

## Original

# Coste biológico asociado a la resistencia a la fosfomicina en aislamientos de *Escherichia coli* de orina

J.I. Alós, P. García-Peña y J. Tamayo

Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, Móstoles (Madrid)

### RESUMEN

La resistencia a la fosfomicina surge rápidamente en condiciones experimentales, pero aunque su uso es frecuente en las infecciones del tracto urinario, la resistencia de *Escherichia coli*, el principal uropatógeno, es muy baja (1% a 3%) y ha permanecido así por muchos años. El objetivo de este estudio fue evaluar si las cepas de *E. coli* resistentes a la fosfomicina tienen menos competitividad (fitness) que las sensibles, y por tanto tenderían a desaparecer al competir con las cepas sensibles en ausencia de antibióticos. Se utilizaron cepas resistentes a la fosfomicina ( $n = 11$ ) con diferentes fenotipos de resistencia a otros antibióticos, y cepas sensibles a la fosfomicina ( $n = 15$ ) con los mismos fenotipos de resistencia al resto de los antibióticos que algunas de las cepas resistentes, pero con el patrón opuesto de fermentación de la lactosa. Se realizaron 33 experimentos de competición por pares en caldo nutriente. Se utilizaron cantidades iguales de cada cepa (50%-50%) durante cuatro días, con cambio diario a un nuevo medio. Se hicieron cinco recuentos diferenciales, los días 0, 1, 2, 3 y 4. En 20 experimentos (60,6%) hubo un incremento relativo de la cepa sensible a la fosfomicina. En seis experimentos (18,2%) hubo un incremento relativo de la cepa resistente a la fosfomicina. En siete experimentos (21,2%) ninguna cepa mostró un incremento relativo. Cuando los datos de los 26 experimentos en que había cambios se analizaban por  $\chi^2$  había una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.044$ ). La resistencia a la fosfomicina puede suponer un coste de competitividad para la mayoría de las cepas de *E. coli* probadas.

**Palabras clave:** Competitividad bacteriana - Infección del tracto urinario - Fosfomicina - Resistencia a la fosfomicina - *Escherichia coli*

## ***Biological cost associated with fosfomicin resistance in Escherichia coli isolates from urinary tract infections***

### SUMMARY

Resistance to fosfomicin develops rapidly in experimental conditions, although despite its frequent use in UTI, resistance in *E. coli*, the main uropathogen, is very low (1-3%), and has remained so for many years. The objective of this study was to ascertain whether *E. coli* fosfomicin-resistant strains have less fitness than those that are fosfomicin-sensitive in competing, and would therefore tend to disappear in their competition with fosfomicin-sensitive strains in the absence of antibiotics. Fosfomicin-resistant strains ( $n = 11$ ) with different phenotypes of resistance to other antibiotics were used. All but one were lactose (+). Fosfomicin-susceptible strains ( $n = 15$ ) that had the same phenotypes of resistance to other antibiotics as the resistant strains and which had the opposite pattern of lactose fermentation were also used. Thirty-

three (33) competition experiments by pairs of strains were conducted in nutrient broth. Equal amounts of the strains were challenged (approx. 50% and approx. 50%) for 4 days, with a daily change to a new medium. Five differential counts were performed on days 0, 1, 2, 3 and 4. In 20 experiments (60.6%) there was a relative increase in the fosfomicin-sensitive strain. In 6 experiments (18.2%) there was a relative increase in the fosfomicin-resistant strain. In 7 experiments (21.2%), on the fourth day none of the strains reached 60%. When the data of the 26 (20+6) experiments in which there were changes were analyzed by the  $\chi^2$  test there was a statistically significant difference ( $p = 0.044$ ). Resistance to fosfomicin could entail a biological cost (less fitness) for the majority of the *E. coli* strains assayed.

