

O. Noguera¹
J. C. Rodríguez²
J. M. López¹
M. Ruiz²
G. Royo^{2,3}

Determinación de la concentración preventiva de mutantes resistentes a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* productoras y no productoras de betalactamasas de espectro extendido

¹ Hospital Vega Baja de Orihuela
Alicante

² Hospital General Universitario de Elche

³ Universidad Miguel Hernández
Elche (Alicante)

El objetivo de este trabajo es estudiar la capacidad de ciprofloxacino y levofloxacino de restringir el desarrollo de mutantes resistentes en cepas de *Escherichia coli* mediante la determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM). Se estudiaron 99 cepas de *E. coli* con distinta sensibilidad a fluoroquinolonas y se clasificaron en cepas productoras (n=60) y no productoras (n=39) de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). La determinación de la CPM se realizó mediante el inóculo de 10¹⁰ UFC/ml en placas de Mueller-Hinton con concentraciones seriadas de antibióticos. No se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones inhibitorias mínimas de cepas productoras y no productoras de BLEE. Las cepas sensibles a ciprofloxacino y productoras de BLEE mostraron una mayor CPM para levofloxacino y ciprofloxacino que las no productoras.

Nuestro estudio ayuda a explicar el frecuente hallazgo de resistencias a fluoroquinolonas en cepas productoras de BLEE. En este contexto surgen dudas sobre la conveniencia de usar fluoroquinolonas en el tratamiento de infecciones causadas por cepas productoras de BLEE.

Palabras clave:

Escherichia coli. Betalactamasas de espectro extendido. Fluoroquinolonas.

Rev Esp Quimioter 2009;22(1):30-33

Resistant mutant prevention concentration of fluoroquinolones in clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing and non-producing strains of *Escherichia coli*

The aim of this job is to study the capacity of ciprofloxacin and levofloxacin in restricting the development of resistant mutants in strains of *Escherichia coli* by determining the mutant prevention concentration (MPC).

Ninety-nine isolates of *E. coli* with different fluoroquinolone susceptibilities were studied and divided into ESBL-producing (n = 60) and non-ESBL producing (n = 36) groups. MPC values were determined using an inoculum of 10¹⁰ cfu/ml on Mueller-Hinton plates with serial dilutions of the antibiotics. No significant differences were detected in MIC of ESBL-producing and non-ESBL producing strains of *E. coli*. Ciprofloxacin susceptible ESBL-producing strains exhibit higher MPC for ciprofloxacin and levofloxacin than non-ESBL producing strains. Our study helps to explain the frequent fluoroquinolone resistance found in ESBL-producing strains. In this context, doubts emerge about the advisability of using fluoroquinolones to treat infections caused by ESBL-producing strains.

Key words:

Escherichia coli. Extended spectrum beta-lactamase. Fluoroquinolones.

INTRODUCCIÓN

Las quinolonas son uno de los antibióticos más ampliamente usados para tratar infecciones debidas a *Escherichia coli* tanto en humanos como en animales¹. Sin embargo, la resistencia a estos antibióticos se ha incrementado en los últimos años y es especialmente elevada en cepas de *E. coli* productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE)^{2,3}.

Recientemente se ha definido la concentración preventiva de mutantes (CPM) como un parámetro útil que impide o previene la aparición y crecimiento de mutantes resistentes⁴. Estas subpoblaciones más resistentes pueden estar asociadas con fracasos en el tratamiento y también con la generación de resistencias^{5,6}.

El objetivo de nuestro trabajo es usar este nuevo parámetro (CPM) para estudiar la capacidad de dos fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) de limitar el desarrollo de mutantes resistentes en aislados clínicos de *E. coli* responsables de infecciones del tracto urinario y de bacteriemias en nuestro servicio.

