



Universidad de Oviedo

**Programa de Doctorado “Biomedicina y Oncología
Molecular”**

**“Optimización farmacocinética y
farmacodinámica de los antimicrobianos como
pilar en el tratamiento de las infecciones
bacterianas por bacterias multirresistentes.”**

Diego Parra Ruiz

Tesis Doctoral

20/07/2018



Universidad de Oviedo

**Programa de Doctorado “Biomedicina y Oncología
Molecular”**

**“Optimización farmacocinética y
farmacodinámica de los antimicrobianos como
pilar en el tratamiento de las infecciones
bacterianas por bacterias multirresistentes.”**

Diego Parra Ruiz

Tesis Doctoral

20/07/2018

Agustín Hidalgo balseira

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Jorge Parra Ruiz

Servicio medicina Interna. Hospital HLA Inmaculada



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Optimización farmacocinética y farmacodinámica de los antimicrobianos como pilar en el tratamiento de las infecciones bacterianas por bacterias multirresistentes.	Inglés: Pharmacokinetic and pharmacodynamic optimization of antimicrobials as a pillar in the treatment of bacterial infections by multiresistant bacteria.
2.- Autor	
Nombre: DIEGO PARRA RUIZ	
Programa de Doctorado: BIOLOGIA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR	
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS	

RESUMEN (en español)

La lucha frente a las enfermedades infecciosas tuvo un punto de inflexión con el descubrimiento de los antibióticos. A partir de ese momento la balanza se decantó a nuestro favor, mejorando el pronóstico de muchas enfermedades que, hasta ese momento, eran mortales. Sin embargo, muy poco tiempo después se detectaron bacterias resistentes a los antibióticos, comenzando una nueva batalla. A cada nueva resistencia bacteriana oponíamos una nueva familia de antibióticos, con más espectro y más actividad, hasta que las bacterias se han hecho multirresistentes, llegando en algunos casos a ser resistentes a todos los antibióticos, las temidas panresistentes.

Si en el año 2009 la mitad de los médicos de las UCIs españolas afirmaban haber tratado alguna bacteria extremadamente resistente, hoy en día, es raro encontrar algún médico que no se haya encontrado alguna vez con una de ellas. Pero aún, a partir de 2016 se han comunicado en muchos países (Grecia, EEUU, Argentina, Brasil, y un largo etcétera) cepas de bacilos gramnegativos resistentes a todos los antibióticos.

En esta nueva situación que vivimos tenemos dos retos importantes, mantener la eficacia de los tratamientos antibióticos y, al mismo tiempo, controlar la aparición de estas bacterias panresistentes.

El conocimiento de la relación PK/PD (farmacocinética/farmacodinámica) es básico para la optimización de las terapias antimicrobianas. Globalmente en los trabajos realizados que forman parte de esta Tesis doctoral, se exploran



estrategias de dosificación y combinaciones novedosas de antimicrobianos que nos permiten optimizar su empleo, consiguiendo el doble objetivo remarcado, la eficacia clínica y la prevención de las resistencias.

En estos trabajos presentamos datos *in vitro* de modelos estáticos que exploran la eficacia de combinaciones de antibióticos entre sí y con etanol en el tratamiento de infecciones relacionadas con catéter, uno de los grandes caballos de batalla del intervencionismo actual, demostrando que algunas de estas estrategias son capaces de erradicar por completo la infección, impidiendo la recolonización del catéter una vez suspendido el tratamiento antimicrobiano. Presentamos también una combinación novedosa de distintos antibióticos frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, explorada en un modelo *in vitro* dinámico, que simula las condiciones en humanos del tratamiento de una bacteriemia y, finalmente, una correlación *in vitro/in vivo* de los datos de actividad frente a cocos grampositivos de combinaciones con fosfomicina, un antibiótico de origen español e infrutilizado, pero de una enorme eficacia cuando se emplea adecuadamente, lo que nos permite confirmar la hipótesis de nuestra Tesis doctoral; que el conocimiento de las características PK/PD derivadas de modelos *in vitro* se relaciona con una mejoría del tratamiento antimicrobiano en el paciente.

RESUMEN (en Inglés)

The fight against infectious diseases had a turning point with the discovery of antibiotics. From that moment the balance was decided in our favor, improving the prognosis of many diseases that, until then, were fatal. However, very soon after, bacteria resistant to antibiotics were detected, starting a new battle. At each new bacterial resistance we opiate a new family of antibiotics, with more spectrum and more activity, until the bacteria have become multiresistant, reaching in some cases to be resistant to all the antibiotics, the dreaded pan-resistant ones.

If in 2009 half of the doctors in Spanish ICUs said they had treated some



extremely resistant bacteria, nowadays, it is rare to find a doctor who has never met one of them. But still, as of 2016, strains of gram-negative bacilli resistant to all antibiotics have been reported in many countries (Greece, the US, Argentina, Brazil, and a long etc).

In this new situation we live, we have two important challenges: maintaining the efficacy of antibiotic treatments and, at the same time, controlling the appearance of these pan-resistant bacteria.

The knowledge of the PK / PD relationship (pharmacokinetics / pharmacodynamics) is basic for the optimization of antimicrobial therapies. Globally, in the works that are part of this doctoral thesis, dosing strategies and novel combinations of antimicrobials are explored that allow us to optimize their use, achieving the double objective highlighted, the clinical efficacy and the prevention of resistances.

In these works we present in vitro data of static models that explore the efficacy of combinations of antibiotics with each other and with ethanol in the treatment of catheter-related infections, one of the great workhorses of the current intervention, demonstrating that some of these strategies are able to completely eradicate the infection, preventing recolonization of the catheter once the antimicrobial treatment has been suspended. We also present a novel combination of different antibiotics against strains of multiresistant *Acinetobacter baumannii*, explored in a dynamic in vitro model, which simulates the conditions in humans of the treatment of a bacteremia and, finally, an in vitro / in vivo correlation of the data of activity against gram-positive cocci of combinations with fosfomicin, an antibiotic of Spanish origin and underused, but of enormous effectiveness when properly used, which allows us to confirm the hypothesis of our doctoral thesis; that the knowledge of the PK / PD characteristics derived from in vitro models is related to an improvement of the antimicrobial treatment in the patient.

Ante todo me gustaría agradecer la oportunidad que me brindó mi hermano Jorge, al que seguí los pasos en el mundo de la medicina, de ayudar en alguno de sus múltiples trabajos sobre antibioterapia y farmacocinética-farmacodinámica tema que también me apasiona. Si no hubiera sido por esa ayuda y la pertinaz insistencia en que debía ser doctor no habría llegado aquí después de cuatro años.

Después a Agustín Hidalgo, primero profesor y ahora director de tesis, por dejarme pertenecer a Instituto Universitario del Principado de Asturias participando en su programa de doctorado y, siempre con su seriedad y habitual calma que transmiten una sensación de no poder fallar, dirigirme desde la lejanía de unos trabajos que hacíamos en la distancia.

Finalmente no quiero concluir sin agradecer a los primeros en todo esto que fueron mis padres por haberme obsequiado con la oportunidad de cursar estudios universitarios y haberme dado a mi hermano

Índice de abreviaturas

ABC: Área bajo la curva

Cl: aclaramiento plasmático

Cmax: concentración máxima

CMI: concentración mínima inhibitoria

Cmin: concentración mínima

Cp: concentración plasmáticas

Css: concentración estado estacionario

DR: velocidad de infusión

ENVIN: estudio nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales

EPA: Efecto postantibiótico

GISA: *staphylococcus aureus intermedio a glicopéptidos*

MODS: síndrome de disfunción multiorgánica

PK/PD: farmacocinética/farmacodinámica

SASM: *staphylococcus aureus meticilin sensible*

SARM: *staphylococcus aureus* meticilin resistente

SERM: *staphylococcus epidermidis* meticilin resistente

Tmax: tiempo para alcanzar la concentración máxima

UCI: unidad de cuidados intensivos

XDR: Bacterias extremadamente resistente

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Conceptos generales de farmacocinética y farmacodinámica	3
1.1.1 Volumen de distribución.....	8
1.1.2 Aclaramiento.....	9
1.1.3 Semivida de eliminación.....	10
1.1.4 Área bajo la curva.....	12
1.2 Paciente crítico.....	14
1.3 Relación farmacocinética y farmacodinámica.....	17
1.3.1 Características del antibiótico.....	18
1.3.2 Fisiopatología del paciente.....	19
1.3.3 Localización de la infección.....	21
1.3.4 Características propias del microorganismo.....	22
1.3.5 Clasificación PK/PD de los antibióticos.....	26
1.4 Terapia antibiótica.....	29
1.5 Resistencia bacteriana.....	33
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	39
3 HIPÓTESIS.....	43
4. RESÚMENES DE ARTÍCULOS	
4.1 Artículo 1. Cordoba J et al, 2015.....	49
4.2 Artículo 2. Parra D et al, 2015.....	55
4.3 Artículo 3. Coronado-Álvarez NM et al, 2018-07-09.....	64

5.DISCUSIÓN	75
6.CONCLUSIONES	103
7. BIBLIOGRAFIA	107

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Conceptos generales de Farmacocinética y farmacodinámica

La forma más adecuada de optimizar la antibioterapia y prevenir futuras resistencias, consiste en seleccionar terapias con la mayor eficacia posible y que, al mismo tiempo, tengan los menos efectos secundarios posible, para lo que nos basamos en la información obtenida mediante estudios realizados la mayor parte de las veces en modelos *in vitro*, o en modelos animales. Esta extrapolación de resultados plantea una cuestión que no está todavía resuelta, ¿cómo mejorar la predicción de la eficacia de un antibiótico en base a la información dada por ensayos clínicos usando modelos animales *in vitro* y/o *in vivo*?

Hace años que los modelos basados en el estudio de la farmacocinética y la farmacodinámica (PK/PD) se han convertido en la llave para encontrar y desarrollar nuevos medicamentos o mejorar los ya existentes, pero la información aportada por estos modelos no es considerada relevante por todos los clínicos. El resultado es que, en la práctica cotidiana, se usan antibióticos registrados hace cinco o seis décadas de los que se dispone de nuevos datos basados en este tipo de estudios PK/PD, pero cuya información no se ha trasladado a la clínica, lo que se traduce en usos en indicaciones actualmente injustificadas, y/o empleo de dosis que no son adecuadas, que generan riesgo para los pacientes y contribuye a generar resistencias en los microorganismos, como quedó reflejado en 2014 en una conferencia de la Sociedad Europea de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Muller, 2015).