**Key words:** Bacterial fitness - Urinary tract infection - Fosfomicin - Fosfomicin-resistance - *Escherichia coli*

## INTRODUCCIÓN

La fosfomicina es un antibiótico bactericida que actúa sobre la pared celular bacteriana interfiriendo en el primer paso de la síntesis del peptidoglucano (1). La resistencia a la fosfomicina se debe a cambios por mutaciones cromosómicas en uno o varios de los genes implicados en los sistemas de transporte de este antimicrobiano al interior de la célula bacteriana (2). Además, puede deberse a una enzima codificada por plásmidos que inactiva el antibiótico, aunque este último mecanismo es más raro en aislamientos clínicos (3, 4).

En el laboratorio es fácil obtener mutantes de *Escherichia coli* resistentes a la fosfomicina, algo que no ocurre frecuentemente en la clínica.

La fosfomicina trometamol se usa como uno de los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario no complicadas, causadas en el 80% a 90% de los casos por cepas de *E. coli*. Pese a su uso frecuente, en los últimos años no se ha producido un incremento importante de la resistencia a este antibiótico en los aislamientos de *E. coli* de urocultivos, que globalmente es muy baja (1% a 3%) (5, 6). Con otros fármacos, como las fluoroquinolonas y el cotrimoxazol, su uso elevado ha desencadenado un incremento importante en la prevalencia de la resistencia (5).

La adquisición y la diseminación de la resistencia a los antibióticos es un factor de supervivencia en presencia de éstos, pero en su ausencia puede tener un coste biológico para la población al tener que competir con otras bacterias sensibles de la misma especie (7). Este coste biológico puede observarse, entre otras causas, por una velocidad de crecimiento disminuida o por una pérdida de competitividad o de patogenicidad (8). Es cierto que a veces, pero no siempre, las bacterias disminuyen o eliminan ese coste biológico con otras mutaciones llamadas "compensatorias" (8).

Para una determinada presión antibiótica, el coste biológico determinará la extensión de la resistencia en un individuo (tracto intestinal) y en la comunidad (medio ambiente). Si el coste biológico es muy elevado, las cepas resis-

tentes tenderán a extinguirse o a mantenerse en muy pequeña proporción al competir con las sensibles, lo que dificultaría que causasen infección por simple cálculo de probabilidades. Un mayor coste biológico, expresado como menor velocidad de crecimiento, también influirá en la posibilidad de causar infecciones del tracto urinario, ya que está demostrado que se necesita una velocidad mínima de crecimiento para establecer una infección en la vejiga (9).

La baja resistencia a la fosfomicina también puede deberse a las altas concentraciones que se alcanzan en la orina, que superan las concentraciones preventivas de mutantes y evitan su aparición.

El objetivo de este estudio fue examinar y valorar cómo compiten *in vitro* por el mismo sustrato alimentario cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a la fosfomicina aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. Si hubiera diferencias en la velocidad de crecimiento a favor de las sensibles, ello podría explicar por qué no se ha extendido (y sería poco probable que se extendiese) la resistencia a la fosfomicina, y por qué es menos probable que causen infecciones del tracto urinario las cepas resistentes que las sensibles.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepas

Se utilizaron cepas clínicas causantes de infecciones del tracto urinario resistentes a la fosfomicina ( $n = 11$ ). Se determinó la CMI de la fosfomicina por dilución en agar Mueller-Hinton según el método del CLSI, y la de otros antibióticos (ampicilina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, gentamicina, cefuroxima y cefotaxima) por microdilución en caldo Mueller-Hinton. Se comprobó si fermentaban o no la lactosa.

Igualmente, se seleccionaron cepas clínicas causantes de infecciones del tracto urinario sensibles a la fosfomicina ( $n = 15$ ) y con el resto del patrón de antibiograma idéntico a alguna o varias de las resistentes. El resultado de la

