crecimiento colonial $> 1 \times 10^6$ UFC/mL a partir de

la concentración 0.01 µg/mL de ciprofloxacino, *M. penetrans* presentó crecimiento $> 1 \times 10^6$ UFC/mL a partir de la concentración de 0.1 µg/mL de ciprofloxacino.

DISCUSIÓN

El evaluar la actividad *in vitro* de VCN y ciprofloxacino contra micoplasmas de interés médico brinda la posibilidad de suplementar al medio de cultivo para micoplasmas con estos compuestos, facilitando su aislamiento a partir de muestras clínicas.

En presencia de VCN presentaron viabilidad *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Mycoplasma penetrans*, y no interfirió significativamente en su actividad metabólica ya que estos microorganismos no cuentan con las moléculas blanco donde hace efecto este inhibidor, razón por la cual se consideró en el presente trabajo.² No obstante, es importante señalar que a concentraciones iguales o superiores a 33 µg de vancomicina, 75 µg de colistina y 125 unidades de nistatina por mililitro los micoplasmas se inhibieron, lo cual no favoreció su viabilidad y, por consiguiente, condiciona un aislamiento mínimo o nulo.

Las fluorquinolonas presentan diferentes niveles de actividad contra micoplasmas, tal es el caso de BAY 12-8039 que cuenta con potente actividad contra microorganismos Gram positivos, Gram negativos y anaerobios.^{7,8} A una concentración de 0.5 µg/mL inhibe a *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans* y *Ureaplasma urealyticum*, excepto *Mycoplasma hominis* PG21 resistente a fluorquinolonas.⁹ Diver-

Cuadro I. Actividad *in vitro* de ciprofloxacino.

	CIM (µg/mL)	
	Rango	CMI ₅₀
<i>M. fermentans</i>	0.1-1.0	0.5
<i>M. pneumoniae</i>	0.1-1.0	0.5
<i>M. penetrans</i>	1.0-10.0	5.0

Cuadro II. Reportes de actividad *in vitro* de ciprofloxacino contra micoplasmas.

Micoplasma	Rango (µg/mL)	Rango (µg/mL)	Rango (µg/mL)	Rango (µg/mL)
<i>M. pneumoniae</i>	1.00-2.00	0.50-2.00	1-10	*
<i>M. fermentans</i>	0.25	0.06-0.25	1	*
<i>M. penetrans</i>	0.25-1.00	0.12-0.25	*	0.039-0.625
<i>M. hominis</i>	0.50-2.00	0.50-2.00	1	*
<i>M. genitalium</i>	1.00-2.00	1.00-2.00	1-10	*
(Referencia)	(10)	(11,12)	(13)	(14)

* No reportado en referencias.

Los trabajos reportan variación en la susceptibilidad de micoplasmas en presencia de ciprofloxacino (*Cuadro II*), donde se debe considerar el sitio anatómico del aislamiento, la zona geográfica del hospedero, y/o el esquema de antibióticos que se le prescribió al paciente.¹⁰⁻¹⁴ Los datos obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* en mutantes de *Mycoplasma hominis* resistentes a fluorquinolonas plantean que las mutaciones están asociadas con alteraciones en los genes *gyrA*, *gyrB* o *parC* que codifican la topoisomerasa II, molécula que es blanco de las fluorquinolonas,¹⁵⁻¹⁷ además se han descrito aislamientos clínicos resistentes a fluorquinolonas por la acción de una “bomba” que reduce la acumulación intracelular de quinolonas y de compuestos estructuralmente no relacionados, incluyendo diferentes clases de antibióticos, antisépticos, bromuro de etidio y acriflavina.¹⁸⁻²⁰ En relación a lo expuesto, consideramos que *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma penetrans* pueden compartir estas características con *Mycoplasma hominis*, explicando así los resultados reportados en el presente trabajo.

