

M.^a S. Hernández¹
J. Á. García^{1,2}
J. L. Muñoz^{1,2}

Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido

¹ Departamento de Microbiología
Hospital Universitario de Salamanca
Salamanca

² Departamento de Medicina Preventiva,
Salud Pública y Microbiología Médica
Universidad de Salamanca
Salamanca

Se ha determinado la actividad *in vitro* de fosfomicina, comparada con otros antimicrobianos de uso urinario, frente a aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* de origen urinario productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Se estudió mediante dilución en agar o E-test la actividad de fosfomicina, cotrimoxazol, ciprofloxacino, nitrofurantoina, amoxicilina/clavulánico y gentamicina frente a 71 cepas de *E. coli* y 13 de *K. pneumoniae* de origen urinario y productoras de BLEE. Las cepas de *E. coli* producían sobre todo BLEE de tipo CTX-M (76,1%), y principalmente CTX-M 14 (56,3%). Las cepas de *K. pneumoniae* produjeron casi exclusivamente enzimas tipo SHV (92,3%), prevaleciendo SHV-2 (76,9%). Gentamicina (4,4%), fosfomicina (5,6%) y nitrofurantoina (5,6%) mostraron los menores porcentajes de resistencia en *E. coli*. Co-trimoxazol y ciprofloxacino (7,7%) mostraron los porcentajes de resistencia más bajos en *K. pneumoniae*.

Palabras clave:
Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Fosfomicina.

Rev Esp Quimioter 2009;22(1):25-29

In vitro activity of fosfomycin against ESBL-producing enterobacteria of urinary origin

In vitro activity of fosfomycin, compared with other antibiotics used for urinary tract infections (UTI), against extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates obtained from UTIs, was determined. The activity of fosfomycin, co-trimoxazole, ciprofloxacin, nitrofurantoin, amoxicillin/ clavulanic acid and gentamicin against 71 ESBL-producing *E. coli* clinical isolates and 13 ESBL-producing *K. pneumoniae* clinical isolates obtained from

UTI was studied by the agar-dilution method or E-test. *E. coli* isolates produced mainly CTX-M type ESBL (76.1%), especially CTX-M 14 (56.3%). *K. pneumoniae* isolates produced most predominantly SHV-type ESBL (92.3%), mainly SHV-2 (76.9%). Gentamicin (4.4%), fosfomycin (5.6%) and nitrofurantoin (5.6%) showed the lowest resistance proportions against *E. coli*. Co-trimoxazole and ciprofloxacin (7.7%) showed the lowest resistance proportions against *K. pneumoniae*.

Key words:
Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL). Fosfomycin.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen una de las infecciones bacterianas diagnosticadas con mayor frecuencia, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad. Más del 80% de las ITU no complicadas son causadas por *Escherichia coli*. Otros uropatógenos habituales son *Staphylococcus saprophyticus* en ITU no complicadas, y bacilos gramnegativos (enterobacterias distintas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y cocos grampositivos en ITU complicadas¹. Existen diversas pautas terapéuticas aceptables en infecciones urinarias no complicadas (cotrimoxazol, betalactámicos y fluoroquinolonas, entre otras). Sin embargo, algunas de ellas se están viendo seriamente afectadas por la emergencia de resistencias. Así, la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) parece estar en claro aumento, también en el ámbito comunitario^{2,3}. Ha de tenerse en cuenta que la rápida progresión de la producción de BLEE del tipo CTX-M, presentes sobre todo en *E. coli*, acentúa más si cabe la importancia de la producción de BLEE en ITU no complicadas. Del mismo modo, la resistencia a fluoroquinolonas, sobre todo en *E. coli*, se sitúa en España en cifras próximas al 20% y la resistencia a SXT entre el 30 y el 50%⁴.