**Tabla 1. Cepas de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario empleadas en el estudio.**

Nº	<i>E. coli</i> R-Fos (CMI >128 mg/l)			Nº	<i>E. coli</i> Fos-S (CMI ≤8 mg/l)	
	CMI fosfomicina	Lactosa	Resist. otros antibióticos		Lactosa	Resist. otros antibióticos
1	>256	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal	14	L(-)	Am, SxT, Cip, Nal
2	>256	L(+)	Am, Cip, Nal	15	L(-)	Am, SxT, Cip, Nal
3	>256	L(+)	Am, Cip, Nal	16	L(-)	Am, SxT, Cip, Nal
4	>1024	L(+)	Am, Sxt, Gn, Cip, Nal	17	L(-)	Am, Cip, Nal
5	256	L(+)	Am, Cip, Nal	18	L(-)	Am, Cip, Nal
6	>256	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal	19	L(-)	Am, SxT, Gn, Cip, Nal
7	>1024	L(+)	Am, Sxt, Gn, Cip, Nal	20	L(-)	Am, SxT, Gn, Cip, Nal
9	>1024	L(+)	Am, Sxt, Gn, Cip, Nal	21	L(-)	Am, Cip, Nal
10	>256	L(+)	Am, Cip, Nal	22	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal
11	>1024	L(-)	Am, Sxt, Cip, Nal	23	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal
12	>1024	L(+)	Am, SxT, Gn, Cip, Nal	24	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal
				25	L(+)	Am, SxT, Cip, Nal
				26	L(-)	Am, SxT, Cip, Nal
				27	L(-)	Am, SxT, Gn, Cip, Nal
				28	L(-)	Am, Cip, Nal

Fos: fosfomicina; Am: ampicilina; SxT: cotrimoxazol; Cip: ciprofloxacino; Gn: gentamicina; Nal: ácido nalidíxico.

L(+): fermenta la lactosa. L(-): no fermenta la lactosa.

En medio caldo nutriente se hicieron los siguientes experimentos: cepa 1 con cepas 14, 15 y 16; cepa 2 con cepas 17, 18 y 21; cepa 3 con cepa 17; cepa 4 con cepas 19, 20 y 27; cepa 5 con cepas 17, 21 y 28; cepa 6 con cepas 14, 15, 16 y 26; cepa 7 con cepas 19, 20 y 27; cepa 9 con cepas 19 y 27; cepa 10 con cepas 17, 18, 21 y 28; cepa 11 con cepas 22, 23, 24 y 25; y cepa 12 con cepas 19, 20 y 27.

fermentación de la lactosa era el contrario del de la cepa resistente a la fosfomicina con que se pretendía competir (si una era lactosa positiva, la otra era lactosa negativa) (Tabla 1).

### Experimentos para valorar la competitividad (*fitness*) (10)

Se pusieron a competir cepas por pares en caldo nutriente. Las cepas se ponían a competir en igual cantidad [aproximadamente 50% y 50% (entre 45% y 55%)] durante cuatro días, con cambio diario a nuevo medio. Cada cepa se cultivó primero por separado en el medio durante 18 a 24 horas. Luego se hizo una dilución 1:10<sup>4</sup> de cada cepa en el mismo medio en que se pusieron a crecer 18 a 24 horas por separado. Después se mezclaron ambos cultivos en una proporción 1:1 y se inoculó una dilución 1:100 en el medio. A las 24 horas de crecimiento del cultivo-mezcla se volvió a inocular una dilución 1:100 en el medio usado. Este proceso se realizó diariamente por un total de cuatro pases. Cada día (días 0 a 4) se hacían diluciones seriadas, de las cuales se cultivaban 10 µl en placas de agar MacConkey que se incubaban 18 a 24 horas y en ellas se realizaba el recuento bacteriano y la proporción de cada cepa (lactosa + y lactosa -). Por tanto, se hicieron cinco recuentos diferenciales (días 0, 1, 2, 3 y 4). Los experimentos se repitieron por triplicado y los resultados son la media.

### RESULTADOS

Se hicieron 33 experimentos triplicados de competición por pares de cepas (fosfomicina-R frente a fosfomicina-S, con el resto de determinantes de resistencia iguales y con distinta capacidad de fermentar la lactosa para poder realizar los recuentos diferenciales en agar MacConkey).

En 20 de los 33 experimentos (60,6%) hubo un aumento relativo de la cepa sensible a la fosfomicina, que se tradujo en que al cuarto día había de éstas más del 60% (entre el 65% y el 99%) (ver ejemplo en la Fig. 1).