Además, las formulaciones de muchos antibióticos han ido cambiando a lo largo de los años, pero este cambio no se ha acompañado de modificaciones en la información del producto, lo que contribuye aún más a los riesgos comentados anteriormente.

Por otro lado, con respecto a los nuevos medicamentos, durante la fase de desarrollo, la elección de la dosis de un nuevo antibiótico se hace integrando la dosis máxima eficaz del mismo, obtenida de datos de modelos in vitro, con la dosis máxima segura en el ser humano, obtenida de datos de ensayos con voluntarios sanos y enfermos oligosintomáticos, que poco tienen que ver con pacientes críticamente enfermos.

Es por ello que el conocimiento de la relación PK/PD es básica para predecir la respuesta de dosis determinadas de antibióticos frente a microorganismos concretos, lo que se traducirá en la elección de las dosis que optimizarán los resultados clínicos y microbiológicos, esto es; maximizar la eficacia, disminuir los efectos secundarios, y minimizar la aparición de variantes de resistencia que, sin duda alguna, es el verdadero caballo de batalla de la infectología actual.

En las décadas de los 40 y 50 del pasado siglo, el doctor Harry Eagle ya estableció conceptos clave en este campo y se le considera el padre del concepto PK/PD. Mediante experimentos desarrollados en roedores, Eagle identificó patrones tiempo dependientes en la actividad bactericida de la penicilina, y también describió cómo las bacterias se recuperaban del “efecto tóxico” de la penicilina sobre ellas. Posteriormente trasladó las implicaciones que tenían estas observaciones al

tratamiento en humanos. Por sus investigaciones en 1987 recibió la medalla nacional de la ciencia de Estados Unidos.

Con posterioridad, entre los años 70 y 90 del siglo XX, los conceptos basados en PK/PD fueron redescubiertos y aumentados de forma exponencial por el doctor William Craig en experimentos también con roedores.

Hoy en día las informaciones de estas investigaciones se usan, prácticamente, en todas las clases de familias de antimicrobianos. Son usadas en el desarrollo de moléculas, para el cálculo de dosis e intervalos de administración, para determinar los puntos de corte de susceptibilidad y, para evaluar el concepto de resistencia a antibióticos. En la actualidad, los procedimientos de registro de antibióticos han mejorado mucho habiéndose publicado numerosas guías de práctica clínica por las autoridades sanitarias americanas y europeas. Estas guías incluyen recomendaciones sobre las dosis de antibióticos basándose en la relación PK/PD, lo cual provee una forma de trabajo universal sobre relación exposición-respuesta, permitiendo la medición de la eficacia, toxicidad y aparición de resistencias

De una forma muy resumida podríamos decir que la farmacocinética describe la relación entre la dosis administrada y los cambios en la concentración de un medicamento en el cuerpo durante un periodo de tiempo y, por tanto, en el lugar esperado de acción. Estudia el curso temporal de las concentraciones y cantidades de los fármacos, y de sus metabolitos, en los líquidos biológicos, tejidos y excretas, así como su relación con la respuesta farmacológica, y construye modelos adecuados para interpretar estos datos. La farmacocinética clínica se marca como objetivo alcanzar y mantener la concentración plasmática necesaria para conseguir

el efecto terapéutico sin llegar a producir efectos tóxicos. Por el contrario, la farmacodinámica, hace mención de la relación entre la concentración del medicamento y su efecto farmacológico en el órgano diana. De una forma simple se podría decir que la farmacocinética es lo que el cuerpo hace con el medicamento y, por el contrario, la farmacodinámica lo que el medicamento hace al cuerpo.

Por lo tanto, definimos la relación PK/PD a la dosis-efecto del medicamento, que realmente es lo que queremos mejorar para nuestro resultado final, que sería la erradicación de la infección.

Para que un fármaco produzca efectos terapéuticos o tóxicos debe alcanzar un intervalo preciso de concentraciones en la biofase, es decir, el medio en el que interactúa con sus receptores. Por debajo de este intervalo no se observará ningún efecto farmacológico o éste será sub-terapéutico; por encima, el efecto puede ser excesivo, o es posible que aparezcan efectos no deseados.

La concentración de un fármaco que se alcanza en su lugar de acción es la consecuencia de los siguientes procesos:

- Absorción, es decir, la entrada del fármaco en el organismo que incluye los procesos de liberación de su forma farmacéutica, disolución y absorción propiamente dicha.
- Distribución del fármaco para que llegue del lugar de absorción a la circulación sistémica y desde ella hasta los tejidos. Para que el fármaco alcance, desde su lugar de absorción, su lugar de acción debe atravesar diversas membranas para llegar a la sangre y, para pasar de ésta al líquido

intersticial y, en su caso, al interior de las células o incluso estructuras intracelulares. Este paso depende de la fijación del fármaco a las proteínas del plasma, ya que solo el fármaco libre se difunde libremente a los tejidos.

- Eliminación del fármaco, sea por metabolismo principalmente hepático, o por excreción del fármaco inalterado por la orina, bilis, etc. En algunos casos, este metabolismo puede producir metabolitos activos cuya presencia también deberá tenerse en cuenta.

La intensidad de estos tres procesos, explicada en la Figura 1, varía con el tiempo; por este motivo, la cantidad del fármaco que hay en el organismo no permanece estática, sino que varía con el tiempo.

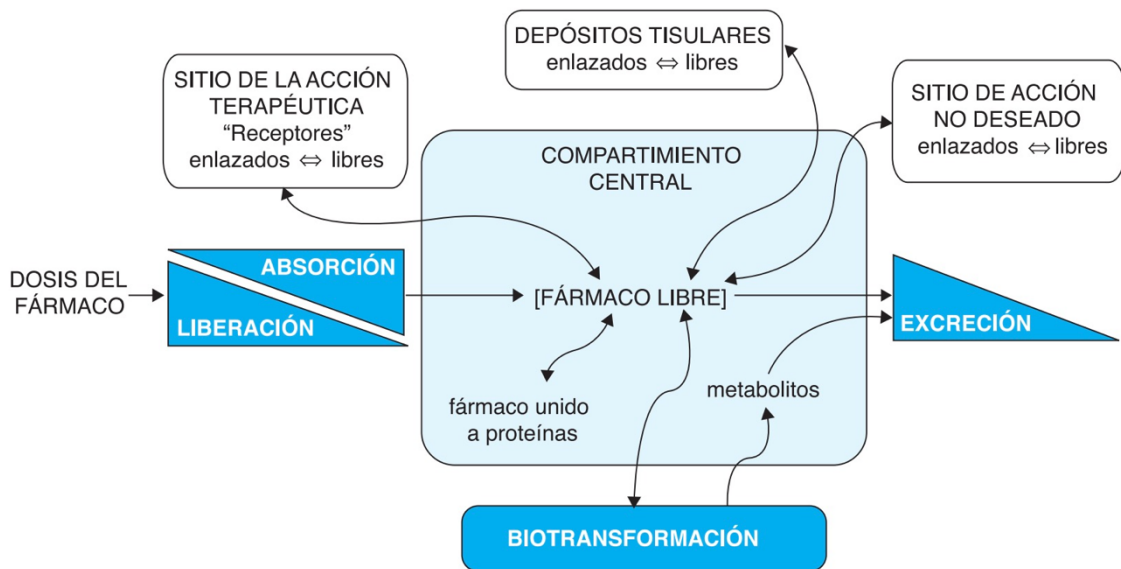


Figura 1. Principios fundamentales de la farmacocinética.

Existen parámetros que son muy relevantes para la estimación de la farmacocinética de los medicamentos, algunos de ellos intentaremos explicarlos brevemente a continuación:

1.1.1 El volumen de distribución (Vd).

El volumen de distribución no corresponde con un “volumen real”. Es un número que relaciona la concentración de fármaco en plasma con la cantidad total de fármaco

en el organismo. Por eso, se le denomina “volumen aparente de distribución”.

$$Vd (L) = \text{cantidad de fármaco en el organismo (mg)} / \text{concentración plasmática de fármaco (mg/L)}$$

El Vd está directamente relacionado con la distribución del fármaco a los tejidos, cuanto mayor es el valor de Vd, mayor distribución del fármaco a los tejidos, y viceversa.

Esto se explica porque el Vd está condicionado, por un lado, por la unión a las proteínas plasmáticas, y por otro lado a la unión a componentes tisulares; así, si un fármaco se une mucho a la albúmina sérica, su Vd será pequeño y, por tanto, su distribución a los tejidos será pequeña (como habíamos señalado con anterioridad, sólo la fracción de fármaco no unida a proteínas es capaz de distribuirse a los tejidos). Por el contrario, si un fármaco se une mucho a nivel tisular, el volumen de distribución será alto.

El Vd de un fármaco es un valor constante. Sin embargo, puede variar dependiendo de la situación fisiopatológica del paciente. Por ejemplo, si hay edema, el agua

corporal total y el agua extracelular aumentan, lo que hará aumentar el Vd de fármacos hidrosolubles. De igual forma, cambios en la masa corporal total y en la masa magra (por ejemplo, con la edad) también pueden afectar a Vd.