Fosfomicina (ácido 1,2-epoxipropilfosfónico) es un antimicrobiano que actúa sobre las primeras fases de la síntesis de la pared bacteriana. Se trata de un antimicrobiano de

Correspondencia:
J.Á. García Rodríguez
Departamento de Microbiología
Hospital Universitario de Salamanca
P.º de San Vicente s/n
37007 Salamanca
Correo electrónico: jagarrod@usal.es

amplio espectro, bactericida, indicado sobre todo en el tratamiento de ITU no complicadas, en las que se puede utilizar en monodosis.

Puesto que estudios previos muestran una excelente actividad de fosfomicina, de forma global, en ITU no complicadas^{4,5}, con muy bajos porcentajes de resistencia, en este estudio hemos querido determinar su comportamiento específico frente a cepas productoras de BLEE sensibles y resistentes a fluoroquinolonas y cotrimoxazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

Se seleccionaron 84 aislamientos urinarios obtenidos a lo largo de 2 años en el Hospital Universitario de Salamanca, no relacionados epidemiológicamente, procedentes de pacientes distintos, y que se habían demostrado productores de BLEE. Las cepas fueron inicialmente clasificadas como probables productoras de BLEE según los criterios del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)⁶, confirmándose posteriormente la presencia de dichas enzimas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Antimicrobianos

Fosfomicina, cotrimoxazol, ciprofloxacino, nitrofurantoina, amoxicilina/clavulánico y gentamicina se utilizaron como producto puro valorado, obtenido de los respectivos fabricantes, o como E-test (AB Biodisk, IZASA).

Estudios de sensibilidad

Los estudios de sensibilidad se realizaron mediante dilución en agar o mediante E-test, de acuerdo con los protocolos y normas recomendados por el CLSI.

Caracterización de las BLEE

Las BLEE se caracterizaron mediante isoelectroenfoque (PhastSystem, GE HealthCare) y posterior extracción de ADN plasmídico, amplificación mediante PCR y secuenciación por el método de Sanger con iniciadores específicos de grupo para TEM, SHV y CTX-M³. Posteriormente, se caracterizaron definitivamente las enzimas de cada grupo mediante amplificación y secuenciación de zonas con secuencias o mutaciones específicas.

RESULTADOS

De los 84 aislamientos seleccionados, 71 (84,5%) eran *E. coli* y 13 (15,5%), *K. pneumoniae*. El origen era comunitario

en 47 casos (55,9%) y nosocomial en 37 casos (44,1%). En conjunto, las BLEE encontradas con mayor frecuencia fueron las del grupo CTX-M (54 aislamientos, 64,3%), seguidas del grupo SHV (22 aislamientos, 26,2%) y el grupo TEM (8 aislamientos, 9,5%) (tabla 1). Entre los aislamientos de *E. coli*, la mayor parte producían BLEE del tipo CTX-M, principalmente CTX-M 14, seguida de CTX-M 15 y CTX-M 9. Todos los aislamientos de *K. pneumoniae* excepto uno producían BLEE del grupo SHV, principalmente SHV-2.

Los aislamientos de *E. coli* mostraron una excelente sensibilidad a fosfomicina, con unos niveles de resistencia entre las cepas comunitarias del 4,5%, del 7,4% entre las hospitalarias, y unos niveles globales de resistencia del 5,5%. Por el contrario, los niveles de actividad frente a *K. pneumoniae* fueron muy inferiores, mostrándose todos los aislamientos con sensibilidad intermedia (3 aislamientos, 23,1% del total), o resistentes (10 aislamientos, 76,9%).

Los porcentajes de resistencia a otros antimicrobianos de uso habitual en ITU aparecen en la tabla 2.