En seis de los 33 experimentos (18,2%) hubo un aumento relativo de la cepa resistente a la fosfomicina, que se tradujo en que al cuarto día había de éstas más del 60% (entre el 65% y el 75%).

En siete de los 33 experimentos (21,2%) ninguna de las cepas alcanzó al cuarto día el 60%.

Cuando se analizaron los datos de los 26 (20 + 6) experimentos en que hubo cambios por la prueba de  $\chi^2$  se vio que había una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.044$ ).

### DISCUSIÓN

Las cepas resistentes a la fosfomicina de este trabajo son de origen clínico, o sea, seleccionadas *in vivo*. Las cepas clínicas tienen diferentes contextos genéticos que pue-

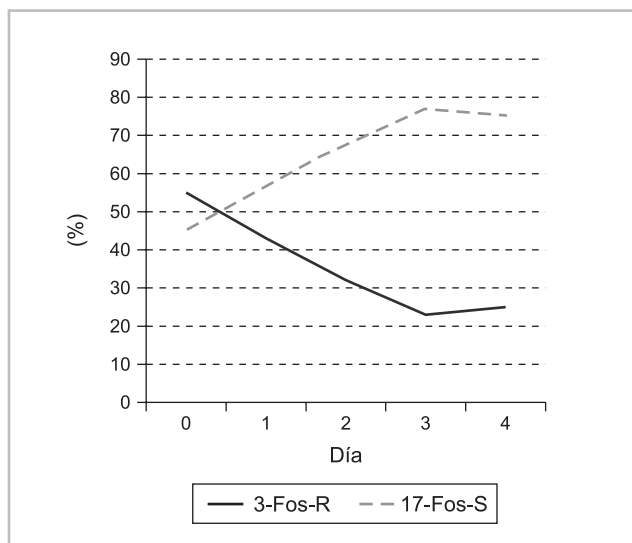


Figura 1. Competición entre la cepa 3 resistente a la fosfomicina y la cepa 17 sensible a la fosfomicina.

den afectar a la comparación, es decir, no son isogénicas, y esto debe considerarse una limitación del estudio.

En el intestino, ambiente natural de *E. coli*, las mutantes resistentes seleccionados deben competir por los nutrientes con las cepas sensibles que han quedado tras el tratamiento o que han llegado del exterior y han recolonizado el hábitat. El resultado de la competición dependerá de la competitividad de cada población.

*In vitro* hay una alta frecuencia de mutación que genera resistencia a la fosfomicina, por lo que sería esperable que esto ocurriese *in vivo*. Sin embargo, el hecho es que de muestras clínicas se aíslan pocas cepas de *E. coli* resistentes a la fosfomicina, pese a su uso frecuente durante años (5, 6). Los resultados de nuestro trabajo de competición entre cepas, según los cuales la mayoría de las veces (60,6%) la cepa sensible competía favorablemente con la resistente, avalan que un alto porcentaje de las cepas de origen clínico resistentes a la fosfomicina sufren una reducción de la velocidad de crecimiento (uno de los mecanismos de la competitividad).

En otros trabajos, realizados con distinta metodología, se ha visto que en algunos casos las mutantes resistentes no serían viables y en otros tendrían menos competitividad frente a las cepas sensibles (11). En el estudio de Marchese y cols. (12), sus dos cepas de *E. coli* resistentes a la fosfomicina mostraban una velocidad de crecimiento disminuida. Eso impediría su asentamiento en el intestino y su posterior diseminación a otras personas.

Por tanto, la frecuencia de mutación elevada de genes de *E. coli* que confieren resistencia a la fosfomicina quizá no sea un parámetro muy relevante. Parece probable que a la hora de evaluar el riesgo de desarrollo de resistencias sea más importante el coste biológico que tienen que pagar esas mutantes (en ausencia de antibiótico, que son las condiciones normales) cuando compiten con cepas sensibles (13).