Debido a estos aspectos, el Vd es básico a la hora de determinar la dosis de choque o de carga que hay que administrar de un fármaco para que las concentraciones plasmáticas alcancen el estado estacionario, es decir las concentraciones eficaces, desde el inicio de la terapia. La dosis de choque se calcula a partir de las siguientes expresiones:

$$\text{Dosis de choque (mg)} = Vd \text{ (L)} \times \text{Concentración plasmática deseada (mg/L)}$$

ó

$$\text{Dosis de choque (mg/Kg)} = Vd \text{ (L/Kg)} \times \text{Concentración plasmática}$$

1.1.2 El aclaramiento (CL).

Describe la eficiencia de la eliminación irreversible de un fármaco del organismo. Las principales vías de eliminación de los fármacos son la excreción renal y el metabolismo hepático, aunque también puede darse eliminación por excreción biliar, metabolismo extrahepático, etc. Se define como el volumen de sangre que se depura de fármaco por unidad de tiempo, y se expresa en litros por hora (L/h). El aclaramiento es la constante de proporcionalidad entre la concentración plasmática (Cp) y la velocidad de eliminación del fármaco.

$$\text{Velocidad eliminación (mg/h)} = CL \text{ (L/h)} \times Cp \text{ (mg/L)}$$

El aclaramiento total o plasmático es la suma de los aclaramientos correspondientes a cada uno de los procesos de eliminación que sufre el fármaco. Así, si un fármaco se elimina parcialmente por excreción renal y por metabolismo hepático, el aclaramiento total será la suma del aclaramiento renal y del aclaramiento hepático. El aclaramiento condiciona la frecuencia con la que se debe administrar una determinada dosis (velocidad de administración, DR) para alcanzar la concentración de fármaco en el estado estacionario deseada (C_{ss}).

$$DR \text{ (mg/h)} = CL \text{ (L/h)} \times C_{ss} \text{ (mg/L)}$$

En el caso concreto de la antibioterapia, si conocemos cuál es el aclaramiento plasmático de un antibiótico (CL), y conocemos la concentración en estado estacionario (C_{ss}) que debemos alcanzar para obtener el efecto óptimo (dicha concentración dependerá de las características del microorganismo que esté causando la infección que queremos tratar), podemos determinar cuál es la velocidad de infusión (DR) de dicho antibiótico para maximizar el efecto antibiótico, minimizando tanto la posibilidad de que aparezcan efectos secundarios, como de aparición de variantes de resistencia.

1.1.3 Semivida de eliminación o Vida Media ($t_{1/2}$).

La semivida o vida media, es el tiempo que ha de transcurrir para que la cantidad o concentración de un fármaco en el organismo disminuya a la mitad. Como

parámetro temporal, la vida media se expresa en unidad de tiempo, en horas.

Este parámetro está relacionado con la constante de velocidad de eliminación (K), que es la relación entre el volumen de distribución y el aclaramiento, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vida media, } t_{1/2} \text{ (h)} = 0,693/K$$

$$\text{siendo } K = Vd \text{ (L)}/CL \text{ (L/h)}$$

La vida media es un parámetro que condiciona:

- La duración del efecto después de la administración de una dosis única: cuanto mayor sea la vida media, más tiempo se mantiene la concentración plasmática por encima de la concentración mínima eficaz.
- El tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en un régimen de dosis múltiples. Cuanto más alto es el valor de la vida media, es decir, cuanto más lenta es la eliminación, el tiempo que se requiere para alcanzar el estado estacionario es mayor. Se requieren entre 3 y 5 vidas medias para que se alcance el estado estacionario.
- La frecuencia de administración, es decir, el intervalo posológico. En el estado estacionario, las diferencias entre Cmax y Cmin dependen de la vida media y del intervalo de dosificación. Si se administra un fármaco con una frecuencia de administración superior a su vida media, las fluctuaciones serán pequeñas, es decir, si la vida media es de 12 horas, y se administra un fármaco cada 6 horas, las fluctuaciones serán pequeñas

1.1.4 El área bajo la curva concentración plasmática en función del tiempo.

El área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, ABC o AUC (del inglés area under the curve) representa la exposición del organismo al fármaco. Normalmente se refiere a la curva desde tiempo 0 hasta tiempo infinito, a menos que se indique el intervalo. Por ejemplo, el AUC_{24h} se refiere al área bajo la curva en un intervalo de 24 horas. Se expresa en mg*h/L. Tras una administración endovenosa, el AUC se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$AUC = \frac{\text{dosis}}{Cl}$$

La representación gráfica de las relaciones entre la tasa y el grado de entrada, distribución y eliminación de los medicamentos se ve reflejada en la figura 2. Esta representación esquemática de un modelo de curva farmacocinética nos permitirá entender posteriormente los distintos perfiles de tiempo-exposición sistémica, que nos servirán para clasificar los antibióticos de acuerdo a sus distintos patrones de actividad. Antes es necesario definir dos conceptos más, el primero la concentración máxima de fármaco que se alcanza con una dosis, llamada C_{max}, o exposición máxima sistémica., y el tiempo para que se alcance esta concentración máxima, denominada T_{max}. Ambos conceptos dependen de lo rápido que el medicamento entre y salga del cuerpo humano.

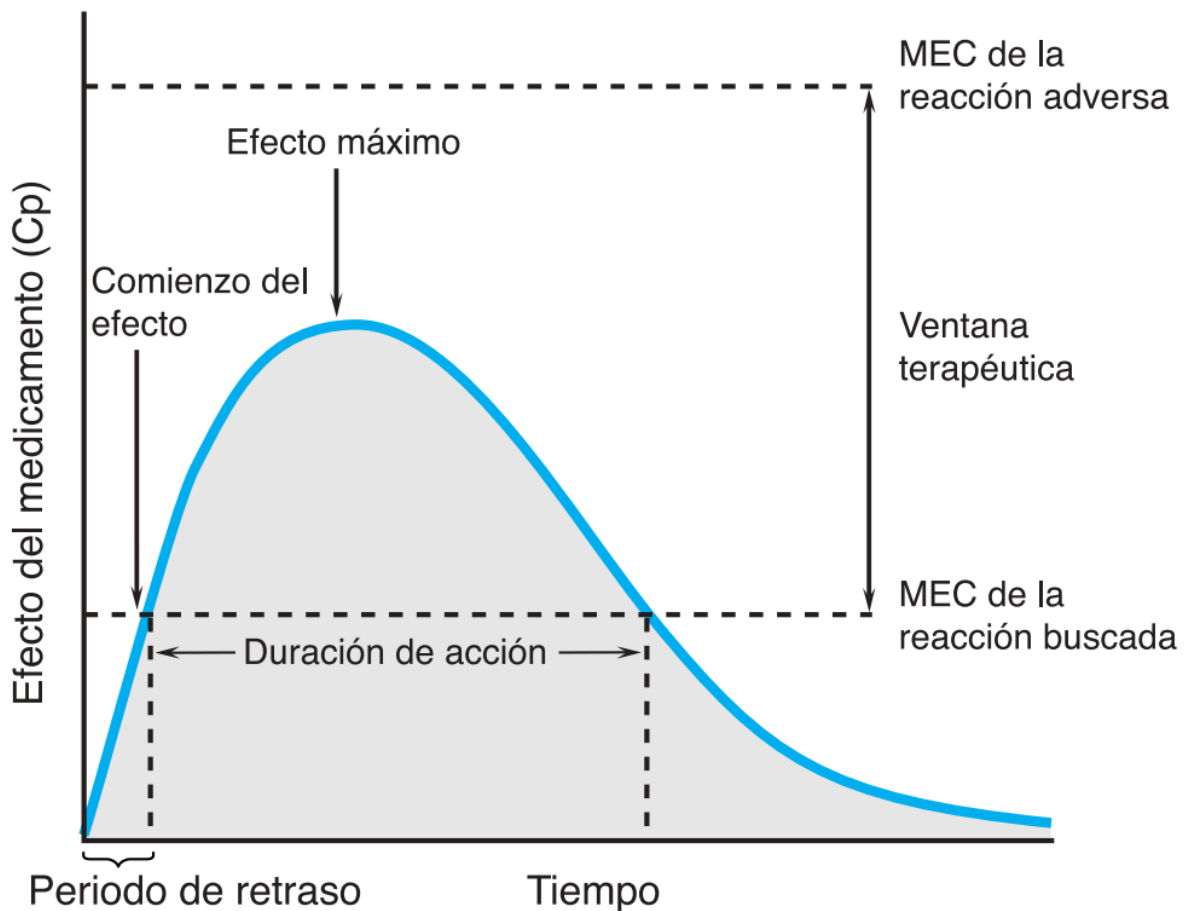


Figura 2. Esquema de los principales factores farmacocinéticos.

MEC: Concentración mínima eficaz (del inglés Minimum Effective Concentration).

Cp: Concentración plasmática

Es importante resaltar en esta gráfica un aspecto que nos parece muy importante. El denominado como **periodo de retraso o tiempo de eficacia**, es decir, el tiempo que, en este caso, el antibiótico tarda hasta alcanzar la concentración mínima necesaria para comenzar con el efecto. Este tiempo dependerá de las circunstancias del paciente, de la vía de administración (la administración por vía intravenosa tendrá siempre un tiempo de eficacia más corto que la vía oral, por

ejemplo), y de las propiedades farmacocinéticas del antibiótico administrado; circunstancias todas estas básicas a la hora de elegir el mejor antibiótico para cada paciente concreto.

1.2 Paciente crítico

Es difícil definir con exactitud un paciente crítico, pero podríamos decir que es aquel en el que las funciones orgánicas se ven amenazadas por un agente externo, en nuestro trabajo las enfermedades infecciosas. En Medicina Intensiva trabajamos principalmente con dos escalas de gravedad, la escala APACHE II (Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation) y la SAPS III (Simplified Acute Physiologic Score). En ambas el nexo común son los cambios fisiológicos que de una forma aguda se producen en estos pacientes, además de ciertos aspectos de salud previos. Estas escalas de gravedad tienen un carácter pronóstico de mortalidad.

Los pacientes críticos se diferencian de otros pacientes no solo en la probabilidad de fallecimiento, sino que, a consecuencia de la situación clínica que padecen sufren enormes cambios fisiológicos (fisiopatológicos, pues son la respuesta a una situación patológica). Son estos cambios fisiológicos que aparecen en los pacientes críticos, los responsables de las diferencias en cuanto a la farmacocinética de los medicamentos empleados en su tratamiento, y que resultan en distintos resultados, por lo que conocerlas resulta básico para un adecuado enfoque terapéutico.

En primer lugar, el volumen de distribución y el aclaramiento se ven alterados. Durante las primeras horas de ingreso los pacientes suelen tener aportes de fluidos en altas dosis, necesarios para el mantenimiento de un gasto cardíaco adecuado, lo que en muchas ocasiones conlleva un edema intersticial y celular, aumentando el volumen de distribución. En otras ocasiones, como en pacientes postoperados o con pérdidas excesivas gastrointestinales, se producen pérdidas de fluidos, lo que acarrea un descenso del volumen total circulante, en un primer momento, y posteriormente, del volumen de agua total, que influye, nuevamente, en el volumen de distribución de los fármacos.