Tabla 1	Características de los aislamientos estudiados			
Especie y origen	Grupo BLEE	BLEE		
<i>E. coli</i> comunitario: 44 (62,0%)	TEM	5 (11,4%)	TEM 116	3 (6,8%)
			TEM 20	1 (2,3%)
			TEM 52	1 (2,3%)
	SHV	7 (15,9%)	SHV 12	5 (11,4%)
			SHV 2	1 (2,3%)
			SHV 5	1 (2,3%)
			SHV 12	1 (2,3%)
	CTX-M	32 (72,7%)	CTX-M 14	19 (43,2%)
			CTX-M 15	9 (20,5%)
			CTX-M 9	2 (4,6%)
CTX-M 1			1 (2,3%)	
CTX-M 10			1 (2,3%)	
<i>E. coli</i> nosocomial: 27 (38,0%)	TEM	2 (7,4%)	TEM 116	2 (7,4%)
	SHV	3 (11,1%)	SHV 12	3 (7,4%)
	CTX-M	22 (81,5%)	CTX-M 14	21 (77,8%)
CTX-M 27			1 (3,7%)	
<i>K. pneumoniae</i> comunitaria: 3 (23,1%)	SHV	3 (100%)	SHV 2	2 (15,4%)
			SHV 12	1 (7,7%)
<i>K. pneumoniae</i> nosocomial: 10 (76,9%)	TEM	1 (10%)	TEM 116	1 (7,7%)
	SHV	9 (90%)	SHV 2	8 (61,5%)
			SHV 11	1 (7,7%)

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

Tabla 2	Sensibilidad a antimicrobianos de las cepas estudiadas		
	<i>E. coli</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)	Total (%)
Fosfomicina			
S	94,4	–	79,8
I	–	23,1	3,6
R	5,6	76,9	16,6
Cotrimoxazol			
S	54,9	92,3	60,1
I	–	–	–
R	45,1	7,7	39,9
Ciprofloxacino			
S	29,6	76,9	36,9
I	7,0	15,4	8,3
R	63,4	7,7	54,8
Nitrofurantoína			
S	94,4	61,5	89,3
I	–	–	–
R	5,6	38,5	10,7
Amoxicilina/ clavulánico			
S	80,3	84,6	81,0
I	5,6	–	4,8
R	14,1	15,4	14,2
Gentamicina			
S	95,8	76,9	92,9
I	–	–	–
R	4,2	23,1	7,1

S: sensibilidad; I: sensibilidad intermedia; R: resistencia.

DISCUSIÓN

La emergencia de la producción de BLEE está modificando de forma significativa la sensibilidad a antimicrobianos de las enterobacterias, y en especial de algunas de las más frecuentemente implicadas en ITU. Esto es especialmente cierto en España, debido al predominio de BLEE del tipo CTX-M, prevalentes en especial en *E. coli*. Estudios españoles recientes^{2,3} cifran en torno al 1-2% la prevalencia general de BLEE en enterobacterias, con predominio fundamentalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae* y aparición ocasional en otras enterobacterias (*Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, etc.), aunque algunas de las especies en las que este hallazgo es todavía infrecuente, como *Salmonella*, muestran una tendencia ascendente^{7,8}. Aunque inicialmente las BLEE aparecían sobre todo en brotes hospitalarios, poco a poco su producción ha ido derivando hacia el medio extrahospitalario, y en este momento casi la mitad de las cepas productoras de BLEE proceden de la comunidad^{2,3,9}.

Por otra parte, con frecuencia los genes codificadores de las BLEE van incluidos en integrones capaces de albergar genes de resistencia a otros antimicrobianos; a ello hay que añadir que se trata de cepas en las cuales la resistencia a betactámicos y la frecuente combinación de genes de resistencia en los integrones mencionados, obliga a la utilización de antimicrobianos en los que esta resistencia exógena desempeña un escaso papel, como son las fluoroquinolonas. Ello somete a este grupo a una mayor presión selectiva, y a una mayor selección de mutantes resistentes.

En el presente estudio, se confirma el predominio de *E. coli* como portador más frecuente de BLEE en nuestro medio. De las 84 cepas urinarias aisladas portadoras de BLEE, un 84,5% eran *E. coli*. Se confirma asimismo la baja frecuencia en especies distintas de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Todas las cepas detectadas pertenecían a estas especies.

