

O. Noguera¹
J. C. Rodríguez²
R. Cremades²
M. Ruiz²
G. Royo^{2,3}

Generación *in vitro* de mutantes de *Klebsiella pneumoniae* tras exposición a fluoroquinolonas. Relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido

¹Hospital Vega Baja de Orihuela
Alicante
²Hospital General Universitario de Elche
Alicante
³Universidad Miguel Hernández
Elche (Alicante)

Con objeto de aportar datos que ayuden a explicar la asociación entre producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistencia a fluoroquinolonas en *Klebsiella pneumoniae*, hemos desarrollado un modelo *in vitro* de exposición a concentraciones subinhibitorias de varios fármacos de esta familia (ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino) con dos cepas, una productora de BLEE.

Nuestros datos muestran que aparecen mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en los dos casos, pero más precozmente en cepas productoras de BLEE (13,3 frente a 14,4 días), sobre todo tras exposición a ciprofloxacino (12,5 frente a 14,9 días para levofloxacino y 14,2 días para moxifloxacino).

Por tanto, nuestros datos ayudan a explicar la mayor resistencia a fluoroquinolonas en cepas productoras de BLEE y confirman la necesidad de administrar dosis adecuadas de fluoroquinolonas, especialmente de ciprofloxacino, con objeto de prevenir la aparición de mutantes resistentes, sobre todo si la cepa es productora de BLEE.

Palabras clave:

Klebsiella pneumoniae. Fluoroquinolonas. BLEE. Ciprofloxacino. Levofloxacino.

Rev Esp Quimioter 2008;21(3):180-183

In vitro generation of mutants of *Klebsiella pneumoniae* following exposure to fluorquinolones. Relationship with the presence of extended spectrum betalactamasas

In order to provide data that may help to explain the relationship between production of extended spectrum betalactamasas and fluorquinolone resistance in *Klebsie-*

lla pneumoniae, we have developed an *in vitro* model of exposure to sub-inhibitory concentrations of various fluorquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin) in two strains, one of which is a producer of extended spectrum betalactamasas (ESBL).

Our data show that mutants with reduced fluorquinolone susceptibility appear in both cases, but that they appear earlier in ESBL-producing strains (13.3 days versus 14.4 days), especially following exposure to ciprofloxacin (12.5 days versus 14.9 days for levofloxacin and 14.2 days for moxifloxacin).

Therefore, our data help explain the greater fluorquinolone resistance in ESBL-producing strains and confirm the need to administer the correct doses of fluorquinolones, especially in the case of ciprofloxacin, in order to prevent the emergence of resistant mutants. This is particularly important if the strain is an ESBL-producer.

Key words:

Klebsiella pneumoniae. Fluorquinolones. ESBL. Ciprofloxacin. Levofloxacin.

INTRODUCCIÓN

Las cepas de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituyen un importante problema de salud pública debido a la resistencia que presentan a la gran mayoría de los betalactámicos; además estas cepas suelen presentar resistencia a otros grupos de antibióticos, como fluoroquinolonas, fosfomicina y cotrimoxazol^{1,2}. Además, la resistencia a fluoroquinolonas se asocia a una mayor mortalidad de los pacientes con estas infecciones³.

El porcentaje de cepas productoras de BLEE en *Klebsiella pneumoniae* es variable en función de la región; así, en el proyecto SENTRY el mayor porcentaje de cepas resistentes se encontraba en América Latina (45%), región del Pacífico Oeste (25%), Europa (23%), EE. UU. (8%) y Canadá (5%)⁴.

Correspondencia:
Obdulia Noguera Moya
Hospital Vega Baja
Ctra. Orihuela-Almoradi, s/n
03314 Orihuela (Alicante)
Correo electrónico: noguera_obd@gva.es

En nuestro medio hemos descrito previamente un incremento importante de las cepas productoras de BLEE y hemos observado que en estas cepas los porcentajes de resistencia a fluoroquinolonas son superiores al resto de las enterobacterias no productoras de BLEE^{5,6}.

Por tanto, con objeto de aportar datos que ayuden a explicar este fenómeno hemos desarrollado un modelo experimental *in vitro* de exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de diversas fluoroquinolonas y hemos estudiado algunas características de los mutantes generados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

Se ensayaron dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas en infecciones urinarias de pacientes de nuestro medio. Ambas cepas eran sensibles a fluoroquinolonas, pero una era productora de BLEE (CTX-M-9).

Antibióticos

Los antibióticos ensayados fueron: ciprofloxacino (Bayer. Barcelona, España), levofloxacino (Hoechst. Barcelona, España) y moxifloxacino (Bayer. Barcelona, España).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó mediante el sistema Wider (Soria Melguizo. Madrid, España) con confirmación posterior por E-test (AB Biodisk. Solna, Suecia). La CMI de los mutantes generados se estudió mediante E-test (AB Biodisk. Solna, Suecia) realizados según las instrucciones del fabricante y las normas del CLSI.

