



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Actividad *in-vitro* de fosfomicina, sola o en combinaciones, frente a aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos



José-Luis Gómez-Garcés*, Yolanda Gil-Romero, Nuria Sanz-Rodríguez, Carmen Muñoz-Paraíso y Marta Regodón-Domínguez

Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles, Móstoles, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de abril de 2015

Aceptado el 30 de junio de 2015

On-line el 12 de agosto de 2015

Palabras clave:

Fosfomicina

Pseudomonas aeruginosa

Efecto sinérgico

R E S U M E N

Introducción: En la actualidad asistimos a un progresivo aumento de aislamientos de microorganismos con patrones de multirresistencia y aun de panresistencia. Fosfomicina (FO) es un antimicrobiano activo frente a una gran variedad de microorganismos, incluyendo cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), que es susceptible de actuar sinérgicamente con otras moléculas.

Métodos: El objetivo de este estudio consiste en evaluar la actividad *in-vitro* de FO frente a 120 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, utilizando un método de dilución en agar y otro de difusión en gradiente y, además, explorar, mediante el método de E-test y curvas de muerte, la posible sinergia de FO/amikacina y FO/ciprofloxacino, asociaciones potencialmente eficaces frente a *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

Resultados: Para FO, partiendo de los valores de corte epidemiológicos (ECOFF) que publica European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), más de las 3 cuartas partes de las cepas serían susceptibles de poder ser tratadas con este antimicrobiano, especialmente en combinación con otro agente. La asociación FO/ciprofloxacino presentó un efecto sinérgico en casi la mitad de los aislamientos (40%), mientras que la asociación FO/amikacina solo alcanzó este efecto sinérgico en el 12% de los casos.

Conclusión: La aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos hace necesaria la valoración de tratamientos combinados. Este trabajo sugiere que la combinación FO/ciprofloxacino puede ser útil, presentando un efecto sinérgico en el 40% de los aislamientos estudiados.

© 2015 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

In vitro* activity of fosfomycin, alone or in combination, against clinical isolates of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa

A B S T R A C T

Introduction: The increase in microorganisms showing patterns of multi-drug resistance or even pan-drug resistance is of growing concern. Fosfomycin (FO) is well known to be active against a wide variety of microorganisms, including highly resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), and can also synergistically act with other molecules.

Methods: This study examines the *in vitro* activity shown by FO against 120 strains of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* using an agar dilution and a gradient diffusion test. Possible synergistic effects of the combinations of FO/amikacin and FO/ciprofloxacin were also examined using E-test and time-kill techniques.

Keywords:

Fosfomycin

Pseudomonas aeruginosa

Synergistic effect

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlgarcés@microb.net (J.-L. Gómez-Garcés).

Results: According to the epidemiological cut-off value (ECOFF) issued by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), our results indicate that over three-quarters of the strains tested would be susceptible to FO treatment, especially if combined with another antimicrobial. The FO/ciprofloxacin combination had a synergistic effect on 40% of the clinical isolates, while for FO/amikacin this effect was only observed in 12% of the isolates.

Conclusion: The appearance of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains requires the evaluation by combination therapy. This report suggests that the FO/ciprofloxacin combination can be useful, showing a synergistic effect in 40% of the isolates.

© 2015 Published by

Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Introducción

Desde hace, al menos, una década venimos asistiendo a un progresivo y preocupante aumento de aislamientos de microorganismos con patrones de multiresistencia, y aun de panresistencia, especialmente en algunos bacilos gramnegativos no fermentadores tan estrechamente relacionados con enfermedades infecciosas en el hombre como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)¹.

La rápida diseminación de estas bacterias, y su implantación en determinadas áreas del hospital o en instituciones de cuidados de larga duración, no se ha correspondido con el desarrollo de nuevas moléculas activas frente a estos microorganismos por lo que el «redescubrimiento» de antiguas, y en ocasiones, relegados fármacos, tanto individualmente como formando parte de distintas asociaciones, constituye un capítulo de exploración de plena vigencia^{2,3}.

En esta línea, la fosfomicina (FO), un antibacteriano que inhibe la formación del peptidoglicano bacteriano, resulta un antimicrobiano activo frente a una gran variedad de microorganismos, incluyendo cepas de *P. aeruginosa*, sin mostrar resistencia cruzada con otros antibacterianos y siendo susceptible de actuar sinérgicamente con otras moléculas⁴. Sin embargo, la principal limitación para el uso de FO en el tratamiento de infecciones sistémicas por *P. aeruginosa* es la aparición de resistencia durante la terapia, relacionada con la alta frecuencia de mutaciones observada en diferentes estudios «in-vitro»^{5,6}, aunque se ha demostrado que esta limitación puede ser evitada utilizando FO en combinación con otras moléculas, consiguiendo, por otra parte, una actividad antibacteriana sinérgica⁷.