Correspondencia:

Juan Carlos Rodríguez Díaz
Servicio de Microbiología
Hospital General Universitario de Elche
03203 Elche (Alicante)
Correo electrónico: micro_elx@gva.es

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 99 cepas de *E. coli* divididas en los siguientes grupos: 25 cepas sensibles a ciprofloxacino, no productoras de BLEE; 14 cepas resistentes a ciprofloxacino, no productoras de BLEE; 21 cepas sensibles a ciprofloxacino, productoras de BLEE y 39 cepas resistentes a ciprofloxacino, productoras de BLEE. Todas las cepas estudiadas fueron aislados clínicos de muestras de sangre y orina obtenidas de pacientes del Hospital General Universitario de Elche, un hospital de 450 camas en el sureste de la provincia de Alicante.

Se usaron los antibióticos levofloxacino (Hoechst, Barcelona, España) y ciprofloxacino (Bayer, Barcelona, España) en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración preventiva de mutantes (CPM).

La CIM se determinó mediante un sistema de microdilución (Wider, Soria Melguizo, Madrid, España). La sensibilidad a fluoroquinolonas fue posteriormente confirmada mediante la técnica de dilución en agar según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Las concentraciones de los antibióticos fueron de 64 a 0,003 mg/l.

La presencia de BLEE se determinó mediante los sistemas de fenotipificación recomendados por el CLSI⁷: E-test (cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulánico y ceftazidima/ceftazidima + ácido clavulánico) (AB Biodisk, Solna, Suecia) y difusión en agar (cefotaxima 30 µg, cefotaxima/ácido clavu-

lánico 30/10 µg, ceftazidima 30 µg y ceftazidima/ácido clavulánico 30/10 µg) (Oxoid, Madrid, España)⁸.

La determinación de la CPM se realizó incubando un elevado inóculo bacteriano (10^{10} ufc) en placas con agar Mueller Hinton durante 24 h a 37 °C. Las concentraciones de los antibióticos estudiados fueron de 100 a 0,003 mg/l (100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003). El elevado inóculo bacteriano se obtuvo tras incubar las cepas en caldo Mueller Hinton durante 24 h a 37 °C^{9,10}.

Como test estadístico se empleó la U de Mann-Whitney para comprobar si las CIM y las CPM de los diferentes grupos pertenecían a la misma distribución rechazando la hipótesis nula de no diferencias con una $p < 0,05$ (SPSS, Chicago, 2002).

RESULTADOS

Los resultados de CIM y CPM para ciprofloxacino y levofloxacino se observan en la tabla 1. No se detectaron diferencias significativas entre las CIM de cepas sensibles a ciprofloxacino productoras y no productoras de BLEE, tanto para ciprofloxacino como para levofloxacino. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas entre las CIM de cepas resistentes a ciprofloxacino productoras y no productoras de BLEE, tanto para ciprofloxacino como para levofloxacino.

Cepas	CIM y CPM en mg/l de las cepas estudiadas para ciprofloxacino y levofloxacino							
	CIPROFLOXACINO				LEVOFLOXACINO			
	Sensibles a ciprofloxacino		Resistentes a ciprofloxacino		Sensibles a levofloxacino		Resistentes a levofloxacino	
	Sin BLEE (n = 25)	BLEE (n = 21)	Sin BLEE (n = 14)	BLEE (n = 39)	Sin BLEE (n = 25)	BLEE (n = 21)	Sin BLEE (n = 14)	BLEE (n = 39)
CIM ₅₀	0,125	0,25	16	32	0,03	0,25	8	16
CIM ₉₀	1	1	64	64	1	1	16	32
Rango	0,015-2	0,006-2	4-64	4-64	0,015-1	0,015-2	0,25-64	2-64
CPM ₅₀ (xCIM ₅₀)	0,2 (1,6 x CIM)	2 (8 x CIM)	50 (3,1 x CIM)	50 (1,6 x CIM)	0,1 (3,3 x CIM)	2 (8 x CIM)	45 (5,6 x CIM)	35 (2,2 x CIM)
CPM ₉₀ (xCIM ₉₀)	3 (3 x CIM)	8 (8 x CIM)	100 (1,6 x CIM)	100 (1,6 x CIM)	1,5 (1,5 x CIM)	10 (10 x CIM)	100 (6,3 x CIM)	100 (3,1 x CIM)
Rango	0,025-8	0,025-8	14-100	18-100	0,025-1,5	0,025-14	6-100	6-100

Las cepas sensibles a ciprofloxacino y productoras de BLEE muestran una mayor CPM para levofloxacino ($p < 0,001$) y ciprofloxacino ($p < 0,001$) que las cepas no productoras de BLEE.