Técnica utilizada para la generación de mutantes

Se generaron mutantes mediante exposición repetida (25 pases) a concentraciones constantes de las diversas fluoroquinolonas. El experimento se realizó por triplicado utilizando tres concentraciones distintas (0,015, 0,125 y 1 µg/ml). En los días 0, 5, 10, 15, 20 y 25 se estudió la presencia de mutantes con sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas mediante subcultivos en agar Mueller Hinton, incubación a 37 °C durante 24 h y estudio de su sensibilidad antibiótica^{7,8}.

Estudio de las frecuencias de mutación

Primero se cultivaron las cepas originales y los mutantes en caldo Luria Bertani y posteriormente se pusieron en con-

Tabla 1	Disminución de la sensibilidad a las quinolonas		
	Antibiótico	CMI inicial (µg/ml)	CMI mutantes (µg/ml)
<i>K. pneumoniae</i> no productora de BLEE	Ciprofloxacino	0,023	0,43
	Levofloxacino	0,047	0,45
	Moxifloxacino	0,047	0,36
<i>K. pneumoniae</i> productora de CTX-M-9	Ciprofloxacino	0,38	32
	Levofloxacino	0,5	1,16
	Moxifloxacino	1	26,66
* Media de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los mutantes (día 25) (µg/ml).			

tacto con dos placas de agar Luria Bertani, una con 100 µg/ml de rifampicina. Tras incubación a 37 °C durante 48 h se determinó la frecuencia de mutación según la proporción de colonias resistentes a rifampicina respecto al total de colonias que crecían en el medio sin antibiótico⁹.

RESULTADOS

En todos los casos los mutantes generados presentaban una disminución de la sensibilidad antibiótica a todas las fluoroquinolonas (tabla 1). El tiempo necesario para desarrollar esta disminución en la sensibilidad dependió de la quinolona y su concentración de exposición, así como de la presencia de BLEE. La cepa productora de BLEE genera mutantes más rápidamente (13,3 días de media) que la no productora (14,4 días de media) (tabla 2).

Tabla 2	Tiempo de aparición de los mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas (expresado en días)			
	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino	Media
<i>K. pneumoniae</i> no productora de BLEE	13,3	16,6	13,3	14,4
<i>K. pneumoniae</i> productora de CTX-M-9	11,6	13,3	15	13,3
Media	12,5	14,9	14,2	
BLEE: betalactamasas de espectro extendido.				

Al comparar la capacidad de generación de mutantes de las diferentes fluoroquinolonas se observa que el ciprofloxacino es la fluoroquinolona que genera mutantes más rápidamente (12,5 días de media frente a 15 días para levofloxacino y 14,2 días para moxifloxacino) (tabla 2).

Si analizamos los datos en función de la concentración de antibiótico utilizada en la generación de mutantes se observa que las concentraciones más elevadas de fármacos generan mutantes más rápidamente (5,8 días de media para la concentración de 1 µg/ml frente a 15 para la concentración de 0,125 µg/ml y 20,8 días de media para la concentración de 0,015 µg/ml (tabla 3).

En el modelo *in vitro* desarrollado no hemos encontrado la presencia de hipermutantes ($f > 4 \times 10^{-7}$) en ninguno de los mutantes generados a partir de las dos cepas estudiadas.

DISCUSIÓN

Este trabajo pretende aportar datos que ayuden a explicar la mayor resistencia a fluoroquinolonas descrita en cepas productoras de BLEE tratando de simular situaciones que pueden producirse tras la administración de tratamientos incorrectos, falta de adherencia al tratamiento o utilización de fluoroquinolonas en veterinaria a dosis bajas. Hemos observado que aunque aparecen mutantes con sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas en las dos cepas estudiadas, este fenómeno se produce con más rapidez en cepas productoras de BLEE, sobre todo si están expuestas a ciprofloxacino.

Nuestro trabajo aporta datos que ayudan o complementan estudios previos que señalan que hay asociación entre el consumo previo de fluoroquinolonas u otros antibióticos y el aislamiento de cepas productoras de BLEE^{10,11}. También ayudan a explicar la relación entre la producción de BLEE y la mayor proporción de cepas resistentes a fluoroquinolonas¹² y el in-

cremento de cepas resistentes a fluoroquinolonas asociado al consumo de cefalosporinas de espectro extendido y no asociado al consumo de otros antibióticos¹³.

Se ha comunicado que se está incrementando el porcentaje de portadores fecales de cepas productoras de BLEE con coresistencia a fluoroquinolonas¹⁴, por lo que probablemente en ese medio es donde se produce la generación de mutantes resistentes por contacto de las bacterias con concentraciones subinhibitorias de antibióticos como resultado de interacciones complejas entre el genoma bacteriano y la presión selectiva de los nichos ecológicos¹⁵. Sin embargo, este fenómeno es difícil de controlar, ya que se ha comunicado que a pesar del incremento de tasas de resistencia antibiótica que genera la utilización del levofloxacino como profilaxis de la neutropenia, su utilización tiene un impacto beneficioso en cuanto a mortalidad y a morbilidad en estos pacientes¹⁶.