El objetivo de este estudio consistió, en primer lugar, en valorar la actividad *in-vitro* de FO frente a 120 cepas procedentes de aislamientos clínicos de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos utilizando un método de dilución en agar, considerado el método de referencia, comparándolo con la difusión en gradiente (E-Test, BioMérieux, Francia) para evaluar la correlación entre los 2 procedimientos, y, en segundo lugar, explorar la posible sinergia de fosfomicina/amikacina (FO/AK) y fosfomicina/ciprofloxacina (FO/CIP), asociaciones potencialmente eficaces frente a *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.

Material y métodos

Se estudiaron un total de 120 cepas no duplicadas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes aislamientos clínicos, presumiblemente no relacionados clonalmente (secreciones respiratorias, abscesos y úlceras cutáneas, etc.) de otros tantos pacientes, enviados al laboratorio de Microbiología de nuestro hospital durante 2012-2013, cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de imipenem y meropenem obtenidas por microdilución eran, para ambos antimicrobianos, ≥ 8 mg/L. Los mecanismos de resistencia (mutaciones en porinas, hiperexpresión de bombas de expulsión, hiperproducción de otras enzimas) probablemente múltiples, no incluyeron la producción de

carbapenemasas en ninguna cepa, al menos detectables, utilizando métodos fenotípicos. Los microorganismos fueron identificados mediante pruebas convencionales y posteriormente refrendados mediante espectrometría (MALDI-TOF, BioMérieux, Francia) y conservados en leche descremada a -70°C hasta el inicio del estudio.

La sensibilidad frente a FO, AK y CIP se llevó a cabo mediante difusión en gradiente (E-Test, BioMérieux, Francia) y mediante dilución en agar siguiendo los procedimientos y criterios descritos por el Clinical and Laboratory Standards Institute⁸.

La categorización de sensibilidad para FO se estableció a partir del punto de corte epidemiológico ECOFF que establece el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁹.

Para los experimentos con combinaciones de antimicrobianos se escogieron aleatoriamente 25 cepas de la serie, procedentes todas ellas de secreciones respiratorias, obtenidas de pacientes con ventilación mecánica o bronquiectasias y en ningún caso pacientes con fibrosis quística. Estas cepas fueron seleccionadas por presentar un patrón de resistencia más elevado frente a los antipseudomónicos más empleados en el tratamiento.

Las pruebas de sinergia antimicrobiana fueron realizadas empleando el método E-test a partir de las CMI obtenidas para FO, AK y CIP¹⁰. Las combinaciones probadas fueron: FO más AK y FO más CIP. Las CMI para cada combinación se interpretaron: a) valorando las diferencias de los valores obtenidos para cada antimicrobiano comparándolos con los de la combinación de ambos, sugiriendo un efecto sinérgico cuando la CMI de la combinación era 2 o más diluciones más baja que la CMI del antimicrobiano más activo individualmente, y b) mediante el cálculo del índice fraccional de concentración inhibitoria (IFCI) = (CMI de FO en combinación/CMI de FO sola) + (CMI del otro antibiótico en combinación/CMI del otro antibiótico solo). Se interpretó como efecto sinérgico cuando el IFCI era $\leq 0,5$; se consideró como efecto aditivo si los resultados del IFCI oscilaban entre $> 0,5-1$; valores entre > 1 y ≤ 4 indicaron indiferencia y valores > 4 denotaban antagonismo entre los antimicrobianos probados. Los estudios se realizaron por triplicado y se eligieron los valores medios obtenidos en las 3 lecturas.

En aquellas cepas en las que los resultados por E-test sugerían sinergia para alguna de las 2 combinaciones se determinaron las curvas de tiempo-muerte correspondientes. Estos últimos experimentos se llevaron a cabo a partir de concentraciones iguales a las CMI correspondientes a cada antimicrobiano. Brevemente, los cultivos en caldo Mueller-Hinton se inocularon con 5×10^5 de cada microorganismo estudiado, realizándose las lecturas a las 0, 4, 6, 8 y 24 h. El recuento bacteriano se realizó transfiriendo 100 μl de cada dilución para conocer las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada uno de los tiempos establecidos. Estos subcultivos se incubaron 18-24 h a 35°C . Un efecto sinérgico se definió como una disminución en, al menos, $2 \log_{10}$ UFC/ml sobre el fármaco más activo. Un efecto indiferente se consideró con $+1 \log_{10}$ UFC/ml comparado con el más activo y un efecto antagonico cuando el crecimiento fue $> 1 \log_{10}$ UFC/ml en relación con el agente menos activo.

