

Hugo E. Villar
Mónica B Jugo
Matías Visser
Mariana Hidalgo
Gabriel Hidalgo
Gustavo Cesar Maccallini

Rápida adquisición de resistencia *in vitro* al ertapenem en *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido

Departamento de Bacteriología Clínica, Laboratorio Hidalgo, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Introducción. Las infecciones por *Escherichia coli* productoras de BLEE son cada vez más frecuentes en la comunidad. Ertapenem (ERT) presenta muy buena actividad frente a estas cepas y es una excelente indicación en infecciones severas en etapa de manejo ambulatorio. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de selección de mutantes resistentes a carbapenemas en una colección de aislamientos clínicos de *E. coli* productoras de BLEE.

Material y métodos. Se buscaron mutantes resistentes en uno y dos pasos a ERT, imipenem (IMI) y meropenem (MER) por inoculación de 10^9 ufc/ml en placas de agar Mueller Hinton conteniendo las carbapenemas a diferentes concentraciones. La concentración inhibitoria mínima (CMI) en las cepas originales y mutantes se determinó con el método epsilométrico Etest.

Resultados. No se pudieron seleccionar mutantes resistentes con IMI y MER. Al utilizar ERT se obtuvieron mutantes resistentes en 13 de 57 aislamientos clínicos (22,8 %). Todos los mutantes resistentes fueron resistentes a ERT con CMI ≥ 1 mg/L pero mantuvieron sensibilidad a IMI y MER. Se obtuvieron 6 MR segundo paso con ERT las cuales presentaron resistencia de alto nivel a ERT (CMI ≥ 8 mg/L). Se observó resistencia cruzada a MER en 3 de ellas y en 1 a IMI. Los cuatro mutantes resistentes de segundo paso obtenidos con MER fueron resistentes a ERT y MER y en 2 de ellas se observó resistencia cruzada a IMI.

Conclusiones. La selección de mutantes resistentes a ERT es frecuente en cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Para obtener mutantes resistentes a MER e IMI es necesario un segundo paso de selección. El uso de ERT en infecciones con inóculo alto, focos no drenados y con cepas productoras de BLEE debería ser vigilado para reducir el riesgo de selección de resistencia.

Palabras clave: Ertapenem; BLEE; carbapenema; resistencia; *E. coli*.

Correspondencia:
Hugo Edgardo Villar
Departamento de Bacteriología Clínica, Laboratorio Hidalgo,
Ladislao Martínez 43 B1640EYA Martínez, Buenos Aires, Argentina
011 4898-5300
E-mail: hugo.villar@laboratorihidalgo.com

In vitro emergence of ertapenem resistance in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase

ABSTRACT

Introduction. The occurrence of community-associated infections due to extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* is increasing worldwide. These organisms are frequently resistant to many of the antimicrobial agents but remain susceptible to carbapenems. We investigated the in vitro emergence of carbapenem resistance in a collection of clinical isolates of ESBL-producing *E. coli*

Material and methods. First and second-step resistant mutants were obtained from *E. coli* with ESBL. Aliquots of 50 μ l containing $> 10^9$ CFU were applied to Mueller-Hinton plates containing meropenem, imipenem or ertapenem. MICs for native strains and mutants were determined using the epsilometric test (E-test).

Results. Resistant mutants were not selected with imipenem or meropenem. *E. coli* growth was observed on ertapenem (0.5 mg/L)-containing plates in 13 of 57 clinical isolates (22.8 %). The ertapenem MIC for these first-step mutants were ≥ 1 mg/L, remaining susceptible to imipenem and meropenem. The first-step mutants were used as native strains. Six second-step resistant mutants were selected with ertapenem. All were fully resistant (CMI ≥ 8 mg/L) to ertapenem, three were resistant to meropenem and one to imipenem. Four second-step resistant mutants were selected with meropenem. All were resistant to ertapenem, meropenem, and two of them were resistant to imipenem.

