



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Actividad comparativa del ertapenem frente a *Klebsiella pneumoniae* productor de betalactamasas de espectro extendido o betalactamasas de AmpC plasmídicas: efecto inóculo y papel de la pérdida de porinas

José Ramón Hernández^{a,*}, María del Carmen Conejo^a y Álvaro Pascual^{a,b}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^b Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de septiembre de 2008

Aceptado el 16 de marzo de 2009

On-line el 23 de julio de 2009

Palabras clave:

Ertapenem

Betalactamasa de espectro extendido

Betalactamasa de AmpC plasmídica

Porina

Efecto inóculo

RESUMEN

Introducción: Se ha estudiado el efecto de la pérdida de porinas y el efecto inóculo en la actividad comparativa del ertapenem (ERT) frente a las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o de betalactamasas de AmpC de codificación plasmídica (pACBL).

Métodos: Sistema de microdilución mediante la utilización de 2 inóculos diferentes.

Resultados: El imipenem (IMP), la amikacina, el ERT y la cefepima fueron los antimicrobianos más activos en condiciones estándares. La pérdida de porinas afectó más al ERT que al IMP.

Conclusiones: El ERT muestra una buena actividad frente a las cepas productoras de betalactamasas de tipo BLEE y de tipo pACBL. Las cepas deficientes en porinas analizadas tienen una sensibilidad disminuida a betalactámicos. El efecto inóculo afectó más al IMP que al ERT.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Comparative activity of ertapenem against extended-spectrum beta lactamase-producing or plasmid-mediated AmpC beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Introduction: The effect of porin loss and inoculum size on the comparative activity of ertapenem against either extended-spectrum beta lactamase-producing (ESBL) or plasmid-mediated AmpC beta lactamase-producing (pACBL) *Klebsiella pneumoniae* strains was evaluated.

Methods: Microdilution using 2 different bacterial inocula.

Results: Imipenem, amikacin, ertapenem, and cefepime were the most active agents under standard conditions. Ertapenem was more highly affected by porin loss than imipenem.

Conclusions: Ertapenem showed high activity against *K. pneumoniae* strains expressing ESBL, pACBL or both. Strains deficient in porins showed decreased susceptibility to beta lactams. The inoculum effect had a greater impact on imipenem than on ertapenem.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Ertapenem

Extended-spectrum β -lactamase

Plasmid AmpC

Porin

Inoculum effect

Introducción

La producción de betalactamasas (BL) es el mecanismo de resistencia a antimicrobianos betalactámicos de mayor relevancia en bacterias gramnegativas. Las BL de espectro extendido (BLEE) de las familias TEM, SHV, OXA y, más recientemente, CTX-M han sido descritas en un gran número de países, incluida España^{1–3}.

También se han aislado en el país enterobacterias productoras de BL de tipo AmpC de codificación plasmídica (pACBL)^{4,5}.

La expresión reducida de las proteínas de membrana externa es más frecuente en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE que en las que no expresan estas BL⁶. La pérdida de porinas en una cepa que expresa una BLEE o que hiperproduce una BL de tipo AMPc puede provocar la aparición de resistencia a carbapenémicos⁷.

El ertapenem (ERT) es un carbapenémico activo frente a la mayoría de los microorganismos aislados de los pacientes no hospitalizados. Con la excepción de las metalobetalactamasas y

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joserhb@us.es (J.R. Hernández).

otras carbapenemasas, el ERT es altamente resistente a la acción de las BL, incluidas las BLEE.

El propósito de este estudio fue analizar la actividad del ERT y compararla con la de otros betalactámicos y antimicrobianos de otras familias frente a las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE o de pACBL con ausencia de la expresión de porinas, así como analizar el efecto inóculo.

Métodos

Se seleccionaron 50 cepas clínicas de *K. pneumoniae* en función de la producción de pACBL, la producción de BLEE y el patrón de expresión de proteínas de membrana externa (tabla 1). Algunas cepas se aislaron en muestras clínicas de esta Unidad y los doctores Jones, Jacoby, Bradford y Tzouveleakis suministraron amablemente las otras. La caracterización de las BL se realizó mediante métodos convencionales, incluidos isoelectroenfoque, determinación del perfil de sustratos, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación^{8,9}. El análisis de las porinas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de las proteínas de membrana externa, obtenidas tras digestión con lauril sarcosinato sódico (Sigma, España) de las membranas celulares extraídas por sonicación de las bacterias⁷. Se consideró que una cepa era deficiente en porinas cuando no expresaba OmpK35 ni OmpK36.