Tabla 1

Intervalo, CMI₅₀ y CMI₉₀ (μg/ml) y porcentajes de resistencia de 5 antipseudomónicos habituales^a y fosfomicina^b frente a 120 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos

	E-test				Dilución en agar			
	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% de resistencia	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	% de resistencia
Imipenem	16-≥ 64	≥ 64	≥ 64	100	8-≥ 64	≥ 64	≥ 64	100
Meropenem	8-≥ 64	≥ 64	≥ 64	100	8-≥ 64	≥ 64	≥ 64	100
Amikacina	8-≥ 512	16	64	21,6	4-≥ 512	16	64	12,5
Ciprofloxacina	0,5-≥ 64	≥ 64	≥ 64	65	0,2-≥ 64	32	≥ 64	65
Fosfomicina	≤ 2-≥ 1024	32	≥ 512	22,5	≤ 2-≥ 512	16	≥ 512	22,5

^a Según Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S23, 2013.

^b Según valores ECOFF, EUCAST, 2013.

Tabla 2

Estudio de sinergia para 25 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos procedentes de secreciones respiratorias mediante E-test y curvas de muerte

Combinaciones	Sinergia	Efecto aditivo	Indiferencia
Ciprofloxacina + fosfomicina	10 (40%)	2 (8%)	13 (52%)
Amikacina + fosfomicina	3 (12%)	-	22 (88%)

Resultados

En la [tabla 1](#) se recogen los intervalos, las CMI₅₀ y las CMI₉₀ de FO y del resto de los antipseudomónicos estudiados frente a los 120 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos obtenidos. Estos resultados se expresan tanto para el método de difusión en gradiente como para la dilución en agar.

Aplicando el valor ECOFF sugerido por EUCAST para FO, el porcentaje de resistencia obtenido con los 2 métodos probados fue del 22,5%. Asimismo de las 120 cepas estudiadas por dilución en agar, un 65% fueron resistentes a CIP y un 12,5% a AK ([fig. 1](#)).

Entre ambos métodos existió desacuerdo en la categorización con los resultados obtenidos para AK, ya que mediante el método de dilución en agar se consideraron resistentes el 12,5% de las cepas, mientras que con el método de difusión esta cifra ascendía hasta el 21,6%. No existieron diferencias en la categorización ni para FO ni para CIP.

En la [tabla 2](#) se exponen los resultados referidos a los experimentos con combinaciones de antimicrobianos mediante E-test de las 25 cepas seleccionadas aleatoriamente. En 12 de las cepas estudiadas se advirtió un efecto sinérgico para alguna de las 2 combinaciones ensayadas y en una de ellas se observó sinergia para las 2 combinaciones probadas. El efecto sinérgico fue más frecuente entre FO/CIP (40%) que entre FO/AK (12%). Las curvas de muerte corroboraron estos mismos resultados tal y como se exponen en la citada tabla.

Entre las cepas en las que se observó sinergia para la combinación FO + CIP, las CMI de cada uno de los antibióticos oscilaron entre 2 y ≥ 1.024 para FO, considerándose por encima del ECOFF 3 de las 12 cepas estudiadas (25%), de forma similar al conjunto de la colección (22,5%), mientras que para CIP el 70% fueron resistentes versus el 65% de la colección. Para AK las 3 cepas con sinergia observada eran resistentes al mismo (100%).

Discusión

En nuestra serie, y considerando el ECOFF de EUCAST para FO, más de las 3 cuartas partes de las cepas (77,5%) presentan un fenotipo salvaje, y pudieran ser susceptibles de tratamiento con FO, preferiblemente en combinación con otro agente, para evitar la posible aparición de resistencias durante el tratamiento sistémico.

En cuanto a la categorización de la sensibilidad con los 2 métodos probados, observamos discrepancias para AK, obteniéndose porcentajes de resistencia del 12,5% para dilución en agar y del

21,6% para E-test. Sin embargo, y a diferencia de otros autores¹⁰, estas discrepancias en la categorización no se objetivaron en nuestra serie para CIP y para FO, aunque para este último es necesario precisar desde qué punto de corte establecemos la citada categorización, al no existir límites de resistencia bien definidos, teniendo que acudir, por ejemplo, a los valores ECOFF que publica EUCAST¹¹.