El índice preventivo de mutaciones (MPI=CPM/CIM) para ciprofloxacino y levofloxacino (fig. 1) indica la necesidad de concentraciones mayores que las CIM para evitar el crecimiento de cepas resistentes.

DISCUSIÓN

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son un serio problema de salud debido a la dificultad de tratar las infecciones causadas por estos microorganismos ya que son resistentes a la mayoría de antibióticos betalactámicos, excepto los carbapenemes, además pueden ser resistentes a otros grupos de antibióticos^{3,11}. Debido a que estos microorganismos son causa frecuente de infecciones urinarias, la coresistencia frente a fluoroquinolonas es una de las más interesantes ya que la terapia intravenosa no está recomendada en estas infecciones excepto para las más graves (pielonefritis).

Nuestro estudio ayuda a explicar este fenómeno ya que se ha visto que subpoblaciones de microorganismos sensibles a ciprofloxacino y productores de BLEE son más resistentes a fluoroquinolonas que los no productoras de BLEE. Las CPM para ciprofloxacino y levofloxacino son mayores en estas cepas productoras de BLEE.

Este estudio confirma que las cepas productoras de BLEE, incluso aquellas que son sensibles a fluoroquinolonas según los métodos clásicos, tienen subpoblaciones que son resistentes a estos compuestos y por lo tanto pueden ser fácilmente seleccionadas durante los tratamientos¹².

Por lo tanto, los tratamientos con fluoroquinolonas deberían ser empleados con precaución. Se deberían usar dosis más altas de fluoroquinolonas para obtener concentraciones mayores en el lugar de la infección para prevenir la selección de estas subpoblaciones, especialmente si son cepas productoras de BLEE⁶. Nuestros datos ayudan a explicar también los fallos terapéuticos informados¹³, y sugieren que es necesario emplear metodologías que permitan detectar estas subpoblaciones en los laboratorios clínicos⁵ ya que los métodos clásicos no son efectivos. Además los tratamientos antimicrobianos iniciales inad-

