

Concentración preventiva de mutantes: ¿un nuevo parámetro de actividad antimicrobiana con valor clínico?

Rafael Cantón

Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos ha aumentando considerablemente en los últimos años. Son muchos los autores y las agencias públicas y privadas las que han alertado de este problema y se han realizado documentos de consenso para establecer estrategias que reduzcan o minimicen sus efectos¹⁻³. Esta situación se ha producido debido a la plasticidad con que los microorganismos desarrollan mecanismos que evitan el efecto inhibitorio o letal de los antimicrobianos. Esencialmente, las bacterias pueden adquirir resistencia a los antimicrobianos por dos procesos: mutación y adquisición de genes externos⁴. Ambos son importantes y su trascendencia depende del tipo de gen y microorganismo implicados, los antimicrobianos afectados y el proceso clínico que producen las bacterias que han adquirido el carácter resistente.

La resistencia por mutación puede afectar a genes diana o reguladores de procesos cuya alteración compromete la actuación de los antimicrobianos. En el primer caso podríamos señalar las mutaciones en las regiones QRDR (*quinolone resistance determining region*) correspondientes a los genes que codifican la girasa o la topoisomerasa IV que reducen la actividad de las fluoroquinolonas o las mutaciones en genes ribosomales que modifican la afinidad de los macrólidos por el ribosoma. Ejemplo de mutaciones en los genes reguladores son la hiperproducción de la betalactamasa AmpC en *Pseudomonas aeruginosa* que afecta la actividad de la ceftazidima y la cefepima o la hiperexpresión de los sistemas de expulsión en este mismo microorganismo que compromete, entre otros, la actividad del meropenem, los aminoglucósidos, las tetraciclinas y las fluoroquinolonas.

La exposición de una población bacteriana a la acción de un antimicrobiano suele producir un efecto deletéreo sobre ella, bien inhibiendo su crecimiento o produciendo su muerte. Este efecto no siempre se hace patente, bien por la presencia de un mecanismo de resistencia previo en ella o por la emergencia de mutantes resistentes⁴. En una primera aproximación podríamos pensar que los antimicrobianos tienen un efecto mutagénico y que inducen la aparición de mutaciones. Sin embargo, es bien conocido que los mutantes resistentes se encuentran de manera natural en las poblaciones bacterianas y que este hecho es independiente de la presencia del antimicrobiano en el medio. Toda población bacteriana tiene, con una frecuen-

cia variable, mutantes resistentes que coexisten con la población sensible mayoritaria⁵. Bajo determinadas circunstancias, cuando se somete una población bacteriana a la acción de un antimicrobiano, los mutantes resistentes pueden hacerse dominantes al inhibirse la fracción sensible mayoritaria pero no la de los mutantes resistentes. Este proceso se conoce con el nombre de selección de mutantes resistentes.

Baquero et al⁶⁻⁸ durante la década de 1990, en ensayos de competición entre cepas isogénicas de *Escherichia coli* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de selección con ceftazidima y cefepima en poblaciones de *Enterobacter cloacae* productores de AmpC observaron que sólo era posible recuperar mutantes resistentes en un rango de concentraciones específicas que iban desde la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la población bacteriana sensible dominante hasta la CIM de la subpoblación más resistente. Bajo este prisma establecieron el concepto de las concentraciones selectivas y el de los compartimentos de selección^{6,9,10}. Este concepto fue también aplicado a los macrólidos y levantó polémicas sobre las conclusiones obtenidas y la extrapolación al aumento de resistencia observada en *Streptococcus pneumoniae* cuando se correlacionaba con el consumo de macrólidos con una semivida prolongada¹¹. Casi simultáneamente Drlica et al¹²⁻¹⁴ observaron que la selección de mutantes resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus* a las fluoroquinolonas se producía exclusivamente en un rango específico de concentraciones. La concentración inferior estaba cercana al valor de la CIM mientras que la superior se situaba en el límite para el cual dejaban de aparecer mutantes resistentes en placas de selección. A este rango lo denominaron ventana de selección (*mutant selection window*) y a la concentración que impide el crecimiento de mutantes, concentración que previene la aparición de mutantes resistentes o CPM (*mutant prevention concentration*, MPC). El valor de la CPM quedó también definido como la CIM de los mutantes resistentes de primer escalón en una población bacteriana sensible. En trabajos posteriores se analizaron los valores de CPM de diferentes quinolonas en *S. pneumoniae*¹⁵, *E. coli*¹⁶ y *P. aeruginosa*^{17,18} y se utilizaron los valores obtenidos para predecir las opciones terapéuticas que ofrecían mayores ventajas al evitar la aparición de mutantes resistentes y la dosificación más adecuada que debería utilizarse con este propósito^{19,20}. Surge un nuevo concepto microbiológico con aplicación clínica ligado nuevamente, como en el caso de la CIM, a la concentración del antimicrobiano.