Entre las asociaciones probadas previamente con referencia a FO, la combinación con CIP ha ofrecido uno de los valores de IFCI más bajos, relacionándose con una elevada actividad sinérgica entre ambos antimicrobianos¹². Por otra parte y teniendo en cuenta el alto nivel de resistencia que presentaron las cepas seleccionadas a la mayoría de los antibióticos testados, AK es el antimicrobiano en el que observamos un menor grado de resistencia. Por ello las asociaciones elegidas en este estudio fueron FO-CIP y FO-AK.

En este sentido, nosotros encontramos que, empleando una técnica de gradiente de difusión, y valorando el IFCI, 10 de 25 cepas (40%) tenían valores para FO-CIP que oscilaban entre 0,25 y 0,5 indicativos de sinergia, mientras que en las 15 restantes se observaban valores compatibles con un efecto aditivo en 2 cepas, siendo el resto de los experimentos sugerentes de indiferencia para la asociación. No se produjo en ningún caso un efecto de antagonismo ([tabla 2](#)).

Entre estas mismas 25 cepas observamos sinergia con la combinación FO-AK para 3 de ellas (12%) en una de las cuales se observaba este efecto sinérgico para las 2 combinaciones ensayadas.

Finalmente, en los 13 casos (10 para FO/CIP y 3 para FO/AK) en los que la combinación de gradientes sugería un efecto sinérgico se llevaron a cabo curvas de muerte para asegurar los resultados, confirmándose los mismos en todos los casos, lo que incide en la adecuada valoración del método asociativo de difusión siempre que se realice cuidadosamente.

La combinación de FO con otros antimicrobianos es un dato frecuentemente citado en la literatura de los últimos años. Concretamente los resultados obtenidos frente a *P. aeruginosa* tienen especial protagonismo^{12,13}. En una revisión relativamente reciente de las series publicadas¹⁴ se citan 13 estudios que hacen referencia a la posible sinergia entre FO y otros antibióticos frente a este microorganismo. De ellos se deduce la posibilidad de contemplar mecanismos sinérgicos desde el 27%¹⁵ hasta el 78,4%¹⁶ con la asociación con CIP. En nuestra serie obtuvimos un porcentaje intermedio en relación con los resultados de las diferentes series, considerando que en casi la mitad de los aislamientos (40%) podría establecerse este efecto para la combinación de ambos antimicrobianos.

En cuanto a AK, también los datos expuestos en la literatura ofrecen una amplia variedad de resultados, desde la imposibilidad de obtener ningún tipo de efecto sinérgico¹⁷ hasta el 66,7%¹⁸, dejando de lado otros resultados más puntuales^{12,19}. Nuestros resultados también muestran un escaso número de cepas en las que se observe sinergia para esta combinación (12%), por lo que a la hora de trasladarlos a esquemas de tratamiento empírico en las infecciones ocasionadas por este tipo de microorganismos no parece una asociación prometedora. Naturalmente, lo heterogéneo de las metodologías empleadas en las diferentes series tanto en

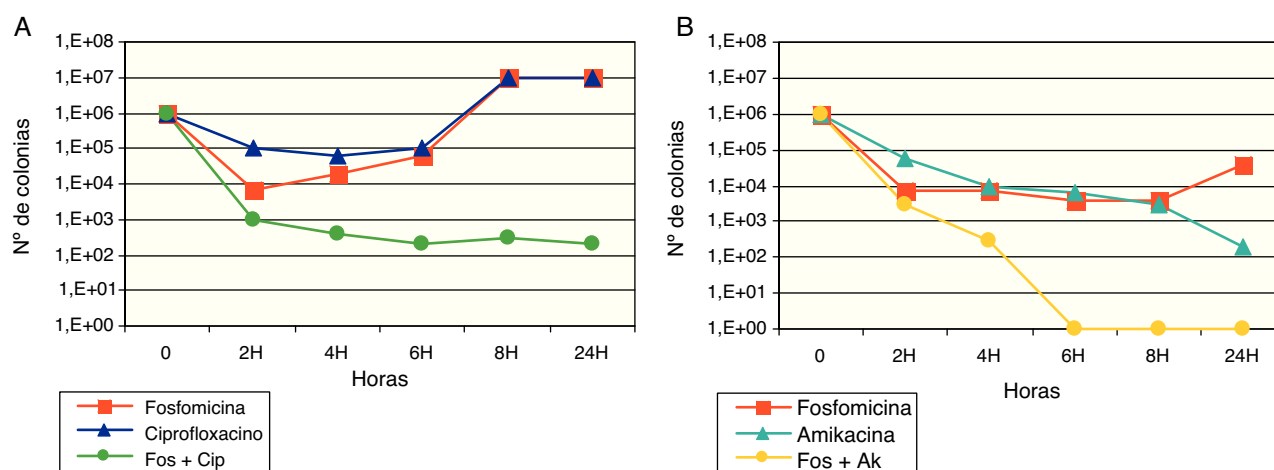


Figura 1. Ejemplos de sinergia entre fosfomicina y ciprofloxacino (A), y fosfomicina y amikacina (B) en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*.