Conclusions. Stable resistant mutants were easy to select with ertapenem among ESBL-producing *E. coli*. Two steps were necessary to select resistant mutants to meropenem or imipenem. The use of ertapenem in high-inoculum infections or in undrained focus of infection should be monitored to reduce the risk on selection of resistance

Key words: Ertapenem, ESBL, carbapenem, resistance, *E. coli*

INTRODUCCIÓN

La prevalencia y variedad de las betalactamasas se ha incrementado de manera exponencial en las últimas décadas¹. Los aislamientos de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) siempre fueron considerados como organismos multirresistentes intrahospitalarios. Sin embargo, en los últimos años se ha venido observando un incremento de infecciones en la comunidad ocasionadas por *Escherichia coli* productoras de BLEE². Muchas de estas cepas provienen de infecciones del tracto urinario (ITU) y las opciones terapéuticas son escasas dado que frecuentemente presentan resistencia a otras familias de antibióticos³. Publicaciones recientes proponen para las ITU no complicadas el uso de viejos antibióticos como fosfomicina y nitrofurantoina, mientras que, para ITU complicadas se sugiere el uso de ertapenem (ERT)⁴⁻⁸. Algunos autores han demostrado en aislamientos clínicos de *E. coli* que la presencia de betalactamasas sumado a fenómenos de impermeabilidad o pérdida de porinas produce resistencia a carbapenemas⁹⁻¹⁴. En nuestro país *E. coli* productora de BLEE empieza a comportarse como un microorganismo endémico en la comunidad. Recientemente observamos una tasa de portación fecal de *E. coli* productora de BLEE del 17,3 % en pacientes de la comunidad mientras que 57 de 374 (15,2 %) aislamientos de *E. coli* de orinas de hombres mayores de 50 años ambulatorios no institucionalizados eran productoras de BLEE^{15,16}. Considerando que las carbapenemas son una de las opciones terapéuticas decidimos llevar a cabo un estudio con el objeto de determinar en esos aislamientos clínicos la capacidad de selección de mutantes resistentes de ERT, imipenem (IMI) y meropenem (MER).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó con 57 cepas únicas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas consecutivamente de cultivos de orina de hombres mayores de 50 años ambulatorios no institucionalizados. Se eligió este grupo ya que las ITU habitualmente se consideran como complicadas empleándose cada vez con mayor frecuencia las carbapenemas. La utilización de aislados de pacientes de la comunidad disminuye la probabilidad de incluir cepas epidémicas. Todos los aislamientos se recuperaron en Laboratorio Hidalgo, Buenos Aires, Argentina y fueron conservados a -20 °C en caldo tripteína soya con glicerol 15 % (Remel, Lenexa Kansas USA). En el momento de realizar el estudio se subcultivaron en medio cromogénico CHROMagar Orientation (CHROMagar Paris, Francia). Las colonias que no presentaron color compatible luego de 48 h de incubación fueron descartadas. Se reconfirmó la identificación por métodos convencionales en todos los aislamientos.

La detección fenotípica de las BLEE se realizó según la norma del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) del año 2013. Se consideró la prueba positiva cuando el halo del disco de ceftazidima más ácido clavulánico y/o cefotaxima más ácido clavulánico fue ≥ 5 mm respecto del halo de ceftazidima y/o cefotaxima, respectivamente¹⁷. Para detectar la presencia

de carbapenemasas se realizó el método de Hodge modificado de acuerdo a la misma norma del CLSI¹⁷. Se determinó sensibilidad a cefoxitina por el método de difusión por discos para descartar la presencia de cefalosporinas.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las carbapenemas en los aislamientos clínicos y mutantes resistentes se realizó con tiras E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La selección de mutantes resistentes de primer paso se realizó inoculando 50 μ l de un caldo de cultivo de toda la noche de cada cepa en placas de agar Mueller Hinton conteniendo 0,5 mg/L de ERT, IMI y MER. Para la selección de mutantes resistentes de segundo paso se emplearon concentraciones de 4x CMI. La tasa de mutación se obtuvo de la división entre la cantidad de mutantes y el recuento bacteriano del inóculo. Se eligió 0,5 mg/L de cada carbapenema en la primera etapa de obtención de mutantes ya que esta concentración es la menor a partir de la cual se considera no susceptible a una de las carbapenemas (ERT). A los fines de este estudio se tabularon los mutantes resistentes que fueron estables luego de tres subcultivos en medio libre de antibióticos. Cuando se obtuvo más de un mutante resistente se conservó la representativa de cada fenotipo resistente.