Sirvent et al²¹ han abordado la determinación de los valores de CPM de diferentes fluoroquinolonas en una colección de aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de

Correspondencia: Dr. R. Cantón.
Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. Colmenar, km 9,100. 28034 Madrid. España.
Correo electrónico: rcanton.hrc@salud.madrid.org

pacientes con infecciones nosocomiales, alguno de ellos con exposición previa a estos compuestos. Aunque todos los aislados se consideraban sensibles a las fluoroquinolonas por los valores de CIM obtenidos y los criterios de sensibilidad aplicados, estos eran superiores a los que se encontraron en las cepas de los pacientes sin exposición previa, indicando que parte de la población analizada podría tener un mecanismo de resistencia de bajo nivel de expresión. Con independencia de este hecho, los valores de CPM₅₀ y CPM₉₀ de ciprofloxacino (0,4 y 1,8 µg/ml) fueron más bajos que los de levofloxacino (1,4 y 2,7 µg/ml) y estos que los de gatifloxacino (2 y 2,8 µg/ml), ofloxacino (2,6 y 7,0 µg/ml) y moxifloxacino (3,4 y 8,5 µg/ml). En el análisis detallado de los datos, los autores diferencian los valores de CPM según la procedencia de la cepa y la exposición previa de los pacientes a las fluoroquinolonas, establecen el cociente CIM:CPM y la relación de los valores de CPM con algunos parámetros farmacocinéticos (C_{máx} en suero, concentración en macrófagos y epitelio pulmonar y AUC) obtenidos con dosis habituales de estos compuestos. Tras este análisis establecen conclusiones sobre el tratamiento con fluoroquinolonas en las infecciones por *P. aeruginosa*.

Metodológicamente, estos autores²¹ utilizan un inóculo bacteriano elevado (10¹⁰ UFC), tal y como se recomienda para la determinación del valor de CPM¹⁴. El objetivo es asegurar mutantes resistentes en la población bacteriana estudiada aunque su frecuencia de aparición sea baja. En la determinación de los valores de CPM emplean un replicador de Steers y placas de agar con fluoroquinolonas con un amplio número de concentraciones al interpolar concentraciones entre las dobles diluciones habituales. Estos dos hechos, permiten a los autores optimizar el número de cepas estudiadas con el material utilizado y realizar un cálculo más exacto del valor de la CPM.

Una comparación de los datos obtenidos por Sirvent et al²¹ con los referidos por otros autores en *P. aeruginosa*^{17,18} indica que los valores de CPM son algo inferiores. Esta circunstancia podría ser explicada de diferente manera: a) que la colección de cepas ensayadas responda de manera diferente a las fluoroquinolonas que las ensayadas por otros autores; b) que aun siendo el inóculo preparado por los autores elevado, el depósito con el replicador de Steers sobre las placas de agar con antimicrobianos (aproximadamente 4 µl) no asegure un número de células similar al estudiado por otros autores, y c) de la reflexión anterior también puede deducirse que en una población normal (sensible) de *P. aeruginosa* es posible encontrar de manera natural diferentes subpoblaciones resistentes que se inhiben por concentraciones distintas; los mutantes resistentes de bajo nivel serían mayoritarios en la subpoblación resistente (frecuencia de mutación elevada a concentraciones bajas) y sólo unas pocas células (frecuencia de mutación baja a concentraciones elevadas) tendrían un mecanismo de resistencia de alto nivel. Sirvent et al²¹ estarían ofreciendo en su trabajo valores de CPM de la subpoblación con bajo nivel de resistencia pero no de los mutantes con mayor nivel de resistencia para lo cual es imprescindible que el inóculo sea realmente elevado. Esta hipótesis sólo podría demostrarse ensayando diferentes inóculos y analizando el mecanismo de resistencia de las subpoblaciones que sobreviven en las concentraciones previas a la del valor de la CPM. Hasta la fecha, los trabajos realizados con *P. aeruginosa* en la determinación