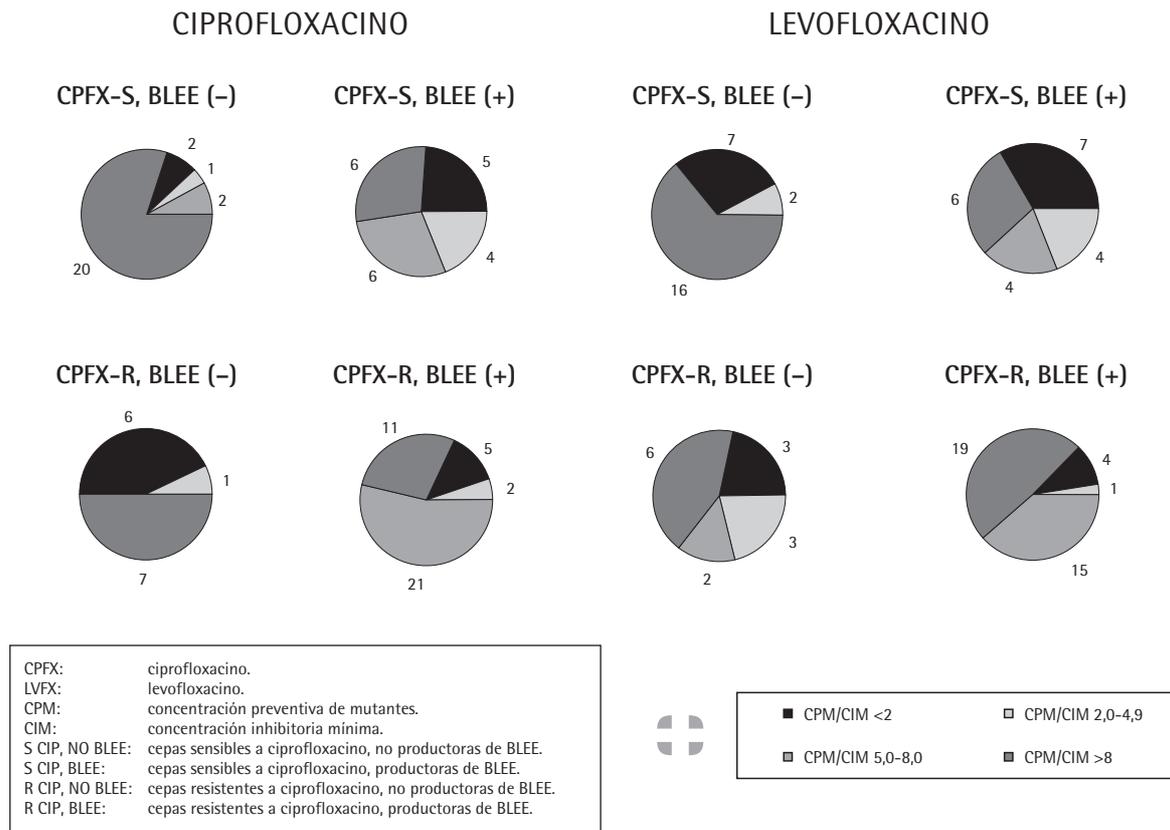


Figura 1

Distribución de los cocientes CPM/CIM de ciprofloxacino y levofloxacino frente a *Escherichia coli*.

cuados y la resistencia a fluoroquinolonas son factores de riesgo de mortalidad en estas infecciones^{14,15}. Sugerimos que se necesitarían concentraciones mayores que las CIM para evitar la recuperación y el crecimiento de mutantes resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Webber M, Piddock LJ. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res* 2001;32(3-4):275-84.
2. Sorlozano A, Gutierrez J, de Dios Luna J, Oteo J, Liebana J, Soto MJ, et al. High presence of extended-spectrum beta-lactamases and resistance to quinolones in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiol Res* 2007;162(4):347-54.
3. Yagüe A, Cebrián L, Rodríguez JC, Gonzalo-Jiménez N, Royo G, Campillo P, et al. Cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido: origen, características e incidencia en el sur de la provincia de Alicante en el periodo 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(2):76-9.
4. Zhao X, and Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolones studies. *Clin Infect Dis* 2001;33(Suppl. 3): S147-S56.
5. Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Saphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1756-8.
6. Blondeau JM, Zhao X, Hansen G and Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of streptococcus pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):433-8.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th International supplement. CLSI documente M100-S15. Wayne, PA: CLSI, 2005.
8. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4): 933-51.
9. Rodríguez JC, Cebrián L, López M, Ruiz M, Jiménez I, Royo G. Mutant prevention concentration: comparison of fluoroquinolones and linezolid with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(3):441-4.
10. Dong Y, Zhao X, Kreiswirth BN, Drlica K. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2581-4.
11. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH, et al. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24(2):119-24.
12. Marcusson LL, Olofsson SK, Lindgren PK, Cars O, Hughes D. Mutant prevention concentrations of ciprofloxacin for urinary tract infection isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(6):938-43.
13. Endimiani A, Luzzaro F, Perilli M, Lombardi G, Coli A, Tamborini A, et al. Bacteremia due to *Klebsiella pneumoniae* isolates producing the TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase: treatment outcome of patients receiving imipenem or ciprofloxacin. *Clin Infect Dis* 2004;38(2):243-51.
14. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern Med* 2005;165(12):1375-80.
15. Lautenbach E, Metlay JP, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Association between fluoroquinolone resistance and mortality in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* infections: the role of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2005;41(7):923-9.