Se estudió la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton siguiendo las directrices del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima, cefepima (FEP), imipenem (IMP), ERT, amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), piperacilina con tazobactam (PTZ), amikacina (AK), gentamicina (GN), cotrimoxazol (SXT) y ciprofloxacino (CIP). Para la determinación de las categorías clínicas se utilizaron los puntos de corte del CLSI en función de los valores de la CMI (concentración

mínima inhibitoria) obtenidos. No se modificaron las categorías clínicas de las cefalosporinas en las cepas productoras de BLEE. Para analizar el efecto inóculo, las pruebas de sensibilidad se realizaron utilizando inóculos estándares (10^5 unidades formadoras de colonias [ufc]/ml) e inóculos elevados (10^6 ufc/ml), como han descrito anteriormente Thomson y Molland¹⁰. Se utilizaron como cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Resultados

La CMI₅₀, la CMI₉₀, el rango y el porcentaje de las cepas sensibles se muestran en la tabla 2. Con el inóculo de 10^5 ufc/ml, los antimicrobianos más activos fueron IMP y AK, seguidos por ERT, FEP y CIP. Se observó efecto inóculo con todas las cefalosporinas y las combinaciones de betalactámico con inhibidor de BL, con excepción de la FOX. Los antimicrobianos con los que se observó efecto inóculo con mayor frecuencia fueron FEP, CTX, PTZ, CIP y SXT. Los antimicrobianos menos afectados por el efecto inóculo fueron AMC, GN y AK.

Las cepas deficientes en porinas mostraron menor sensibilidad a betalactámicos, independientemente del tipo de BL expresada. El IMP, el ERT y el FEP fueron los betalactámicos más activos, con cerca del 100% de sensibilidad en las cepas que expresaban porinas, pero este porcentaje cayó al 88,9, el 50 y el 55,5%, respectivamente, en el caso de las cepas deficientes en porinas. En el caso de los antimicrobianos no betalactámicos, el efecto de la pérdida de porinas fue menos destacable (tabla 2).

Los antimicrobianos más activos frente a las cepas que expresaban porinas y que producían BLEE fueron ERT, IMP y AK (el 100% de cepas sensibles) y FEP (el 90% de sensibilidad). En el caso de las cepas productoras de BLEE y deficientes en porinas, el IMP y la AK seguían siendo los agentes más activos (el 100% de

Tabla 1
Cepas seleccionadas para este estudio

pACBL–BLEE–POR–	pACBL– BLEE+ POR+	pACBL– BLEE+ POR–	pACBL+ BLEE– POR+	pACBL+ BLEE– POR–	pACBL+ BLEE+ POR+	pACBL+ BLEE+ POR–
2 cepas	10 cepas	12 cepas	18 cepas	1 cepa	4 cepas	3 cepas

BLEE: betalactamasa de espectro extendido; pACBL: betalactamasa de tipo AmpC plásmidica; POR: expresión de porinas.

Tabla 2
CMI, rango (µg/ml) y porcentaje de cepas sensibles a los antimicrobianos evaluados en función del tipo de betalactamasa producida

	BLEE POR+				BLEE POR–				pACBL POR+				pACBL POR–	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	% S	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	S (%)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	% S	CMI	
Cefoxitina	16	64	4–64	30	64	128	32–128	0	>128	>128	128–>128	0	>128	
Cefotaxima	8	32	<1–>128	50	128	>128	4–>128	8	32	>128	<1–>128	22	>128	
Ceftazidima	16	>128	<1–>128	40	>128	>128	16–>128	0	64	>128	2–>128	5	>128	
Cefepima	<1	4	<1–>128	90	32	>128	0,25–>128	41	<1	8	<1–16	94	<1	
Imipenem	<0,25	<0,25	<0,25–0,5	100	0,5	2	<0,25–2	100	0,5	1	<0,25–1	100	0,5	
Ertapenem	<0,25	<0,25	<0,25–2	100	0,5	2	<0,25–32	58	0,5	1	<0,25–4	94	1	
Amoxicilina con ácido clavulánico	8	32	2–32	60	16	32	4–64	30	64	64	16–64	0	64	
Piperacilina con tazobactam	8	64	<0,5–>64	70	>64	>64	4–>64	16	16	>64	4–>64	50	64	
Amikacina	<2	8	<2–16	100	<2	16	<2–16	100	<2	4	<2–128	94	32	
Gentamicina	4	32	<0,25–32	50	16	>32	<0,25–>32	33	4	8	<0,25–>32	66	32	
Cotrimoxazol	2	>32	<0,25–>32	60	2	>32	0,5–>32	50	32	>32	<0,25–>32	33	>32	
Ciprofloxacino	<0,25	4	<0,25–32	70	0,5	2	<0,25–32	75	<0,25	1	<0,25–32	94	4	

Valores de CMI en µg/ml.

Sólo hay una cepa con el perfil pACBL+ y POR–. Se muestran los valores de CMI.