de la CPM no han contemplado esta posibilidad. Sin embargo es conocido que este microorganismo presenta, con elevada frecuencia (< 10⁻⁷), variantes resistentes (o menos sensibles) con aumento de la expresión de las bombas de expulsión, que estos se producen por la afectación de diferentes operones y genes reguladores y que los valores de CIM de las fluoroquinolonas afectadas no son muy elevados. Por el contrario las mutaciones en la *gyrA* y la topoisomerasa IV aparecen con menor frecuencia (10⁻⁷-10⁻⁹) y que los valores de CIM de las fluoroquinolonas en las cepas que presentan estas mutaciones son más elevadas que las anteriores^{22,23}.

El análisis anterior incide en dos conceptos esenciales en la determinación de la CPM y en su aplicación clínica: a) el inóculo bacteriano y b) la propia definición de la CPM como concentración preventiva de primeros mutantes. Desde el punto de vista clínico, la utilización de un inóculo elevado de 10¹⁰ UFC podría cuestionarse por el hecho de que son pocos los procesos en los que este se alcanza realmente. Con ello la extrapolación de los valores de CPM no serían reales en un escenario habitual de tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, la presencia de mutantes ya seleccionados en una población bacteriana (es posible la selección *in vivo*) y la existencia de procesos crónicos que afectan a territorios compartimentalizados en los que el inóculo bacteriano y las concentraciones de antimicrobiano pueden ser diferentes en los distintos compartimentos justifica la elección de un inóculo elevado. Este sería el caso de las infecciones respiratorias con colonización crónica como el caso de los bronquíticos crónicos, los pacientes con fibrosis quística, osteomielitis, infecciones en el pie diabético e incluso algunos procesos agudos con rápida progresión del número de microorganismos como la neumonía asociada a ventilación mecánica^{24,25}. Con respecto al segundo punto, se admite la determinación de CPM a partir de aislados con primeras mutaciones y por tanto definir la CPM como aquella que evite la aparición de mutantes con dobles mecanismos. Este aspecto tiene especial relevancia en el desarrollo de compuestos antimicrobianos que evadan mecanismos de resistencia ya presentes pero que también eviten el desarrollo de nuevos mutantes²⁶.

Tal y como realizan Sirvent et al²¹ en su trabajo, para dar valor clínico al concepto de la CPM es imprescindible su comparación con la farmacocinética de los compuestos estudiados. Las fluoroquinolonas presenta unos parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos (FC/FD) que se ajusta a un modelo de actividad que depende de la concentración del fármaco en el lugar de la infección (concentración máxima y área bajo la curva por encima de la CIM, C_{máx}:CIM y AUC:CIM, respectivamente), sobre todo en el caso de las infecciones respiratorias²⁷. Los autores, comparando el valor de la CPM con la C_{máx} y el AUC, concluyen que ciprofloxacino es superior a levofloxacino y éste a su vez que moxifloxacino en la capacidad de restringir o evitar la aparición de mutantes resistentes. Sin embargo, los parámetros FC de comparación utilizados por ellos no contemplan una dosificación de levofloxacino más adecuada a las infecciones respiratorias por *P. aeruginosa* (500 mg/12 h o 750 mg/24 h) y recogida en diversos documentos y guías de tratamiento²⁸⁻³⁰. Con esta dosificación, el riesgo de selección de mutantes resistentes con levofloxacino, al menos en el compartimento respiratorio,

no sería inferior al de ciprofloxacino ya que escaparía a la ventana de selección^{17,31}.