RESULTADOS

Los 57 aislamientos clínicos presentaron fenotipo positivo para la producción de BLEE fueron negativos para la producción de carbapenemasas y sensibles a cefoxitina. Todos los aislamientos fueron sensibles a ERT, IMI y MER según los puntos de corte del CLSI. No se recuperaron mutantes resistentes al utilizar IMI y MER como agentes selectivos mientras que con ERT se obtuvieron mutantes resistentes con una frecuencia de $1,1 \times 10^{-9}$ a $2,0 \times 10^{-8}$ en 13 de 57 aislamientos clínicos (22,8%). Las características de los mutantes resistentes se observan en la tabla 1. La CMI de los mutantes resistentes seleccionados con ERT se incrementaron respecto de la cepa original en 5,3 a 62,5 veces a ERT, 2,7 a 16,5 veces a MER y solo hasta 2 veces para IMI. Todos los mutantes resistentes fueron resistentes a ERT con CMI ≥ 1 mg/L pero se mantuvieron sensibles a IMI y MER.

Los 13 mutantes resistentes de primer paso fueron expuestos a 4 x CMI de ERT, IMI y MER. Con ERT se obtuvieron mutantes resistentes de segundo paso con una frecuencia de $8,0 \times 10^{-9}$ a $4,2 \times 10^{-8}$ a partir de 6 de los 13 mutantes resistentes de primer paso (46,1%) las cuales presentaron resistencia de alto nivel a ERT (CMI ≥ 8 mg/L). En 3 y 5 de estos 6 mutantes resistentes de segundo paso se mantuvo la sensibilidad a MER e IMI, respectivamente (CMI ≤ 1 mg/L).

Con MER como agente selectivo se obtuvieron mutantes resistentes de segundo paso con una frecuencia de $5,0 \times 10^{-8}$ a $2,4 \times 10^{-8}$ a partir de 4 de los 13 mutantes resistentes de primer paso (30,8 %). En todas se observó pérdida de sensibilidad a ERT y MER mientras que 2 conservaron sensibilidad a IMI (CMI ≤ 1 mg/L). No fue posible obtener mutantes resistentes de se-

Tabla 1 Sensibilidad a carbapenemas de las cepas originales y sus mutantes resistentes de primer y segundo paso seleccionadas con ertapenem

Cepa	CMI (mg/L) Ertapenem			CMI (mg/L) Meropenem			CMI (mg/L) Imipenem		
	Original	MRE1	MRE2	Original	MRE1	MRE2	Original	MRE1	MRE2
LH1	0,125	2	8	0,023	0,38	2	0,19	0,25	0,38
LH2	0,125	1,5	32	0,047	0,125	2	0,38	0,38	4
LH3	0,094	2	8	0,047	0,125	0,5	0,19	0,25	0,38
LH4	0,125	1	≥32	0,094	0,25	4	0,19	0,25	1
LH5	0,19	1	8	0,047	0,25	0,5	0,25	0,25	0,38
LH6	0,094	3	8	0,047	0,25	1	0,19	0,25	0,38
LH7	0,125	1,5	NO	0,094	0,25	NO	0,25	0,25	NO
LH8	0,19	4	NO	0,094	0,25	NO	0,25	0,25	NO
LH9	0,125	4	NO	0,094	0,5	NO	0,125	0,19	NO
LH10	0,19	2	NO	0,032	0,125	NO	0,19	0,38	NO
LH11	0,047	1	NO	0,023	0,094	NO	0,125	0,19	NO
LH12	0,032	1,5	NO	0,016	0,25	NO	0,125	0,19	NO
LH13	0,064	4	NO	0,032	0,5	NO	0,125	0,25	NO

MRE1: Mutante resistente de primer paso seleccionada con ertapenem; MRE2: Mutante resistente de segundo paso seleccionada con ertapenem; NO: No observado

Tabla 2 Sensibilidad a carbapenemas de las cepas originales, sus mutantes resistentes de primer paso seleccionadas con ertapenem y las mutantes resistentes de segundo paso seleccionadas con meropenem

Aislamiento/mutante		CMI (mg/L)		
		Ertapenem	Meropenem	Imipenem
LH2	Original	0,125	0,047	0,38
MRE1		1,5	0,125	0,38
MRM2 _{MRE1}		8	2	2
LH3	Original	0,094	0,047	0,19
MRE1		2	0,125	0,25
MRM2 _{MRE1}		16	2	0,5
LH4	Original	0,125	0,094	0,19
MRE1		1	0,25	0,38
MRM2 _{MRE1}		≥32	≥32	8
LH6	Original	0,094	0,047	0,19
MRE1		3	0,25	0,25
MRM2 _{MRE1}		8	2	0,5

MRE1: Mutante resistente de primer paso seleccionada con ertapenem; MRM2_{MRE1}: Mutante resistente de segundo paso seleccionada con meropenem a partir de una mutante resistente de primer paso seleccionada con ertapenem.

gundo paso al utilizar IMI sobre los 13 mutantes resistentes de primer paso.