En segundo lugar, alteraciones en determinados órganos del cuerpo llevan a cambios en el aclaramiento. Como es bien conocido, el aclaramiento de los fármacos se realiza fundamentalmente mediante la depuración renal y hepática. Los riñones son los que eliminan principalmente los antibióticos no alterados químicamente ni metabolizados en el cuerpo. El hígado posee una doble función, es el órgano en que se produce la metabolización de los fármacos, en la inmensa mayoría de las ocasiones, aunque existen otros órganos que también pueden realizar una función metabolizadora, como el intestino. Junto a la anterior función, el hígado también puede excretar por la bilis fármacos no metabolizados.

No podemos dejar de mencionar otra posible vía de eliminación de fármacos que, aunque de menor importancia, también cumple una función de metabolismo farmacológico y que, al igual que el hígado y los riñones, sufre alteraciones fisiológicas muy relevantes en los pacientes críticos, como son los pulmones son

responsables de la eliminación de algunos fármacos con características volátiles. Este órgano tiene una extensión muy grande de superficie expuesta a daños inflamatorios. La membrana alveolo capilar es muy susceptible a la endotoxina que se libera por las bacterias en el curso de las infecciones o por la propia respuesta inflamatoria del paciente a las mismas produciendo una ruptura de las mismas con el consiguiente paso de sustancias desde el alveolo al capilar produciendo en casos de pacientes con infecciones respiratorias paso al torrente sanguíneo de más material infeccioso o, viceversa pasando sangre al alveolo e inhabilitándolo para su función. En otras ocasiones en éste mismo órgano y, en determinados pacientes críticos que necesitan de ventilación mecánica para mantener una respiración adecuada, solo por el proceso de la respiración con presión positiva se produce apertura y cierre de unidades alveolares que conllevan lo que se conoce como bio-trauma provocando una respuesta inflamatoria similar a la que se produce en las infecciones.

Por último, añadir que en situaciones de hipoperfusión tisular como es el caso de pacientes críticos con infección sistémica, se produce un descenso en el transporte de moléculas a los órganos diana y una menor actividad de las mismas con alteraciones en las concentraciones de, por ejemplo, antibióticos en el seno de las infecciones. En situaciones de shock el cuerpo humano redistribuye el flujo sanguíneo hacia el corazón y el cerebro produciendo un descenso del mismo hacia los riñones y el hígado que, como ya se dijo con anterioridad son los dos órganos fundamentales en el aclaramiento de sustancias químicas.

En el caso concreto que nos ocupa, esto es, la terapéutica antimicrobiana en el paciente crítico, el conocimiento de los cambios fisiológicos que se producen en enfermos críticos nos permitirá a optimizar la dosis del antimicrobiano en cuestión, en muchos casos aumentando su dosis y, de esta forma, mejorar su relación PK/PD y, a la postre, optimizar los resultados.

1.3 Relación Farmacocinética y Farmacodinámica (PK/PD)

De una forma práctica, la terapia antimicrobiana se podría asemejar a un puzle compuesto por varias piezas (figura 3), que deben fusionarse para asegurar una curación clínica y prevenir resistencias. Estas piezas son el propio antibiótico, el sitio de la infección a tratar, la concentración mínima inhibitoria del patógeno y la fisiopatología del paciente.

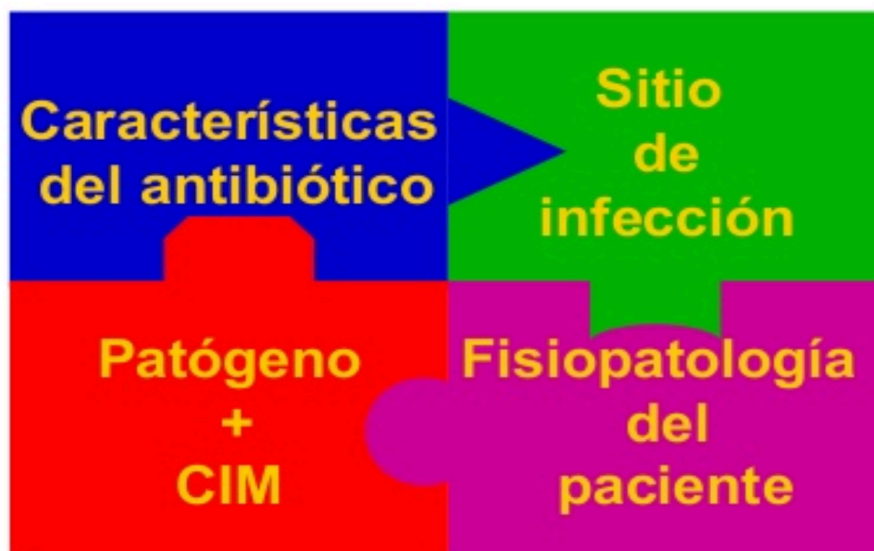


Figura 3 El puzle de la terapia antimicrobiana.

CIM: Concentración mínima inhibitoria.

1.3.1 Características del antibiótico

Son muchas las características a tener en cuenta para explicar la relación PK/PD, tantas que sería imposible abarcarlas todas en esta breve introducción, por lo que nos centraremos en aquellas que consideramos más importantes, y que más implicaciones tienen en la elección del antibiótico. La primera de estas características que se deben tener muy en cuenta es su interacción con el agua así, en función de ésta, tendremos antibióticos hidrofílicos e hidrofóbicos. El ya comentado cambio en el volumen de distribución que se produce durante las fases iniciales de la agresión bacteriana sobre el endotelio vascular hace variar mucho la concentración de medicamentos según su condición farmacocinética. Al aumentar este espacio, los antibióticos hidrofílicos pasarían principalmente al espacio intersticial disminuyendo su concentración en plasma.

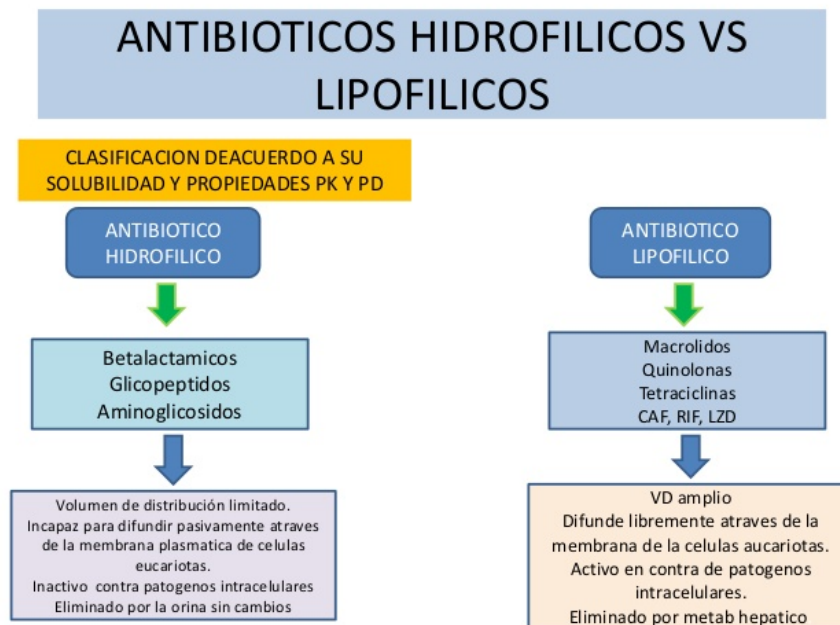


Figura 4. Diferenciación de los principales antimicrobianos según afinidad al agua
Fisiopatología del paciente

1.3.2 Fisiopatología del paciente

Como ya hemos comentado, el paciente crítico se diferencia enormemente de otros pacientes y esto es consecuencia, básicamente, del desarrollo en estos pacientes de un daño y disfunción múltiple de órganos, conocido, con el acrónimo de MODS (del inglés Multi-Organ Dysfunction Syndrome) que es una de las principales causas de mortalidad entre los pacientes de UCI.

Hace aproximadamente 30 años se empezó a comprender que el shock, la infección y otros tipos de agresión, podían desencadenar una serie de reacciones que acababan concluyendo en una lesión endotelial en el capilar sanguíneo, la cual llevaba asociada un aumento de la permeabilidad capilar y producción de edema secundario, que originaba una menor disponibilidad de oxígeno en la célula, que terminaba siendo fatal por la disminución de la producción de energía celular. Todos los órganos se ven afectados por esta disfunción, y tanto los riñones como el hígado, estructuras básicas en el aclaramiento de los fármacos no son una excepción, si bien la afectación renal es más importante y precoz que la hepática. Este daño en los sistemas de aclaramiento conduce a alteraciones diferentes en función de las características de los fármacos, fortaleciendo el concepto de “puzle” terapéutico. Así, los antibióticos hidrofílicos, que como hemos señalado (figura 4) son eliminados predominantemente por el sistema renal, sufren alteraciones farmacocinéticas más frecuentemente que los antibióticos lipofílicos, que tienen una excreción predominantemente hepática.

Ante una agresión al cuerpo humano, en nuestro estudio las producidas por infecciones, se producen una serie de alteraciones inflamatorias en cascada que son conocidas como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS, del inglés Systemic Inflammatory Response Syndrome) que, hasta hace dos años cuando se acompañaba de infección se definía como sepsis. Actualmente se tiende a pensar y definir en función de la disfunción orgánica producida por la infección. Dicha respuesta inflamatoria comentada, en ocasiones desmesurada, condiciona una activación de monocitos, macrófagos y plaquetas, entre otras células, y una respuesta humoral consistente en el aumento de la producción de determinadas citocinas y proteínas plasmáticas, incluyendo aquellas que forman parte de la coagulación, que, junto con las alteraciones en el capilar, son las dos principales productoras del MODS.

Esta alteración en la coagulación tiene dos vertientes; por un lado, se produce un consumo elevado de plaquetas y factores de coagulación lo que conlleva una situación de coagulopatía intravascular diseminada produciendo hemorragias y, por otro lado, a una situación procoagulante en el sistema capilar, produciendo microtrombosis a este nivel, con alteraciones en el transporte de oxígeno, nutrientes y antibióticos.

La adaptación del cuerpo a esta inflamación conlleva modificaciones hemodinámicas, como el aumento de la frecuencia cardíaca y la disminución de las resistencias de los vasos sanguíneos, lo que produce una hipoperfusión tisular, disminuyendo el aporte sanguíneo a los tejidos, empeorando así, la maltrecha perfusión tisular.