cuanto a los microorganismos estudiados (origen, perfil de resistencias u otro tipo de selección) como a las técnicas ensayadas (tablero de ajedrez, curvas de muerte, IFCI) e incluso la variabilidad de los puntos de corte elegidos para FO dificultan el establecimiento de conclusiones sólidas a este respecto.

Un último punto de gran importancia debe también ser tenido en cuenta, y es el referente a la dificultad de trasladar estos resultados obtenidos en el laboratorio a la práctica clínica ya que existen diferentes interpretaciones acerca del valor clínico de los mismos, siendo este punto objeto de controversia en la literatura²⁰.

En cualquier caso, y no obstante todo lo anterior, la obtención de algunos de estos resultados obligan a continuar líneas de investigación al respecto, ensayando otras combinaciones distintas que incluyan colistina e incluso alguno de los propios carbapenémicos, sobre todo teniendo en cuenta algo en lo que sí existe un consenso unánime, esto es, la escasez de alternativas terapéuticas disponibles para el manejo de estos pacientes colonizados o infectados por este tipo de microorganismos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- Korvick JA, Yu VL. Antimicrobial agent therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agent Chemother. 1991;35:2167–72.
- Maviglia R, Nestorini R, Pennisi M. Role of old antibiotics in multidrug resistant bacterial infection. Curr Drug Targets. 2009;10:895–905.
- Neu HC. The crisis in antibiotic resistant. Science. 1992;257:1064–73.
- Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis P. Fosfomicin: Use beyond urinary tract and gastrointestinal infection. Clin Infect Dis. 2008;46:1069–77.
- Rodríguez-Rojas A, Macía MD, Couce A, Gómez C, Castañeda-García A, Oliver A, et al. Assessing the emergence of resistance: the absence of biological cost in vivo may compromise fosfomicin treatments for *Pseudomonas aeruginosa* infection. PLoS One. 2010;5:e10193.
- Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and

- Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:695–701.
- Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis P. Fosfomicin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting gram-negative bacilli: A systematic review of microbiological and clinical studies. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:111–20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. Document M100-S24. Wayne, PA: CLSI; 2014.
- Etest Application Sheet. AB BIODISK 2007-6, M0000503-MH0184. Disponible en: <http://www.ilxmedical.com/files/Etest-Applicationsheets/comboination%20testing>.
- Diez-Aguilar M, Morosini MI, del Campo R, García-Castillo M, Zamora J, Cantón R. In vitro activity of fosfomicin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 Spanish hospitals: Establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. Antimicrob Agent Chemother. 2013;57:5701–3.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters. Version 3.1, 2013. Disponible en: <http://www.eucast.org>.
- Tessier F, Quentin C. In vitro activity of fosfomicin combined with ceftazidime, imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997;16:159–62.
- Prueprasert P, Tunyapanit W. In vitro activity of fosfomicin-gentamicin, fosfomicin-ceftazidime, fosfomicin-imipenem, and ceftazidime-gentamicin combinations against ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36:1239–42.
- Kastori A, Rafailidis P, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Sinergy of fosfomicin with other antibiotics for gram-positive and gram-negative bacteria. Eur J Clin Pharmacol. 2010;66:359–68.
- Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, Ohuchi M. Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomicin on drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemother. 2007;53:202–9.
- Ullmann U. Synergism between ciprofloxacin and fosfomicin in vitro. Infection. 1987;15:264.
- Hayami H, Goto T, Kawahara M, Ohi Y. Activities of betalactams, fluorquinolones, amikacin and fosfomicin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from complicated urinary tract infection. J Infect Chemother. 1990;5:130–8.
- Watine J, Bourrel C, Dubourdiou B, Gineston JL, Bories P, Durand M, et al. Susceptibility of multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* to fosfomicin in combination with other antibiotics. Pathol Biol (Paris). 1994;42:293–5.
- Traub WH, Scheidhauer R, Leonhard B, Bauer D. Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: Clusters of nosocomial cross-infection and encounter of a multiple-antibiotic resistant strain. Chemother. 1998;44:243–59.
- Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: The state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:159–77.