DISCUSIÓN

Este estudio demostró que empleando concentraciones equivalentes al punto de corte de ERT se selecciona mutantes resistentes en un paso sobre el 22,8 % de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Las CMI a MER se incrementaron hasta 16,5 veces pero permanecieron dentro del intervalo de sensibilidad mientras que el efecto sobre IMI fue mínimo. El aumento en la CMI a ERT y MER sugiere que ambos comparten algunas de las vías de ingreso en la bacteria a diferencia de IMI que solo

tuvo incrementos de hasta 2 veces en la CMI. No encontramos publicaciones similares que muestren la prevalencia de selección de mutantes resistentes sobre un número importante de cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Credito et al. estudiaron la concentración preventiva de mutantes (CPM) en 25 cepas de *E. coli* (10 betalactamasas negativas y 15 betalactamasas positivas). Observan que la CPM/CMI es ≥ 16 mg/L en 9 de 25 cepas para ERT, 2 de 25 a MER y en ninguna para IMI¹⁸. Nuestros resultados son coincidentes para ERT donde se obtienen mutantes resistentes en un paso y para IMI donde no fue posible seleccionarlos. La elevada prevalencia en la selección de mutantes resistentes a ERT encontrada en este trabajo podría deberse a que todos los aislamientos fueron fenotipo positivo para producción de BLEE. En ese sentido Adler et al. demuestra que la presencia de una BLEE en combinación con pérdida de porinas aumenta la frecuencia de subpoblaciones resistentes a carbapenemas y de manera especial a ERT¹⁹. Tangden et al. usando un modelo farmacocinético *in vitro* encuentran que es frecuente la emergencia de subpoblaciones deficientes en porinas cuando se enfrentan cepas de *E. coli* productoras de BLEE con ERT. Esas mutantes presentaron CMI a ERT de 0,75 mg/L a 1,5 mg/L y permanecieron sensibles a IMI y MER de manera similar a los mutantes resistentes de primer paso obtenidas en este trabajo²⁰. La utilización en este estudio de 0,5 mg/L de cada carbapenem en lugar de 4 x CMI para la selección en un paso de mutantes resistentes podría infravalorar la generación de mutantes resistentes en las cepas más sensibles. Esto podría ocurrir para el caso de MER donde la CMI en nuestras cepas originales fue inferior respecto de ERT e IMI. De todas maneras utilizar una concentración en el

punto de corte permite detectar mutantes resistentes en un paso con resistencia de alto nivel las cuales eventualmente tendrían mayores posibilidades de producir fallos en el tratamiento. La selección de mutantes resistentes a ERT no estuvo relacionada a diferencias de CMI en las cepas originales respecto de las que no lo hicieron. Se obtuvieron de cepas con CMI de 0,19 mg/L (LH5, LH8 y LH10) así como de otras con CMI de 0,032 a 0,064 mg/L (LH12 y LH13).

ERT y MER fueron efectivos en seleccionar mutantes resistentes de segundo paso al enfrentarlas con los mutantes resistentes de primer paso obtenidas con ERT. Todos los mutantes resistentes de segundo paso seleccionadas con ERT o MER presentaron resistencia de alto nivel a ERT (CMI \geq 8 mg/L) y recién en esta segunda etapa se observa resistencia MER y en algunas cepas a IMI. Adler et al. no reportan sensibilidad a IMI sin embargo los mutantes de segundo paso con alteraciones en los genes *ompR* y *ompZ* presentaron el mismo fenotipo de resistencia cruzada a MER¹⁹.