S: cepas sensibles; BLEE: betalactamasa de espectro extendido; CMI: concentración mínima inhibitoria; pACBL: betalactamasa de tipo AmpC plásmidica; POR: expresión de porinas.

cepas sensibles), pero el porcentaje de cepas sensibles a ERT descendió a un 58,3%.

Frente a las cepas productoras de pACBL, el antimicrobiano más activo fue IMP, con un 96,2% de cepas sensibles, seguido por ERT, FEP, AK y CIP (el 94,4% de cepas sensibles, respectivamente). En estas cepas, el porcentaje de resistencia a FEP aumentó desde un 0% con un inóculo de 10^5 ufc/ml hasta un 65,4% con el inóculo de 10^6 ufc/ml. En estas cepas se observó efecto inóculo con los carbapenémicos. Este efecto afectó con mayor frecuencia al IMP, pero determinó menos cambios en la categoría clínica que en el caso del ERT, de modo que, con el inóculo de 10^5 ufc/ml hubo un 80 y un 14% de cepas sensibles y resistentes a ERT, respectivamente; mientras que con el inóculo de 10^6 ufc/ml esos valores fueron del 68 y del 30%. En el caso del IMP, un 96 y un 92% de las cepas eran sensibles con inóculos estándar y elevado, respectivamente, y el 4% eran resistentes con ambos inóculos. El efecto de la pérdida de porinas en estas cepas no pudo evaluarse debido al escaso número de cepas con estas características.

Discusión

En España la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE aisladas de muestras clínicas ha pasado de un 0,5% en el caso de *E. coli* y de un 2,7% en *K. pneumoniae* en el año 2000 a cifras de un 4% en el caso de *E. coli* y de un 5% en *K. pneumoniae* en el año 2006^{2,3}. De igual modo, cada vez hay más referencias sobre el aumento de enterobacterias productoras de BL de tipo pACBL aisladas en este medio⁵. Últimamente se han descrito aislamientos de cepas productoras simultáneamente de BL de tipo BLEE y de tipo AMPc¹¹.

Las opciones terapéuticas en estos casos son realmente reducidas, puesto que la coexistencia de ambas BL inactiva a todas las cefalosporinas, incluidas las cefamicinas, y hacen inútil el efecto inhibitor del ácido clavulánico. Además, los microorganismos que expresan una BLEE o una pACBL suelen contener otros determinantes de resistencia en el plásmido en el que se encuentra el gen que codifica la BL o incluso en otros plásmidos. Muchas veces la única opción terapéutica disponible son los carbapenémicos, aunque es posible la aparición de resistencia a éstos en el caso de la producción de carbapenemasas, de BLEE o de pACBL en combinación con la pérdida de porinas o de mecanismos de expulsión activa de antimicrobianos.

En este trabajo se ha comparado la actividad del ERT con la de otros antimicrobianos frente a un grupo de cepas de *K. pneumoniae* que producen BL de tipo AmpC o de tipo BLEE y con alteraciones en la expresión de porinas. Igualmente se ha evaluado la aparición de efecto inóculo mediante la comparación de las CMI de estos antimicrobianos frente a 2 inóculos diferentes.

En consonancia con estudios previos de actividad de antimicrobianos frente a microorganismos multirresistentes, los fármacos más activos a inóculo estándar fueron los carbapenémicos, la AK y la FEP. Por el contrario, cuando se utilizó el inóculo de 10^6 ufc/ml, las CMI de la FEP se incrementaron en el 89% de las cepas, al igual que se ha descrito en varios estudios^{10,12}. El efecto inóculo también se observó en los carbapenémicos, pero sólo en el caso de las cepas productoras de pACBL, y es más frecuente con IMP que con ERT. Betriu et al¹² han descrito también este hecho, y en su trabajo el porcentaje de cepas sensibles a IMP disminuye un 16% cuando se emplea el inóculo elevado. En este estudio, sin embargo, el efecto inóculo produjo más cambios de categoría clínica en el caso del ERT que en el del IMP y, así, con inóculo estándar hubo un 80 y un 14% de cepas sensibles y resistentes a ERT, respectivamente; mientras que con el inóculo de 10^6 ufc/ml esos valores fueron del 68 y del 30%.