Otro cambio importante en la fisiología del paciente crítico es la alteración en la síntesis proteica.

Los enfermos críticos se encuentran, con frecuencia desnutridos, y por la afectación hepática que padecen a consecuencia de la respuesta exagerada (MODS), tienen limitada la capacidad de síntesis proteica. Esta doble afectación se traduce en el descenso de los valores séricos de albúmina, pero también de otras moléculas transportadoras del cuerpo humano, lo que se traduce en una menor proporción de antibiótico unido a proteínas plasmáticas. Como hemos señalado anteriormente, solo el fármaco libre (no unido a proteínas plasmáticas) es capaz de difundir, por lo que la disminución de proteínas transportadoras se traduce en una mayor proporción de antibiótico libre y, por tanto, en un aumento de la filtración renal.

Por otro lado, la disminución de las proteínas plasmáticas se traduce en la aparición de edemas, y dado que al antibiótico no unido a proteínas plasmáticas difunde libremente al espacio intersticial, se produce un aumento del volumen de distribución (Torrabadella de Reynoso 2002).

La consecuencia final del aumento del volumen de distribución y del aumento de aclaramiento renal es una disminución de la concentración plasmática del antibiótico y, por tanto, una disminución de la eficacia del antibiótico.

1.3.3 Localización de la infección

Retomando el puzle de la terapia antimicrobiana (figura 3), abordaremos brevemente la importancia de otra de las “piezas”, la localización de la infección.

Cada localización tiene unas características PK/PD distintas y complejas. Así las infecciones de piel y partes blandas que, según la gravedad, pueden acarrear desastrosas consecuencias para pacientes, e incluso la muerte, suelen tener muy alterada la penetración de medicamentos debido a la variación producida en el volumen de distribución, puesto que en este órgano del cuerpo humano es donde más, y mayor importancia tiene el acúmulo de líquido extracelular (los consabidos edemas). Además, si la infección se asocia con la necesidad de retirar grandes zonas de piel y tejido celular subcutáneo (como en el caso de desbridamientos), o por la pérdida masiva de líquidos por rotura de la integridad cutánea (como en el caso de grandes quemados), la dificultad para alcanzar niveles terapéuticos adecuados aumenta considerablemente.

Así mismo, si la infección se localiza en el sistema nervioso central (SNC), como por ejemplo en el caso de una meningitis, el antibiótico debe atravesar la barrera hematoencefálica antes de poder alcanzar el líquido cefalorraquídeo. Una de las características de esta barrera es la relativa impermeabilidad a muchas sustancias, por lo que es necesario conocer la capacidad de difusión de cada antibiótico para poder ajustar la dosis de los mismos, capacidad de difusión que no solo depende del volumen de distribución, sino también de las características específicas de cada antibiótico (Goodman&Gilman. 2007).

1.3.4 Características propias del microorganismo

Finalmente, no podemos evitar mencionar la importancia de las características propias del microorganismo, tanto las derivadas de la composición de su pared

(grampositivos o gramnegativos), o de su velocidad de crecimiento, entre otros factores, que condicionarán la actividad de muchos antibacterianos. Estas características constituyen, o caracterizan, la farmacodinámica. Dos son los factores farmacodinámicos a los que prestaremos una especial atención por la importancia que poseen en cuanto a la caracterización posterior de la relación PK/PD. (Canut Blasco et al, 2015)

En primer lugar, tenemos que señalar que es necesario mensurar de alguna medida la susceptibilidad de los distintos microorganismos a los antibióticos, definiéndose las bacterias en sensibles o resistentes a un antibiótico concreto en base a la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI es, como su propio nombre indica, la concentración mínima necesaria de un antibiótico concreto para inhibir el crecimiento de una bacteria dada. De esta definición podemos extraer dos consecuencias, relacionadas entre sí, a menudo confundidas por muchos clínicos, y que serán básicas a la hora de elegir un antibiótico u otro. La CMI es independiente para cada antibiótico y para cada bacteria, por lo que no se deben comparar CMIs de diferentes bacterias entre sí, ni de diferentes antibióticos entre sí.

Con mucha frecuencia, al visualizar un informe de microbiología, los clínicos se decantan por el antibiótico con mejor CMI, considerando de esa manera que dicho antibiótico es el más eficaz para el tratamiento de la infección. Esta argumentación es falaz, ya que la CMI indica la concentración mínima a la que un antibiótico inhibe el crecimiento de esa bacteria en condiciones controladas en un laboratorio de

microbiología, pero es posible que a las dosis recomendadas de ese antibiótico en humanos no se alcance en el foco de infección la CMI por lo que, a pesar de los datos *in vitro*, no se podrá utilizar el antibiótico *in vivo*.

Esto lleva aparejada la definición de sensibilidad y resistencia, habiéndose adoptado, por consenso, unos valores de CMI para cada bacteria y para cada antibiótico por encima de los cuales se considera a una bacteria resistente a un antibiótico, y por debajo de los cuáles se considera como sensible, existiendo en algunas ocasiones una zona de sensibilidad intermedia. Estas categorías indican la probabilidad de respuesta de un microorganismo ante un antibiótico concreto a la dosis recomendada de ese antibiótico (Doern GV et al, 2011). Así mismo, y de una importancia similar, esta CMI permite definir el modelo de actividad antibacteriana; es decir, la respuesta máxima de un antibacteriano concreto frente a una bacteria dada puede venir determinada por la concentración, es decir, a mayor concentración mayor eficacia, o por el tiempo que se mantienen las concentraciones por encima de la CMI, independientemente de cuántas veces se encuentre por encima de esta CMI. Es decir, gracias a la definición de CMI podemos clasificar a los antibióticos en dos grandes tipos, concentración dependiente, los primeros, o tiempo dependiente, los segundos (Cercenado et al, 2013).

El segundo parámetro farmacodinámico que queremos resaltar es al efecto post-antibiótico (EPA). La unión del antimicrobiano a las estructuras bacterianas, de forma reversible, desencadena una serie compleja de alteraciones y modificaciones en la célula, tanto fisiológicas como morfológicas, haciendo que la bacteria superviviente no recobre su funcionamiento normal hasta pasado un tiempo más o

menos largo, en comparación con las bacterias que no han sido tratadas. Las células expuestas a la acción del antimicrobiano pierden su capacidad de multiplicación durante varias horas después de que el antimicrobiano haya sido eliminado, a la vez que experimentan una serie de alteraciones ultraestructurales que afectan a su morfología y funcionalidad enzimática normal. La recuperación de estas funciones dependerá de varios factores, siendo los más importantes la concentración de antimicrobiano y el tiempo de exposición (Pastor et al. 1994).

Las primeras observaciones de este fenómeno datan de los años 1940. Joseph Bigger, en 1944, fue el primero en demostrar que las bacterias grampositivas, tras ser expuestas a la acción de la penicilina, no recobraban su crecimiento normal hasta transcurridas algunas horas después de haber sido eliminado el antibiótico (Bigger J, 1944). Posteriormente, Bundtzen en 1981 lo denominó efecto postantibiótico (EPA), definiéndolo como el retraso del crecimiento bacteriano que se manifiesta después de una breve exposición de la bacteria al antimicrobiano (Bundtzen RW et al, 1981).

El mecanismo por el que los antimicrobianos induce EPA en los microorganismos es en parte desconocido, ya que las diferencias en la duración de este efecto en las distintas combinaciones antimicrobiano-microorganismo sugieren que deben existir varios mecanismos implicados. La explicación más probable es que el EPA es debido a los daños no letales producidos por los antimicrobianos y/o a la persistente unión de éstos en determinados lugares bacterianos, lo que se traduce en un retraso en el crecimiento normal de la bacteria (Pastor A et al. 1999).

No es objeto de esta breve revisión explicar en detalle todos y cada uno de los factores implicados en el EPA, baste con señalar que la intensidad de este efecto se basa, fundamentalmente, en el tipo de antimicrobiano y tipo de microorganismo, duración de la exposición, concentración del antibiótico y del microorganismo (tamaño del inóculo bacteriano) y de la fase de crecimiento de la bacteria (Craig WA et al. 1987).

1.3.5 Clasificación PK/PD de los antibióticos.

La definición de estos conceptos básicos es necesaria para poder abordar la importancia de la relación PK/PD. Hemos visto que los antibióticos pueden clasificarse en dos grandes tipos, tanto en función de sus características farmacocinéticas y de sus características farmacodinámicas. Pues bien, de la relación entre los parámetros farmacocinéticos y los parámetros farmacodinámicos surge otra clasificación, que es la que nos permitirá optimizar el tratamiento antibiótico. En función de la concentración y del aclaramiento del antibiótico (parámetros farmacocinéticos), por un lado, y del modo de acción y de la existencia o no de un EPA prolongado, por otro, clasificamos los antibióticos en tres grandes grupos (Cercenado E & Cantón R, 2013):

- Antibióticos con actividad concentración dependiente y EPA prolongado.

Para estos antibióticos, el parámetro más directamente relacionado con la eficacia es la relación entre la concentración máxima que alcanza el antibiótico y la CMI del microorganismo (C_{max}/CMI). Accesoriamente,

también existe una relación entre el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo (ABC) y la CMI (ABC24h/CMI). Estos antibióticos se utilizan a altas dosis, y el prolongado EPA permite utilizar intervalos de dosificación amplios (una dosis diaria). El ejemplo paradigmático de este grupo son los aminoglucósidos.

- Antibióticos con actividad tiempo dependiente y EPA mínimo o moderado.

El objetivo de la terapia es conseguir una larga exposición al antibiótico. Para los antibióticos incluidos en este grupo, el tiempo durante el cual las concentraciones permanecen por encima de la CMI ($T > CMI$) es el parámetro relacionado con la erradicación bacteriana y la respuesta microbiológica. Este parámetro se denomina tiempo de eficacia. Los betalactámicos y los macrólidos son los antibióticos que se consideran representantes característicos de este grupo.

- Antibióticos con actividad concentración independiente y EPA prolongado.

Al aumentar la concentración de estos antibióticos, la erradicación bacteriana aumenta solo ligeramente, pero se consigue una prolongada inhibición del crecimiento. El objetivo en estos casos es optimizar la dosis y el ABC24h/CMI es el parámetro relacionado con la eficacia. La mayor parte de los antibióticos (excluidos los betalactámicos y los aminoglucósidos) se ajustarían a este perfil PK/PD.