Con una frecuencia incluso mayor que en otros estudios, las cepas aisladas de ITU y productoras de BLEE son mayoritariamente comunitarias en el caso de *E. coli* (62%). Esta cifra es alta si se compara con otros estudios en los que no se estudian sólo cepas urinarias, y en los que la proporción entre cepas nosocomiales y comunitarias suele estar al 50%^{2,3}. Sin embargo, la producción de BLEE en *K. pneumoniae*, en el presente estudio, se sigue mostrando como un fenómeno principalmente nosocomial. Tres de cada cuatro aislamientos productores de BLEE en *K. pneumoniae* tenían este origen.

Como en otros estudios publicados en España, las BLEE del grupo CTX-M muestran un claro predominio, sobre todo en *E. coli*, en las que suponen más del 70% tanto de las cepas nosocomiales como de las comunitarias^{2,3,9}. Las BLEE tipo TEM y SHV muestran una frecuencia similar, sin que existan grandes diferencias entre cepas comunitarias y nosocomiales.

Entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE tipo TEM predomina TEM-116, y entre las productoras de SHV predomina SHV-12. Sin embargo, el predominio más evidente se observa en el caso del grupo CTX-M, ya que CTX-M 14 supone el 59,4% de las CTX-M y el 43,2% de todas las BLEE producidas por *E. coli* en el ámbito comunitario, el 94,5% de todas las CTX-M y el 77,8% de todas las BLEE producidas en el ámbito nosocomial, y el 56,3% de todas las BLEE producidas por *E. coli* de forma global.

Sin embargo, este predominio no se extiende a *K. pneumoniae*, en las que sigue siendo muy mayoritario el grupo SHV. Dentro de este grupo destaca SHV2, que supone el 90,1% de la producción de SHV y el 69,2% de la producción total de BLEE en esta especie.

La imposibilidad de utilizar cefalosporinas en estos pacientes supone una limitación considerable, aunque *a priori* no sean la primera opción, y existan alternativas diversas. Sin embargo, el uso de otros antimicrobianos está sensible-

mente limitado. Llama la atención sobre todo el bajo porcentaje de cepas sensibles a ciprofloxacino en *E. coli*, que no llega al 30%. Estas cifras de sensibilidad son muy bajas incluso para una zona, como España, con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas. Así, una publicación reciente sobre infecciones urinarias con aislamientos de todo el país, refleja cifras de sensibilidad en torno al 77%, mantenidas además en cepas de 2002 y 2004^{4,5}. *K. pneumoniae* muestra niveles de resistencia a fluoroquinolonas sensiblemente inferiores a los de *E. coli*, pero también muy superiores a los de otros estudios, ya que las cifras de sensibilidad en estudios no seleccionados son del 93-96%, frente al 76,9% del estudio actual.

Del mismo modo, la sensibilidad a cotrimoxazol es muy baja (60,1%), debido sobre todo a los bajos porcentajes de sensibilidad de *E. coli*. Estos porcentajes, no obstante, no muestran una diferencia tan acusada como en el caso anterior respecto a estudios previos con cepas no seleccionadas. Así, estudios previos^{4,5} muestran unos porcentajes de sensibilidad de *E. coli* a cotrimoxazol del 65-70%, frente al 54,9% del estudio actual, y del 90-93% en *K. pneumoniae*, equiparables al 92,3% del presente estudio.

Otros estudios similares realizados en España recientemente muestran unas cifras de resistencia a fluoroquinolonas similares en *E. coli* (67,8%), pero muy superiores en *K. pneumoniae* (35,5 frente a 7,7% hallado en este estudio), aunque si se tienen en cuenta en el presente estudio todas las cepas no sensibles (resistentes más sensibilidad intermedia), la cifra se acerca bastante más (23,1%)¹⁰. Del mismo modo, las cifras de resistencia a cotrimoxazol en el presente estudio son inferiores al estudio de Cueto et al.¹⁰ (45,1 frente a 67,5%), y lo son aun más las de *K. pneumoniae* (7,7 frente a 50%).