Una conclusión interesante del trabajo de Sirvent et al²¹ deriva de la separación de las cepas de *P. aeruginosa* según hubiesen sido expuestas o no a las fluoroquinolonas los pacientes en las que se aislaron. Las cepas de los pacientes tratados previamente para los que se obtienen valores de CIM de las fluoroquinolonas algo más elevadas, tendrían presumiblemente un mecanismo de resistencia (primera mutación) y la CPM obtenida, más elevada que en la población totalmente sensible obtenida de pacientes sin tratamiento, debe corresponderse con valores que evitan la aparición de subpoblaciones con más de una mutación. En estos casos la probabilidad de selección de estos mutantes con tratamientos inadecuados no ajustados a parámetros FC/FD tendría mayor riesgo al acortarse las distancias entre la $C_{m\acute{a}x}$ o el AUC y el valor de la CPM. La posibilidad de entrar en ventana de selección durante el tratamiento sería más elevada, sobre todo con dosificaciones inadecuadas³⁰. También es de resaltar que de los datos de Sirvent et al²¹ el valor de la CPM₉₀ de ciprofloxacino (0,5 µg/ml) es inferior a la de levofloxacino (1,5 µg/ml) cuando se consideran las cepas de pacientes no tratados, invirtiéndose esta relación cuando se trata de cepas de pacientes ya tratados (7,0 y 3,6 µg/ml) con lo que podría deducirse que levofloxacino restringirá mejor que ciprofloxacino la aparición de mutantes con alto nivel de resistencia. Es razonable pensar que estas conclusiones deben avalarse con estudio clínicos diseñados específicamente para demostrar estas afirmaciones o al menos modelos *in vitro* con cultivos dinámicos que remeden la farmacocinética de las fluoroquinolonas.

La determinación de la CPM en el laboratorio de microbiología no debe realizarse de manera rutinaria en los aislados clínicos ya que los valores de CPM para los mutantes resistentes seleccionados deberían oscilar en un rango fijo, que cubriría a los mutantes resistentes de primer escalón si se parte de una población totalmente sensible o a los mutantes con más de un mecanismo de resistencia si se parte de una población con mutaciones previas. En el caso de que la población resistente hubiese sido ya seleccionada, el valor de la CIM de esta población debe ser aproximado, sino igual, al de la CPM. El estudio de CPM debe realizarse con el objetivo de predecir la posibilidad de desarrollo de resistencia y adecuar los tratamientos antimicrobianos con este fin.

Respondiendo a la pregunta realizada en el título de este editorial, aunque la CPM no es estrictamente un parámetro de actividad de los antimicrobianos, que estaría mejor marcada por el valor de la CIM y su posterior interpretación, sin embargo podría utilizarse como tal. Su aplicación a la capacidad de restringir o disminuir la selección de mutantes resistentes cuando se utilizan los antimicrobianos con criterios FC/FD y por tanto a la posibilidad de evitar el fracaso clínico asociado, llevaría a asumir que la CPM es un parámetro de actividad. Así mismo, el concepto tiene una clara aplicación clínica y ayuda a definir cuál es la dosis más adecuada de un antimicrobiano, al menos desde el punto de vista de la selección de mutantes, y marca diferencias entre los antimicrobianos que deben utilizarse en la elaboración de las guías de tratamiento y definición de las políticas de antimicrobianos.