Actualmente, los modelos PK/PD han evolucionado desde una disciplina descriptiva a una ciencia con plausibilidad biológica y mecanicista. Específicamente, se han desarrollado nuevos conceptos de modelos de PK/PD basado en

mecanismos, que constituyen una base científica para predecir los efectos de los medicamentos en humanos sobre la base de información de investigaciones preclínicas *in vitro* e *in vivo*. En áreas donde la comprensión del mecanismo de la enfermedad es limitada o, no se dispone de datos experimentales, los conceptos de modelos PK/PD también se pueden usar junto con métodos estadísticos avanzados para explorar los puntos finales. Dichos análisis pueden usarse para definir prospectivamente nuevas medidas de eficacia y seguridad, así como para optimizar el diseño de estudios experimentales y clínicos futuros.

No podemos dejar de hacer mención a un estudio que marcó un antes y un después en cuanto al abordaje PK/PD del tratamiento antimicrobiano en el paciente crítico es el denominado estudio DALI (Defining Antibiotics Levels in Intensive Care Patients. Este estudio prospectivo y multicéntrico realizado en 2012 (Roberts et al, 2012), tuvo como objetivo evaluar si las dosis administradas de betalactámicos en esta población eran suficientes para el tratamiento de determinadas infecciones. En este estudio se reclutaron 361 pacientes críticos con infecciones y que recibieron tratamiento con ocho betalactámicos diferentes. La intención de los autores fue comparar los resultados clínicos con los parámetros PK/PD de dichos fármacos. De todos los pacientes incluidos, 248 fueron tratados con betalactámicos y, al valorar cuáles fueron los predictores de respuesta al tratamiento, detectaron que la probabilidad de curación clínica fue un 32% superior si se había alcanzado en el paciente el parámetro PK/PD que predice la eficacia de los betalactámicos, es decir, que la concentración libre del fármaco estuviese por encima de la CMI del microorganismo ($fT_{>CMI}$) más del 50% del intervalo entre dosis ($fT_{>CMI}$ 50%). Si la

$fT_{>CMI}$ se mantuvo el 100% del intervalo entre dosis ($fT_{>CMI}$ 100%), la posibilidad de curación aumentó, demostrando así la aplicabilidad en el paciente crítico de los conceptos PK/PD. Posteriormente este mismo grupo, en un subestudio del DALI demostró que los pacientes tratados mediante infusión continua de piperacilina tazobactam o meropenem demostraron una mayor supervivencia que los pacientes tratados con estos antibióticos administrados en forma de bolus. La comparación de los parámetros PK/PD demostró que los pacientes tratados mediante antibióticos administrados mediante infusión continua alcanzaron un $fT_{>CMI}$ 50% y $fT_{>CMI}$ 100% con mayor frecuencia que los administrados mediante bolus, siendo la diferencia estadísticamente significativa para el $fT_{>CMI}$ 100%, lo que podría explicar en parte los mejores resultados obtenidos con esta forma de administración (Abdul-Aziz et al, 2016).

1.4 Terapia antibiótica

Los antibióticos son, indiscutiblemente, los medicamentos más desarrollados a lo largo del pasado siglo XX, y este desarrollo ha contribuido a salvar numerosas vidas hasta este momento. La medicina moderna se basa en ellos para el tratamiento de las infecciones, causa de hasta 1/3 de los ingresos hospitalarios, con distintos espectros de gravedad de acuerdo a datos muy recientes de la comunidad de Madrid (Saiz-Rodríguez M et al, 2017) (Saiz-Rodríguez M et al, 2017). Por otro lado, junto a su indicación en el tratamiento de las infecciones, tienen otras indicaciones, como prevenir la aparición de infecciones en procesos quirúrgicos, o en los trasplantes de órganos.

Además de la multitud de empleos (por el gran número de infecciones, diversidad de usos), otra de las características particulares de los antibióticos es que son prescritos por una multitud de especialidades, siendo uno de los pocos tratamientos que se puede afirmar que son prescritos, en algún momento, en todos y cada uno de los servicios que conforman un hospital, y las UCIs no son ajenas a esta norma, constituyendo uno de los grupos terapéuticos más frecuentemente prescritos en las UCIs en todo el mundo, como se desprende de datos publicados en el año 2009, donde en un seguimiento a pacientes ingresados en una UCI, se describió que hasta un 71% de los pacientes tienen pautado, al menos, un antibiótico (Registro ENVIN 2008).

Esta enorme variedad en cuanto a empleos, y la enorme diversidad de facultativos implicados en su prescripción, conforma el tercer lado de un triángulo de particularidades de este grupo terapéutico, que es la altísima prescripción y el aumento progresivo de su consumo. Tomando como ejemplo las UCIs españolas, entre los años 2004 y 2013, se ha producido un aumento del uso de antibióticos, pasando de un 54,8% de pacientes que tenían pautado, al menos, un antibiótico, hasta un 63%, con una media de 2,21 antibióticos por paciente (Registro ENVIN 2014).

Desde las distintas sociedades médicas españolas se han intentado establecer iniciativas para combatir este uso excesivo de los antibióticos. Varios son los postulados, crear equipos multidisciplinarios donde se incluyan especialistas en

enfermedades infecciosas/ internistas, intensivistas duchos en la materia, microbiólogos, farmacéuticos, preventivistas; crear comisiones de antibióticos; desarrollo de programas informáticos que avisen a especialistas en la materia cada vez que se pautan determinados antibióticos de amplio espectro en el hospital; auditorias terapéuticas donde existe un farmacólogo clínico supervisando tratamientos; dedicar especialistas en enfermedades infecciosas/medicina interna a revisar la duración de tratamientos así como establecer una desescalada en la terapia empírica y, como ya hemos visto antes, incidir en la aplicación de criterios PK/PD.

Independientemente de la vía elegida, existe un consenso entre todos los expertos implicados en que la mejor manera de optimizar el tratamiento antibiótico se basa en conseguir que la prescripción antibiótica se base en tres criterios básicos:

- Administración precoz (después de obtener muestras de los focos donde sospechemos la infección) combinando en ocasiones distintas familias para tener un efecto sinérgico, a las dosis más altas “permitidas” (para conseguir con rapidez una concentración plasmática alta) y de forma empírica.
- Identificación de factores de riesgo de resistencia antibiótica, como el estado de inmunidad, exposición previa a antibióticos, estancia hospitalaria prolongada.
- Crear un “mapa de resistencias” que indiquen los microorganismos predominantes en cada unidad de hospitalización, así como su perfil de resistencias.

Este último aspecto se ha conseguido de manera sobresaliente a nivel de las UCIs. En España, desde hace muchos años, existe un registro anual acerca de las enfermedades infecciosas en las UCIs denominado ENVIN, acrónimo de Estudio Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales, siendo reconocido desde 2014 por el Ministerio de Sanidad como registro de interés nacional. Este estudio se hace a nivel de toda España y con pacientes de muy diversa gravedad. No solo están contempladas las infecciones (tipo, gravedad, localización), sino que también se incluyen datos acerca de los microorganismos causantes (especie, resistencias), y sobre los antibióticos más frecuentemente usados (número, tipo y dosificación). Otro aspecto importante es que estos datos permiten a las distintas unidades de cuidados intensivos del país compararse y establecer criterios de calidad asistencial acreditando a las unidades con distinciones en función de su proceso asistencial. Sin embargo, la combinación entre la falta de nuevos antibióticos, y el aumento de resistencias de bacterias hospitalarias, sobre todo en bacilos gramnegativos, han redirigido el enfoque terapéutico hacia el empleo de antibióticos más antiguos, situación que también puede apreciarse en el estudio ENVIN donde, comparando los datos históricos con los actuales se aprecia la evolución en el uso de los mismos y el repunte de aquellos más antiguos, sobre todo en combinación.

Este repunte en el uso de antibióticos que anteriormente se habían desechado por falta de utilidad clínica, o por la existencia de efectos secundarios graves, representa, por una parte, una cierta desesperación de los clínicos ante la falta de opciones terapéuticas, pero también una mejora en el conocimiento de estos antibióticos. Coincidiendo con la mejora de los conocimientos de los parámetros

PK/PD de muchos antibióticos modernos, se ha producido un renovado interés en aplicar dichos conocimientos PK/PD a los antibióticos más antiguos para optimizar su empleo, mejorando su eficacia y disminuyendo su toxicidad.

1.5 Resistencia bacteriana

La resistencia antibiótica es un problema ampliamente extendido que afecta a todos los países y ha dado lugar a múltiples conferencias de consenso, resoluciones institucionales y estrategias de abordaje. Actualmente, la definición de un microorganismo como resistente o sensible a un antibiótico viene dada por los puntos de corte que establece la agencia europea para la determinación de sensibilidades antimicrobianas, EUCAST (del inglés European Committee in Antimicrobial Susceptibility Testing), que son publicados y actualizados anualmente en su página web. Esta organización, surgida a propuesta de varias sociedades europeas, entre ellas las de cuidados intensivos, es la que se ocupa, desde 1997, no solo de establecer los puntos de corte de sensibilidad y resistencia, sino también de los aspectos técnicos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica *in vitro*.

Gracias a estos puntos de corte podemos clasificar a las bacterias en sensibles, resistentes o con susceptibilidad intermedia y, además, podemos clasificar a las bacterias resistentes en multirresistentes, MDR (del inglés multidrug resistant), cuando presenta resistencia, al menos, a un agente de tres o más familias de antimicrobianos, extremadamente resistente, XDR (del inglés extensively drug

resistant), cuando presenta resistencia, al menos, a un agente de todas las familias, excepto a dos de esas familias y, finalmente, diremos que es completamente resistente, PDR (pan drug resistant) cuando es resistente a todos los antibióticos de todas las clases de antimicrobianos (Magiorakos AP et al, 2012).

Estas resistencias antimicrobianas se producen, en determinados casos, por evolución natural a través de mutaciones genéticas de los microorganismos, facilitadas, además, por los ciclos tan rápidos de replicación de estos microorganismos. Así, por ejemplo, *S. aureus* puede replicarse y originar 1 millón de “descendientes” en menos de 12 horas (Avendaño López 2018).