En otros microorganismos, como el neumococo, se ha descrito recientemente el coste que pagan las cepas resistentes a la penicilina cuando compiten con sus antepasados sensibles para colonizar las vías respiratorias altas de ratas (14). También se observó un coste biológico en tres de cuatro cepas de *E. coli* con un plásmido de resistencia al sulfametoxazol (10). Sin embargo, se han descrito casos en que, tras un periodo de adaptación al huésped, ocurren mutaciones en otros lugares (mutaciones compensatorias) que reducen o eliminan el coste de la primera mutación (15). Incluso se ha observado que las bacterias resistentes por un plásmido pueden, por mutaciones compensatorias, tener más competitividad (en este caso mayor velocidad de crecimiento) que las sensibles libres del plásmido (10, 16).

La reducción de la población resistente depende de que la resistencia ejerza un coste de competitividad en las bacterias en ausencia de antibióticos. De los datos de nuestro estudio, teniendo en cuenta las limitaciones referidas, concluimos que la resistencia a la fosfomicina puede suponer un coste biológico (menor competitividad) para la mayoría de las cepas de *E. coli* estudiadas. Este coste biológico dificultaría su competición con las cepas sensibles en la flora intestinal normal, lo que haría menos probable que causasen infecciones del tracto urinario. La persistencia de la resistencia a la fosfomicina en niveles bajos podría explicarse parcialmente por el hecho de que no toda la resistencia a la fosfomicina supone un coste de competitividad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por una beca de Laboratorios Zambón, Barcelona, España. Ha sido presentado al 17º European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich, Alemania, 31 marzo - 3 abril de 2007.

**Correspondencia:** Dr. J.I. Alós, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, Carretera Toledo km. 12,5, 28905 Getafe, Madrid, España. E-mail: nachoalos@microb.net

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., Kropp, H. *The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin)*. Ann NY Acad Sci 1974; 235: 364-386.

2. Kadner, R.J., Winckler, H.H. *Isolation and characterization of mutations affecting the transport of hexose phosphates in Escherichia coli*. J Bacteriol 1973; 113: 895-900.
3. Arca, P., Reguera, G., Hardisson, C. *Plasmid-encoded fosfomicin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey*. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 393-399.
4. Mendoza, M.C., García, J.M., Llana, J., Méndez, F.J., Hardisson, C., Ortiz, J.M. *Plasmid-determined resistance to fosfomicin in Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 215-219.
5. Andreu, A., Alós, J.I., Gobernado, M. y cols. *Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 4-9.
6. Kahlmeter, G. *An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: The ECO.SENS Project*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 69-76.
7. Martínez, J.L., Baquero, F. *Mutation frequencies and antibiotic resistance*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1771-1777.
8. Andersson, D.I., Levin, B.R. *The biological cost of antibiotic resistance*. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 489-493.
9. Gordon, D.M., Riley, M.A. *A theoretical and experimental analysis of bacterial growth in the bladder*. Mol Microbiol 1992; 6: 555-562.
10. Enne, V.I., Bennett, P.M., Livermore, D.M., Hall, L.M. *Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure*. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 958-963.
11. Nilsson, A.I., Berg, O.G., Aspevall, O., Kahlmeter, G., Andersson, D.I. *Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2850-2858.
12. Marchese, A., Gualco, L., Debbia, E.A., Schito, G.C., Schito, A.M. *In vitro activity of fosfomicin against gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomicin resistance*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22 (Suppl. 2): 53-59.
13. Björkman, J., Andersson, D.I. *The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective*. Drug Resist Update 2000; 3: 237-245.
14. Trzcinski, K., Thompson, C.M., Gilbey, A.M., Dowson, C.G., Lipsitch, M. *Incremental increase in fitness cost with increased beta-lactam resistance in pneumococci evaluated by competition in an infant rat nasal colonization model*. J Infect Dis 2006; 193: 1296-1303.
15. Reynolds, M.G. *Compensatory evolution in rifampin-resistant Escherichia coli*. Genetics 2000; 156: 1471-1481.
16. Lenski, R.E., Simpson, S.C., Nguyen, T.T. *Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness*. J Bacteriol 1994; 176: 3140-3147.