Bibliografía

1. Cornaglia G, Lonnroth A, Struelens M. Report from the European Conference on the Role of Research in Combating Antibiotic Resistance, 2003. Clin Microbiol Infect. 2004;10:473-97.
2. MacKenzie FM, Struelens MJ, Towner KJ, Gould IM; ARPAC Steering Group; ARPAC Consensus Conference Participants. Report of the Consensus Conference on Antibiotic Resistance; Prevention and Control (ARPAC). Clin Microbiol Infect. 2005;11:938-54.
3. Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. Emerg Infect Dis. 2005;11:794-801.
4. Cantón Moreno R, Coque González TM, Baquero Mochales F. Evolución y perspectivas futuras de la resistencia a los antimicrobianos. En: Auxina Ruiz V, Moreno Guillén S, editores. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 177-88.
5. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. Emerg Infect Dis. 2002;8:347-54.
6. Baquero F, Negri MC. Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. Bioessays. 1997;19:731-6.
7. Blázquez J, Morosini MI, Negri MC, González-Leiza M, Baquero F. Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:145-9.
8. Negri MC, Baquero F. *In vitro* selective concentrations of cefepime and ceftazidime for AmpC beta-lactamase hyperproducer *Enterobacter cloacae* variants. Clin Microbiol Infect. 1999;5 Suppl 1:25-8.
9. Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blázquez J. The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations. Ciba Found Symp. 1997;207:93-105.
10. Baquero F, Negri MC. Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. J Chemother. 1997;9 Suppl 3:29-37.
11. Baquero F. Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? J Chemother. 1999;11 Suppl 1:35-43.
12. Drlica K. A strategy for fighting antibiotic resistance. ASM News. 2001;67:27-33.
13. Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1756-8.
14. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2003;52:11-7.
15. Blondeau JM, Zhao X, Hansen G, Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:433-8.
16. Linde HJ, Lehn N. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions. J Antimicrob Chemother. 2004;53:252-7.
17. Cantón R, García-Castillo M, Morosini MI, Baquero MR, Oliver A, Baquero F. Mutant prevention concentration (MPC) of different antibiotics in mutator and non-mutator *Pseudomonas aeruginosa* populations from cystic fibrosis patients. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago. September, 2003. Libro de Resúmenes, resumen A-1320.
18. Hansen GT, Zhao X, Drlica K, Blondeau JM. Mutant prevention concentration for ciprofloxacin and levofloxacin with *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:120-4.
19. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. J Infect Dis. 2002;185:561-5.
20. Epstein BJ, Gums JG, Drlica K. The changing face of antibiotic prescribing: the mutant selection window. Ann Pharmacother. 2004;38:1675-82.
21. Sirvent E, Ruiz M, Rodríguez JC, Royo G. Estudio de la actividad comparada de varias fluoroquinolonas frente a *Pseudomonas aeruginosa* mediante la determinación de la concentración preventiva de mutantes (CPM). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24(10):603-7.
22. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Tocalli L, Gismondo MR. *In vitro* selection of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. by levofloxacin and ciprofloxacin alone and in combination with beta-lactams and amikacin. J Antimicrob Chemother. 2005;56:353-9.
23. Macia MD, Borrell N, Segura M, Gómez C, Pérez JL, Oliver A. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:975-83.
24. Tumkaya M, Atis S, Ozge C, Delialioğlu N, Polat G, Kanik A. Relationship between airway colonization, inflammation and exacerbation frequency in COPD. Respir Med. 2006 (in press).

25. Browne AC, Vearncombe M, Sibbald RG. High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neurotrophic ulcers retards wound healing after application of Dermagraft. *Ostomy Wound Manage.* 2001;47:44-9.
26. Zhao X, Eisner W, Perl-Rosenthal N, Kreiswirth B, Drlica K. Mutant prevention concentration of garenoxacin (BMS-284756) for ciprofloxacin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1023-7.
27. Aguado-García JM, Martín-Herrero JE, Lumbreras-Bermejo C. Resistencias bacterianas y farmacodinámica como bases de la prescripción de antibióticos en infecciones respiratorias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:230-7.
28. Balter MS, La Forge J, Low DE, Mandell L, Grossman RF; Canadian Thoracic Society; Canadian Infectious Disease Society. Canadian guidelines for the management of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Can Respir J.* 2003;10 Suppl B:3-32.
29. Cantón R, Lode H, Graninger W, Milkovich G. Respiratory tract infections: at-risk patients, who are they? Implications for their management with levofloxacin. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28 Suppl 2:115-27.
30. Mensa J, Gatell JM, Azanza JR, Domínguez-Gil, García JE, Jiménez de Anta MT, et al. Guía de terapéutica antimicrobiana. 16ª ed. Barcelona: Masson; 2006.
31. Gotfried MH, Danziger LH, Rodvold KA. Steady-state plasma and intrapulmonary concentrations of levofloxacin and ciprofloxacin in healthy adult subjects. *Chest.* 2001;119:1114-22.

Fe de errores

En el artículo titulado "Evaluación de dos métodos de detección antigénica por ELISA para el diagnóstico de brotes causados por norovirus" (*Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(9):564-7) se ha detectado un error en la tabla 2. En la tercera columna, cuarta fila donde pone "Brote con ≥ 3 muestras estudiadas (n = 14)" debería poner "Brote con ≤ 3 muestras estudiadas (n = 14)".