Los mecanismos de resistencia pueden transmitirse de unas bacterias a otras. Los genes de resistencias pueden transmitirse de una bacteria dada a su progenie, pero también pueden transmitirse entre bacterias de la misma especie no relacionadas, o incluso entre bacterias de especies diferentes mediante plásmidos o transposones. Los primeros, normalmente hebras circulares de ADN no cromosómico, suelen transportar múltiples genes de resistencia que pasan entre bacterias a través de la conjugación (transferencia horizontal mediante una breve conexión del citoplasma de dos bacterias). Los segundos, a su vez, son secuencias de ADN móvil que pueden integrar un cromosoma bacteriano o un plásmido. La resistencia también puede adquirirse como consecuencia a la exposición de los microorganismos durante un tiempo a la acción de antibióticos u otros quimioterápicos. La presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en los últimos años ha multiplicado la aparición de muchos mecanismos de resistencia:

producción de enzimas inactivantes, mutación de lugares de acción o dianas moleculares, sobreexpresión de bombas de eflujo, etc. (Avendaño López 2018))

Una cualidad por la que las bacterias pueden producir resistencias es mediante la formación de biofilms. Los biofilms están constituidos por bacterias encapsuladas en una matriz auto producida que se adhiere a superficies inertes (catéteres intravasculares, prótesis articulares y cardiacas, piedras de río, etc.) que les permite sobrevivir en circunstancias poco favorables. El mecanismo que regula la formación, crecimiento, maduración y dispersión del biofilm se basa en la activación e inactivación de genes o grupos de genes, y a pesar de que su estudio ha cobrado un gran interés en los últimos años, su mecanismo íntimo no ha sido completamente dilucidado (Solano C et al, 2014).

Sin embargo, cada una tiene mayor relevancia una característica bacteriana que comparten tanto las bacterias incluidas en un biofilm, como bacterias resistentes, que se ha denominado persistencia. Esto explica la aparición de infecciones y que, a pesar de tratamiento adecuado, según parámetros de sensibilidad y resistencia *in vitro*, no seamos capaces de erradicar la infección, tornándose en una situación crónica, sin que seamos capaces de detectar la aparición de resistencias bacterianas al antibiótico/s empleado/s, es decir, a pesar de continuar presentando sensibilidad *in vitro*, *in vivo* se comportan como resistentes (Lewis K. 2008).

El creciente aumento de las resistencias bacterianas se ha convertido últimamente en uno de los principales caballos de batalla de la medicina actual. En el año 2009

Boucher et al, desde América, determinaron cuáles eran las bacterias multirresistentes más predominantes entre los pacientes infectados, creando el acrónimo ESKAPE, que corresponde a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* especies para facilitar el recuerdo de éstas y, establecer las medidas más adecuadas para luchar contra ellas (Boucher HW et al, 2009). Además, ya se hacía hincapié sobre la falta de antibioterapia para el control de los mismos. A pesar de estos intentos para dar a conocer el problema, y las diferentes campañas que se han realizado a lo largo de todo el mundo, la realidad es que las infecciones por microorganismos resistentes son responsables directos de 700.000 muertes anuales (O'Neill J, 2014), estimándose que, de no invertirse la tendencia actual de infección y resistencia, esta cifra podría alcanzar los 10 millones en 2010 (O'Neill J, 2016).

Somos conscientes que la propia infección influye en la mortalidad, por eso cuando se señala que las resistencias bacterianas son causa de mortalidad se está realizando ya el ajuste por la mortalidad propia de las distintas infecciones. Si a estas infecciones se añaden comorbilidades como, por ejemplo, la existencia de un proceso oncológico (Bird 2012), o la estancia en UCI (Bilinski 2016, Moureau 2018, Sadowska 2018), la situación empeora considerablemente.

Además, el problema de la resistencia de los microorganismos no estriba solo en el aumento de mortalidad y morbilidad, sino que también, conlleva un aumento de costes sanitarios. Lautenbach publicó en 2010 un estudio en la existencia de

infecciones por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de enzimas de multirresistencia se asociaba a un coste 1,7 veces superior al de pacientes con infecciones por estas bacterias, sin mecanismos de resistencia, una vez descartada la existencia de factores de confusión (misma gravedad, localización de la infección, comorbilidades etc.). Otros autores cifran en 334\$ la diferencia en costes (Lautenbach et al, 2010). La importancia que estas infecciones tienen en la actualidad, según informes del Banco Mundial publicados en 2016 y 2017, se calcula que este problema es responsable de una caída del PIB mundial de al menos un 1,1% (KPMG LLP, 2014)

Por todos estos datos, la Organización mundial de la salud realizó en 2017 un listado con los microorganismos patógenos prioritarios en las resistencias antimicrobianas (RAM), que incluye las 12 familias de bacterias más virulentas para la salud del ser humano y, lanzó una llamada de atención para incentivar el desarrollo de nuevos antibióticos (http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1). Estas bacterias están encuadradas en tres categorías: crítica, elevada o media.

Prioridad 1: CRÍTICA

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: ELEVADA

- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina

- *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
- *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

El paulatino aumento en la incidencia de infecciones por microorganismos resistentes tiene dos consecuencias importantes: el aumento de una terapia empírica errónea, y un mayor consumo de antibióticos de amplio espectro. La disminución en el descubrimiento de nuevos antibióticos para el tratamiento que nos permita continuar con la escalada terapéutica tiene como consecuencia el redescubrimiento de antibióticos antiguos que habían caído en el desuso por la existencia de efectos secundarios o poca eficacia clínica debida, como hemos comentado con anterioridad, a un desconocimiento de sus propiedades PK/PD.

Se necesitan urgentemente estrategias que estimulen y financien procesos coordinados para un nuevo desarrollo, en particular con respecto a las relaciones exposición-respuesta, para establecer los regímenes de dosificación adecuados y determinar sus indicaciones terapéuticas reales.

Los nuevos conocimientos deben integrarse en los marcos normativos, y las recomendaciones de tratamiento actualizadas deben ser introducidas en la práctica clínica para que los agentes antiguos se relacionen con los desafíos actuales.

2.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad existe un enorme desarrollo de la medicina que ha posibilitado una mejora sustancial en la calidad de vida del ser humano y aumentar la esperanza de vida media. Entre los avances que han hecho posible esta mejoría se encuentran los dispositivos implantables (prótesis, catéteres, marcapasos, etc). Sin embargo, su utilización cada vez más generalizada ha conllevado un aumento de las infecciones asociadas a su empleo que poseen una enorme morbilidad y una no despreciable mortalidad. La existencia de una multitud de antimicrobianos activos frente a las bacterias causantes de estas infecciones hizo que se interpretase erróneamente su importancia y, desgraciadamente, su utilización desmesurada se tradujo en un aumento paralelo de las resistencias bacterianas a estos antimicrobianos.

Los antimicrobianos son fármacos de indicación estricta por parte de los médicos pero que, en muchas ocasiones, se prescriben sin conocer sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, lo que junto a las características propias de las bacterias y del tipo de infección, ha dado lugar a la existencia de gérmenes multirresistentes, extremadamente resistentes y, en algunos casos, panresistentes a los antimicrobianos.

En la actualidad el desarrollo de nuevos antimicrobianos ha disminuido de forma alarmante, por lo que, durante los próximos años, la única manera de luchar contra estas bacterias sería la optimización del uso de los antimicrobianos disponibles en estos momentos, algunos de los cuales poseen una “vida laboral” de más de cincuenta años. Dicha optimización sólo se puede conseguir mediante el estudio de sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas en animales de experimentación (*in vivo*), o en modelos *in vitro*.

3.- HIPÓTESIS

En consecuencia, nuestra hipótesis plantea demostrar que los estudios in-vitro proporcionan un escenario idóneo para nuevas estrategias y regímenes de tratamiento antimicrobiano que permitirán optimizar el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes.

Para abordar esta hipótesis, se han establecido los siguientes objetivos:

- Identificación de regímenes terapéuticos alternativos en el tratamiento de las infecciones de gérmenes multirresistentes, dado que estos son causantes de infecciones muy graves en pacientes especialmente vulnerables, como son aquellos críticamente enfermos, conllevando una gran mortalidad.
- Diseñar estudios PK-PD In vitro orientados a la optimización de los regímenes antibióticos ya existentes de tratamiento de esas infecciones
- Establecer la relación entre los estudios PK-PD y la eficacia, o ausencia de eficacia, de los regímenes antimicrobianos alternativos basados en los mismos.

4-. ARTÍCULOS

4.1 Artículo 1

J Córdoba, M. Coronado-Álvarez, D. Parra, J. Parra Ruiz. In Vitro Activities of Novel Antimicrobial Combinations against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents of Chemotherapy* 2015; 59:7316-19

OBJETIVO

Evaluar la actividad en un modelo simulado de farmacocinética humana la actividad de combinaciones novedosas frente a cepas de *A. baumannii* con múltiples mecanismos de resistencia.

MÉTODOS

- Se emplearon tres cepas no relacionadas de *A. baumannii* extremadamente resistente (XDR) obtenidas de muestras de sangre de pacientes de dos hospitales distintos.
- Antibióticos: se utilizaron monoterapias de colistina, daptomicina, ertapenem e imipenem, y la combinación de colistina con cada uno de los otros antibióticos.
- Modelos PK/PD: se utilizaron modelos in-vitro que simulan las condiciones existentes en el organismo durante una bacteriemia. Se obtuvieron muestras para el análisis de viabilidad bacteriana a las 0,1,2,4,8 y 24 horas. Las muestras obtenidas, tras ser debidamente procesadas se sembraron en medios de cultivo e incubadas durante 24 horas previo a su lectura.

- Las dosis de los antibióticos y la velocidad de infusión del medio de cultivo líquido se calcularon para simular las concentraciones séricas de los antibióticos empleados.
- El estudio estadístico se basó en la comparación de los resultados mediante el test ANOVA.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- La combinación daptomicina-colistina demostró ser la única con actividad bactericida frente a *A. baumannii* XDR analizadas
- La colistina fue el único antibiótico en monoterapia que produjo una reducción en el inóculo de *A. baumannii* XDR, si bien con recrecimiento posterior
- La combinación imipenem-colistina, si bien consiguió una reducción inicial del inóculo de *A. baumannii* XDR, se siguió de un recrecimiento bacteriano con aparición de formas de resistencia

Los resultados nos permitieron concluir que, ante infecciones por cepas de *A. baumannii* XDR, la combinación daptomicina-colistina podría ser eficaz en el tratamiento y ser añadida a los escasos regímenes existentes.