Este trabajo presenta algunas limitaciones ya que no fue posible la caracterización molecular de las betalactamasas ni el estudio del perfil de proteínas de membrana externa. De todas maneras en ausencia de carbapenemasas, se observa que ERT podría ser la llave del proceso de incremento de resistencia a las carbapenemas en cepas productoras de BLEE. ERT es la carbapenema menos estable frente a las betalactamasas^{21,22}. Diferentes BLEE incluyendo una de las más diseminadas en todo el mundo como la CTX-M-15 presentan una mínima actividad hidrolítica sobre las carbapenemas. Esta situación sumada a la pérdida o disminución de la expresión de porinas es responsable de resistencia a las carbapenemas en *Klebsiella pneumoniae* y *E.coli*²³. En los aislamientos clínicos de *E. coli* caracterizados hasta el momento, la resistencia a las carbapenemas no asociada a carbapenemasas ha sido vinculada a la presencia de betalactamasas y disminución de expresión de porinas y en todos los casos se registró uso de carbapenemas⁹⁻¹⁴. Algunos de estos aislamientos clínicos ocurrieron durante el uso prolongado de IMI y difiere de lo obtenido *in vitro* en este trabajo. Esto podría deberse a que el incremento en la CMI ocurriría de manera gradual y muchas veces relacionado a otras betalactamasas como las de tipo CMY¹¹⁻¹⁴. En oposición la resistencia a ERT puede seleccionarse en un paso con concentraciones de hasta 62,5 veces la CMI. En conclusión, consideramos que la selección de mutantes resistentes a ERT es frecuente en aislamientos de *E. coli* productoras de BLEE. La utilización de ERT en infecciones con inóculo alto y focos no drenados frente a este tipo de cepas debería ser vigilada.

BIBLIOGRAFÍA

- Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamasas. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013;1277:84-90.
- Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones. *Microbial Drug Resistance* 2011;17:83-97.
- Morosini MI, García-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E et al. Antibiotic coresistance in extended spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae and *in vitro* activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2695-9.
- Auer S, Wojna A, Hell M. Oral treatment options for ambulatory patients with urinary tract infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4006-8.
- de Cueto M, Hernandez JR, Lopez-Cerero L, Morillo C, Pascual A. Activity of fosfomycin against extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:613-6.
- Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44:364-8.
- Tamayo J, Orden B, Cacho J, Cuadros J, Gomez-Garces JL, Alos JI. Activity of ertapenem and other antimicrobials against ESBL-producing enterobacteria isolated from urine in patients from Madrid. *Rev Esp Quimioter* 2007; 20:334-8.
- Bazaz R, Chapman AL, Winstanley TG. Ertapenem administered as outpatient parenteral antibiotic therapy for urinary tract infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative organisms. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1510-3.
- Lartigue M-F, Poirel L, Poyart C, Réglie-Poupet H, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2007;13, No 2.
- Guillon H, Tande D, Mammeri H. Emergence of Ertapenem Resistance in an *Escherichia coli* Clinical Isolate Producing Extended-Spectrum β -lactamasas AmpC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 4443-6
- Liu YF, Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu JJ. Characterization of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:1020-3.
- Poirel L, Héritier C, Spicq C, Nordmann P. *In vivo* acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3831-3.
- Pavez M, Neves P, Dropa M, Matté MH, Grinbaum RS, Elmor de Araújo MR, et al. Emergence of carbapenem-resistant v producing CMY-2-type AmpC β -lactamasas in Brazil. *J Med Microbiol* December 2008; 57:1590-2.
- Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:534-7.
- Villar HE, Baserni MN, Jugo MB. Faecal carriage of extended spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli within community settings. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7:630-4.

- 16 Villar HE, Jugo M, Macan A, Visser M, Hidalgo M, Maccallini GS . Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male outpatients. J Infect Dev Ctries 2013;in press.
- 17 Clinical and Laboratory Standards Institute (2013) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing .Nineteenth informational supplement, M100-S 23. CLSI,Wayne (PA).
- 18 Credito K, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC. Mutant prevention concentrations of four carbapenems against gram-negative rods. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:2692-5.
- 19 Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2013; 68; 51-9.
- 20 Tängdén T, Adler M, Cars O, Sandegren L, Löwdin E. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. J Antimicrob Chemother 2013;68:1319-26.
- 21 Livermore DM, Seaton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. J Antimicrob Chemother 2003; 52:331-44.
- 22 Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various beta-lactamase resistance mechanisms. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 52:71-4.
- 23 Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion Front Microbiol 2012; 3:110.