Dentro de los fármacos de uso fundamentalmente urinario, tanto fosfomicina como nitrofurantoina muestran una actividad mucho más conservada frente a *E. coli* productor de BLEE. Así, en el presente estudio el 94,4% de las cepas fueron sensibles a fosfomicina, cifra similar al 97-98% que reflejan estudios sobre cepas no seleccionadas^{4,5,11}, y al 99,7% que refieren otros estudios sobre cepas productoras también de BLEE¹⁰. Fosfomicina muestra la limitación ya conocida de su peor actividad frente a *K. pneumoniae*, pero el franco predominio de *E. coli* en este tipo de infecciones y, como portador de BLEE en nuestro medio, hace que de forma global se muestre activa frente al 79,8% de las cepas productoras de BLEE y causantes de infección urinaria.

Una situación similar se observa en relación con nitrofurantoina, que mantiene una actividad muy estimable frente a *E. coli* (94,4%), similar a la observada en cepas no seleccionadas en otros estudios^{4,5,11}. Como en el caso anterior, su peor comportamiento frente a *K. pneumoniae* no repercute de manera grave en sus cifras finales de actividad frente a patógenos urinarios productores de BLEE.

En cuanto a otros antimicrobianos de uso frecuente en ITU, pero también en muchas otras circunstancias, amoxicilina/clavulánico muestra unos porcentajes de sensibilidad inferiores en un 10% respecto a otros estudios. En estudios previos sobre aislamientos urinarios, tanto de forma global como en cepas productoras de BLEE^{4,5,10,11}, *E. coli* muestra un porcentaje de sensibilidad a amoxicilina/clavulánico en torno al 90% (80,3% en la presente serie), y *K. pneumoniae* en torno al 95% (84,6% en este caso).

Por su parte, gentamicina se mantiene con excelentes niveles de actividad, superiores al 90% y semejantes a los de fosfomicina y nitrofurantoina.

En conclusión, la presencia de cepas productoras de BLEE va siendo un fenómeno de frecuencia creciente en enterobacterias tanto nosocomiales como comunitarias. Algunos de los antimicrobianos de uso habitual en ITU, como ciprofloxacino y cotrimoxazol, muestran unas cifras de resistencia en este tipo de cepas muy altas, sensiblemente superiores a las que se describen en cepas no seleccionadas. Sin embargo, tanto fosfomicina como nitrofurantoina muestran unos niveles de sensibilidad en estas cepas semejantes a los que se describen de forma general, no registrándose el acúmulo de resistencia que se observa en las anteriores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hooton TM. Practice guidelines for urinary tract infections in the era of managed care. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11:241-5.
2. Rodríguez Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in non-hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089-94.
3. Valverde Romero ED, Parras Padilla T, Herrero Hernández A, Pérez Grande R, Fernández Vázquez M, García García MI, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:433-7.
4. García García MI, Muñoz Bellido JL, García Rodríguez JA. *In vitro* susceptibility of community-acquired urinary tract infection pathogens to commonly used antimicrobial agents in Spain. A comparative multicenter study (2002-2004). *J Chemother* 2007;19:263-70.
5. Alós JI, Serrano MG, Gómez Garcés JL, Perianes J. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:199-203.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. Wayne, PA: NCCLS, 2005.
7. Fernández Vázquez M, Muñoz Bellido JL, García García MI, García-Rodríguez JA. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis producing a TEM-52 β -lactamase: first report in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:245-6.

8. Valverde Romero E, Parras Padilla T, García García MI, Delgado Ronda N, Herrero A, et al. *Salmonella enterica* serovar Infantis producing a CTX-M-9 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2142-3.
9. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A; Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2122-5.
10. Cueto M, Hernández JR, López Cerero L, Morillo C, Pascual A. Actividad de fosfomicina sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:613-6.
11. 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.