El pH en el medio de cultivo condiciona variaciones en la susceptibilidad de *Mycoplasma pneumoniae* en presencia de azitracina, claritromicina y eritromicina, a un pH de 7.8 la susceptibilidad se presenta en un rango de 0.001-0.03 µg/mL y a un pH 6.9 en un rango de 0.015-0.25 µg/mL, es decir, que los macrólidos a niveles bajos de pH (6.0-6.5) presentan menor efectividad.^{21,22}

Es importante mencionar que determinar la susceptibilidad de micoplasmas y ureaplasmas contra antibióticos resulta difícil, ya que los cultivos no muestran turbidez y el inóculo no se estandariza fácilmente.

CONCLUSIÓN

La viabilidad que presentaron *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma penetrans* en presencia de VCN y ciprofloxacino permite considerar la adición de estos compuestos al medio de cultivo cuando se requiera el aislamiento de estos micoplasmas a partir de muestras clínicas. Cabe señalar que ya se ha implementado esta propuesta en el laboratorio y los resultados han sido satisfactorios, en comparación con los escasos aislamientos realizados en el medio libre de VCN y ciprofloxacino.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo otorgado al proyecto 53/NAT/06/I.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivera TJA, Centeno TM, Santellan OR, Rodríguez PN. Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. Rev Mex Patol Clin 2004; 51: 33-36.
2. Garza-Velasco R, Vilchis-Gaona EG, Calderón-Ozumbilla F. Vancomicina y fluorquinolonas: Dos armas que aún conservan su eficacia dentro del oscuro panorama que envuelve a la terapéutica antimicrobiana. Disponible en: <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-vancofluorq.pdf>
3. Silva LE. Antifúngicos del futuro. Med Cutan Lat Am 2004; 32: 229-230.

4. Ullmann U, Schubert S, Krausse R. Comparative *in vitro* activity of levofloxacin, other fluorquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. J Antimicrob Chemother 1999; 43 (suppl C): 33-36.
5. Hooper DC. Expanding uses of fluorquinolones: opportunities and changes. Ann Inter Med 1998; 129: 908-910.
6. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed 2001; 12: 262-271.
7. Aldridge KE, Ashcraft D. Comparison of the *in vitro* activities of BAY 12-8039, a new quinolone, and other antimicrobials against clinically important anaerobes. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 709-711.
8. Woodcock J, Andrews JM, Boswell FJ, Brenwald NP, Wise R. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluorquinolone. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 101-106.
9. Bebear CM, Renaudin H, Boudjadja A, Bebear C. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluorquinolone, against mycoplasmas. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 703-704.
10. Pereyre S, Renaudin H, Bebear C, Bebear CM. *In vitro* activities of the newer quinolones garenoxacin, gatifloxacin, and gemifloxacin against human mycoplasmas. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3165-3168.
11. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Gruson D, Lefrançois M, Bebear C. *In vitro* activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluorquinolone-resistance isolates that have been genetically characterized. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2557-2560.
12. Bebear CM, Renaudin H, Schaefferbeke T, Leblanc F, Bebear C. *In-vitro* activity of grepafloxacin, a new fluorquinolone, against mycoplasmas. J Antimicrob Chemother 1999; 43: 711-714.
13. Taylor-Robinson D, Bebear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmas infections. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 622-630.
14. Hayes MM, Foo HH, Timenetsky J, Lo SC. *In vitro* antibiotic susceptibility testing of clinical isolates of *Mycoplasma penetrans* from patients with AIDS. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1386-1387.
15. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Bove JM, Bebear C, Renaudin J. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant mutants of *Mycoplasma hominis* obtained *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2304-2311.
16. Bebear CM, Renaudin J, Charron A, Renaudin H, Barbeyrac B, Schaefferbeke T, Bebear C. Mutation in the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluorquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 954-956.
17. Bebear CM, Bove JM, Bebear C, Renaudin J. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluorquinolone. Antimicrob Agents Chemother 1997; 42: 269-273.
18. Muñoz-Bellido JL, Alonzo-Manzanares M, Martínez-Andrés JA, Gutiérrez Zufiaurre MN, Ortiz G, Segovia HM, García RJA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 354-356.
19. Piddock LJV, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3118-3121.
20. Raheison S, Gonzalez P, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 421-424.
21. Kenny G, Cartwright FD. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, dalbapristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbapristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2604-2608.
22. Duffy LB, Crabb D, Searcey K, Kempf MC. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 29-33.