Por otra parte, este fenómeno complejo no está totalmente caracterizado, ya que un estudio casos control realizado para detectar los factores de riesgo de generación de cepas multirresistentes en *K. pneumoniae* no muestra que el consumo previo de antibióticos sea un factor de riesgo y señala la importancia de la transmisión horizontal de cepas previamente resistentes¹⁷.

La asociación entre la resistencia cromosómica a fluoroquinolonas y la producción de BLEE asociada a la presencia de plásmidos no se ha explicado completamente a nivel genético. Se ha descrito la presencia de plásmidos que codifican sistemas toxina-antitoxina y también la existencia de toxinas que se unen a la DNA girasa. La presencia de plásmidos que codifiquen estas toxinas pueden predisponer a la resistencia a fluoroquinolonas¹⁸. Sin embargo, éste es un fenómeno muy complejo y aún poco conocido, ya que se ha comunicado que el análisis de la expresión génica mediante microarrays de varias cepas de *K. pneumoniae* muestra que las cepas resistentes presentaban sobreexpresión de 19 genes asociados a proteínas ribosomales o a metabolismo del tRNA y escasa expresión de 33 genes, generalmente asociados al metabolismo del nitrógeno. Un gen asociado a un transportador ABC mostraba una gran sobreexpresión, lo que sugiere la implicación de los sistemas *pump efflux*¹⁹. Por otra parte, otro estudio muestra que las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE muestran frecuentemente una mutación en el gen *parE* asociada a la resistencia a las fluoroquinolonas²⁰.

Nuestro trabajo también señala la necesidad de emplear dosis suficientemente elevadas de fluoroquinolonas para prevenir la selección de mutantes, confirmando los datos, previamente comunicados, que muestran que la utilización de ciprofloxacino a dosis de 750 mg dos veces al día es la única dosificación de este fármaco que previene la selección de cepas con mutaciones en el gen de la girasa en *E. coli*²¹.

Por tanto, creemos que nuestro trabajo aporta datos que pueden contribuir a conocer este importante fenómeno y señala la necesidad de utilizar las fluoroquinolonas a dosis sufi-

Tabla 3	Aparición de los mutantes expresado en días según la concentración de fluoroquinolona de exposición			
	0,015 (µg/ml)	0,125 (µg/ml)	1 (µg/ml)	Media
<i>K. pneumoniae</i> no productora de BLEE	23,3	13,3	6,6	14,4
<i>K. pneumoniae</i> productora de CTX-M-9	18,3	16,6	5	13,3
Media	20,8	14,9	5,8	

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

cientemente elevadas, sobre todo de ciprofloxacino, para alcanzar niveles tisulares adecuados en el lugar de la infección y prevenir la aparición de cepas resistentes a estos compuestos, sobre todo si hay sospecha clínica de infección por una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE.

BIBLIOGRAFÍA

- Zimhony O, Chmelnitsky I, Bardenstein R, Goland S, Hammer Muntz O, Navon Venezia S, et al. Endocarditis caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: emergence of resistance to ciprofloxacin and piperacillin-tazobactam during treatment despite initial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3179-82.
- Giamarellou H. Multidrug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2005;11:1-16.
- 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; 41:923-9.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001;15;32(Suppl. 2):S94-103.
- Yagüe A, Cebrían L, Rodríguez-Díaz JC, Gonzalo-Jiménez N, Royo G, Campillos 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 período 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:76-9.
- Valverde A, Coque TM, Miguel LG, Baquero F, Cantón R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:64-72.
- Rodríguez JC, Llinares F, Royo G. *In vitro* development of resistance to three quinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Chemotherapy*. 2001;47:39-42.
- Baquero MR, Galán JC, Turrientes MC, Cantón R, Coque TM, Martínez JL, et al. Increased mutation frequencies in *Escherichia coli* isolates harboring extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4754-6.
- Baquero MR, Nilsson AI, Turrientes MC, Sandvang D, Galán JC, Martínez JL, et al. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol* 2004;186:5538-42.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089-94.
- Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001;32:1162-71.
- Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kucuker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:72-5.
- Hsueh PR, Chen WH, Luh KT. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:463-72.
- Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J Clin Microbiol* 2004;42: 4769-75.
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 2005;11:54-61.
- Reuter S, Kern WV, Sigge A, Döhner H, Marre R, Kern P, et al. Impact of fluoroquinolone prophylaxis on reduced infection-related mortality among patients with neutropenia and hematologic malignancies. *Clin Infect Dis* 2005;40:1087-93.
- Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB, et al. Risk factors for increasing multidrug resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella species*. *Clin Infect Dis* 2005;40:1317-24.
- Ellington MJ, Woodford N. Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1026-9.
- Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Development of high-level ceftazidime resistance via single-base substitutions of blaCTX-M-3 in hyper-mutable *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:803-6.
- Sorlozano A, Gutiérrez J, Jiménez A, De Dios Luna J, Martínez JL. Contribution of a New Mutation in parE to Quinolone Resistance in Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:2740-2.
- Olofsson SK, Marcusson LL, Strömbäck A, Hughes D, Cars O. Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:795-801.