Como se ha comentado anteriormente, la alteración en la expresión de porinas produce resistencia a los antimicrobianos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos, sobre todo si se asocia a la expresión de BL^{6,7}. Martínez- Martínez et al⁷ describen 2 cepas de *K. pneumoniae* en las que la sensibilidad a IMP está disminuida debido a la pérdida de las 2 porinas principales junto con la producción de BLEE. Además, el grado de resistencia aumenta cuando se utiliza un alto inóculo de microorganismo. Un estudio similar es el de Bradford et al¹³, en el que describen 3 cepas de *K. pneumoniae* que expresan la pACBL ACT-1, en las que aparece resistencia a IMP debido a la pérdida de una porina principal. Posteriormente, Hernández-Allés et al⁶ estudian la relación entre las alteraciones en la expresión de las proteínas de membrana y la disminución de sensibilidad a antimicrobianos en mutantes deficientes en porinas, y encuentran que la pérdida de estas proteínas de membrana asociada a la producción de BL produce un incremento de la resistencia a betalactámicos. Kaczmarek et al¹⁴ estudian un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* que presenta resistencia a IMP y al meropenem causada por la producción de la BL de tipo AMPc ACT-1 en combinación con una pérdida de porinas debida a una inserción en los genes *OmpK35* y *OmpK36* que produce su inactivación. Más recientemente, Elliott et al¹⁵ describen el desarrollo in vivo de resistencia a ERT en un paciente con una neumonía nosocomial producida por *K. pneumoniae* y tratada con ERT y AK. Un análisis de los aislamientos resistentes a ERT reveló que, además de la BLEE, que también estaba presente en el aislamiento sensible a ERT, aquéllas habían sufrido la pérdida de la porina *OmpK36*. Lee et al¹¹ describen la aparición in vivo de resistencia a ERT en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* de una muestra de sangre. Esta bacteriemia se trató con flomoxef y durante el tratamiento se aislaron en 3 nuevas ocasiones este mismo microorganismo, el último de los cuales desarrolló resistencia a ERT. Los 3 primeros aislamientos producían las BLEE CTX-M-3 y SHV-5 y eran deficientes en la porina *OmpK35*, pero eran sensibles a flomoxef y ERT. El cuarto aislamiento se hizo resistente a estos 2 antimicrobianos debido a la adquisición del gen *bla_{DHA-1}* y a la pérdida de la porina *OmpK36*. Por último, Girlich et al analizan en primer lugar la actividad hidrolítica de las BL de tipo CTX-M (CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9 y CTX-M-15) frente a ERT, y ven que es muy débil y que, por tanto, el ERT es efectivo frente a enterobacterias productoras de BLEE de tipo CTX-M. En otro estudio, estos autores seleccionan mutantes con sensibilidad disminuida a ERT, y encuentran que la modificación en la expresión de porinas es la causa de esta disminución de sensibilidad^{16,17}.

En este trabajo, los resultados obtenidos están en consonancia con los comentados anteriormente, de modo que, si casi todas las cepas que expresaban las porinas *OmpK35* y *OmpK36* eran sensibles a IMP, ERT y FEP, los porcentajes de sensibilidad a estos betalactámicos caían al 89, el 50 y el 55%, respectivamente, para las cepas deficientes en estas porinas.

En conclusión, el ERT ha resultado ser ligeramente menos activo que el IMP y la AK frente a los aislamientos de *K. pneumoniae* estudiados. El efecto inóculo afectó al IMP con mayor frecuencia que al ERT, pero sólo se detectó en cepas productoras de pACBL. Este efecto determinó un aumento en el porcentaje de cepas resistentes sólo en el caso de ERT. Las cepas deficientes en porinas analizadas tuvieron una sensibilidad disminuida a betalactámicos con respecto a las que sí la expresaban.

Financiación

Este estudio se realizó bajo los auspicios de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008), el

Ministerio de Sanidad y Consumo, y el Instituto de Salud Carlos III–FEDER. Los laboratorios MSD España han financiado parcialmente este estudio.

Bibliografía

- Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:500–10.
- Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:77–82.
- Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: II Estudio Multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008 (en prensa). Epub 27 de marzo 2009.
- Bou G, Oliver A, Ojeda M, Monzón C, Martínez-Beltrán J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2549–53.
- Navarro F, Pérez-Trallero E, Marimón JM, Aliaga R, Gomáriz M, Mirelis B. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December 2000). *J Antimicrob Chemother*. 2001;48:383–9.
- Hernández-Allés S, Alberti S, Álvarez D, Domenech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*. 1999;145:673–9.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, Álvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1669–73.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2122–5.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2153–62.
- Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;5:3548–54.
- Lee CH, Chu C, Liu JW, Chen YS, Chiu CJ, Su LH. Collateral damage of flomoxef therapy: In vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:410–3.
- Betriu C, Salso S, Sánchez A, Culebras E, Gómez M, Rodríguez-Avil I, et al. Comparative in vitro activity and the inoculum effect of ertapenem against *Enterobacteriaceae* resistant to extended-spectrum cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:1–5.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bshuh K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:563–9.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin Phoe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3396–406.
- Elliott E, Brink AJ, Van GJ, Els Z, Woodford N, Turton J, et al. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Infect Dis*. 2006;42:e95–8.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Do CTX-M β -lactamases hydrolyse ertapenem? *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:1155–6.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:832–4.