In Vitro Activities of Novel Antimicrobial Combinations against Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

J. Córdoba,^a N. M. Coronado-Álvarez,^a D. Parra,^a J. Parra-Ruiz^{a,b}

Laboratorio de Investigación Antimicrobiana^a and Servicio de Enfermedades Infecciosas,^b Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Extensively drug-resistant (XDR) *Acinetobacter* spp. have emerged as a cause of nosocomial infections, especially under conditions of intensive care. Unfortunately, resistance to colistin is increasing and there is a need for new therapeutic options. We aimed to study the effect of some novel combinations against XDR *Acinetobacter baumannii* in an *in vitro* pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) model. Three nonrelated clinical strains of XDR *A. baumannii* were investigated. Antibiotic-simulated regimens were colistin at 3 MU every 8 h (q8h) (first dose, 6 MU), daptomycin at 10 mg/kg of body weight q24h, imipenem at 1 g q8h, and ertapenem at 1 g q24h. Combination regimens included colistin plus daptomycin, colistin plus imipenem, and imipenem plus ertapenem. Samples were obtained at 0, 1, 2, 4, 8, and 24 h. Among the single-agent regimens, only the colistin regimen resulted in significant reductions in log₁₀ CFU per milliliter compared to the control for all the strains tested. Although colistin achieved bactericidal activity at 4 h, it was not able to reach the limit of detection (1 log₁₀ CFU/ml). One strain had significant regrowth at 24 h without the emergence of resistance. Daptomycin-colistin combinations led to a significant reduction in levels of log₁₀ CFU per milliliter that were better than those achieved with colistin as a single-agent regimen, reaching the limit of detection at 24 h against all the strains. The combination of imipenem plus ertapenem outperformed the colistin regimen, although the results did not reach the limit of detection, with significant regrowth at 24 h. Similarly, colistin-plus-imipenem combinations reduced the levels of log₁₀ CFU per milliliter at 8 h, with significant regrowth at 24 h but with development of resistance to colistin. We have shown some potentially useful alternatives for the treatment of extensively drug-resistant *A. baumannii*. Among them, the daptomycin-colistin combination was the most effective and should be investigated in future studies.

Many Gram-negative rods display significant antimicrobial resistance. Among them, *Acinetobacter baumannii* deserves special consideration. Currently, carbapenem-resistant *A. baumannii* is included in the Infectious Diseases Society of America (IDSA) list of nosocomial pathogens of particular concern (1).

Therapeutic options for this pathogen are extremely limited, a situation made worse by the drying up of the pharmaceutical development pipeline for anti-infective agents. This has forced clinicians to return to older, previously discarded drugs, such as the polymyxins and tigecycline (despite controversies regarding its efficacy), or to drug combinations. However, their efficacy is limited because of resistance or heteroresistance to colistin, drug-drug interactions, or severe side effects such as renal failure (2).

Some authors have reported the efficacy of novel combinations, including daptomycin combinations, against multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* strains (3, 4).

The exact mechanisms involved in this synergistic combination are not fully understood. Daptomycin-colistin combinations have shown an absence of activity against other multidrug-resistant Gram-negative rods but have displayed significant activity against *A. baumannii* (4).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates. We used three nonrelated extensively drug-resistant (XDR) isolates of *Acinetobacter baumannii* (5). The strains were obtained from blood samples from two different hospitals.

All isolates were susceptible only to colistin and tigecycline.

Antibiotics and media. Colistin sulfate (COL), daptomycin (DAP), ertapenem (ERT), and imipenem (IMI) were purchased from Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain (colistin), Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland (daptomycin), and MSD, Madrid, Spain (ertapenem and imipenem).

Mueller-Hinton broth supplemented with 25 mg/liter calcium and 12.5 mg/liter magnesium (SMHB; Difco Laboratories, Spain) was used for all susceptibility testing and *in vitro* pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) experiments. For experiments using daptomycin, SMHB was supplemented with 50 mg/liter calcium and 25 mg/liter magnesium as recommended by the CLSI guidelines (6).

Antibiotic concentrations were measured by high-performance liquid chromatography following previously published methods (7–9).

In vitro PK/PD model. A previously described *in vitro* PK/PD model consisting of a 250-ml one-compartment glass chamber with multiple ports for delivery and removal of medium, delivery of antibiotics, and collection of bacterial and antimicrobial samples was used (10, 11). The model was set with a targeted initial bacterial inoculum of ~10⁸ CFU/ml.

Antibiotics were administered as boluses into the central compartment via an injection port. Peristaltic pumps supplying fresh media were set to simulate antibiotic half-lives ($t_{1/2}$).

Samples (1 ml of media) were obtained at 0, 1, 2, 4, 8, and 24 h and applied to tryptic soy agar (TSA) plates using drop plating. Plates were read after 24 h of incubation at 35°C. For all samples, antimicrobial carryover was accounted for by serial dilution of the plated samples or by vacuum filtration if the drug level of the anticipated dilution was near the

Received 1 March 2015 Returned for modification 12 April 2015

Accepted 7 September 2015

Accepted manuscript posted online 14 September 2015

Citation Córdoba J, Coronado-Álvarez NM, Parra D, Parra-Ruiz J. 2015. *In vitro* activities of novel antimicrobial combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 59:7316–7319. doi:10.1128/AAC.00493-15.

Address correspondence to J. Parra-Ruiz, arrapj@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 MIC of antimicrobial agents

Antimicrobial agent	MIC (mg/liter) for strain:		
	AJ001	AJ002	AJ003
Colistin	2	2	4
Daptomycin	256	256	256
Imipenem	32	64	32
Ertapenem	64	128	64
Tigecycline	1	1	1

MIC value for the organism. The limit of detection of these methods of colony count determination was $2 \log_{10}$ CFU/ml (extended to $1 \log_{10}$ CFU/ml by vacuum filtration).

Bactericidal activity was defined as $>3 \log_{10}$ CFU/ml kill from the initial inoculum.

Emergence of resistance was evaluated by performing susceptibility testing of colonies recovered at 24 h according to CLSI guidelines (6).

Experiments were performed in duplicate to account for biological variability.

Simulated antibiotic regimens. For colistin, the regimen consisted of a 6-MU loading dose (maximum concentration of free, unbound drug in serum [fC_{max}], 4.5 mg/liter; $t_{1/2}$, 4 h; protein binding, 50%) followed by 3 MU administered every 8 h (q8h) (fC_{max} , 3 mg/liter) (12); for daptomycin, the regimen consisted of 10 mg/kg of body weight q24h (fC_{max} , 11.3 mg/liter; $t_{1/2}$, 8 h; protein binding, 92%) (13); for ertapenem, the regimen consisted of 1 g q24h (fC_{max} , 7.75 mg/liter; $t_{1/2}$, 4 h; protein binding, 95%) (14); and for imipenem, the regimen consisted of 1 g q8h (fC_{max} , 80 mg/liter; $t_{1/2}$, 1 h; protein binding, 20%) (15).

Statistical analysis. Changes in bacterial CFU counts per milliliter were compared by analysis of variance (ANOVA) and Turkey's *post hoc* test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Susceptibilities of the isolates are displayed in Table 1. Observed PK parameters were within 15% of the targeted values.

The daptomycin-colistin combination demonstrated bactericidal activity against all three clinical isolates of XDR *A. baumannii* evaluated (Fig. 1), reaching the limit of detection at 24 h. No other combination therapy reached the limit of detection.

Colistin was the only single-agent regimen that was able to produce a significant reduction in the bacterial count, reaching a bactericidal effect against all isolates at 4 h; however, there was regrowth in all three isolates at 24 h, without emergence of resistance. Despite regrowth at 24 h, colistin produced a significant reduction of the bacterial count compared to controls against all three strains ($P = 0.012$).

The imipenem regimen led to a small reduction of the bacterial count at 2 h, followed by bacterial regrowth. At 24 h, there were no statistically significant differences between the results seen with imipenem, ertapenem, and daptomycin used as single-agent regimens and control results.

Imipenem-colistin and imipenem-ertapenem combinations outperformed colistin as a single-agent regimen and demonstrated a bactericidal effect at 4 h, although there was significant regrowth at 24 h. The imipenem-colistin combination led to the emergence of resistance to colistin.

DISCUSSION

Using this *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model of bacteremia, we have shown the efficacy of the daptomycin-colistin combination against three nonrelated strains of extensively drug-

resistant *Acinetobacter baumannii*. Daptomycin-colistin combinations outperformed colistin as a single-agent regimen and colistin-imipenem combinations.

Extensively drug-resistant *A. baumannii* has become a serious problem worldwide. Limited antibiotic options and high severity of disease in patients suffering from XDR *A. baumannii* infections account for the high rates of mortality described.

Although other authors have reported the efficacy of colistin-daptomycin combinations against MDR *A. baumannii* strains, they used different methodologies, mainly time-kill curves and checkerboard assays (3) or the Etest agar dilution method (4). We used an *in vitro* PK/PD model that resembles human pharmacokinetics and mimics *A. baumannii* bacteremia.

Other combinations of anti-Gram-positive agents with colistin against *A. baumannii* have been studied. Significantly enhanced *in vitro* killing activity has been described with vancomycin (16), teicoplanin (17), and telavancin (18). Similarly, glycopeptide-colistin combinations have been studied *in vivo* with promising results (19). Very recently, Petrosillo et al. reported the efficacy of glycopeptide-colistin combinations in intensive care unit (ICU) patients infected with multidrug-resistant Gram-negative microorganisms (60% *A. baumannii*). Patients who received glycopeptide-colistin combinations had an increased chance of survival (20). However, renal failure was more frequent among patients who received combined therapy with glycopeptides, limiting its utility.

Daptomycin has no renal toxicity (21), and it can attenuate the nephrotoxicity of other antimicrobials (22), so the daptomycin-colistin combination is not expected to increase renal toxicity as described with glycopeptide-colistin combinations, making this combination an attractive option in cases of XDR *A. baumannii* infection.

Colistin is thought to increase the permeability of the Gram-negative outer membrane, rendering Gram-negative bacteria susceptible to antimicrobials which otherwise would have no effect against them. Although this mechanism of action could explain the enhanced activity of vancomycin, teicoplanin, or rifampin combinations (16, 23), it does not fully explain the effect of the daptomycin-colistin combination against *A. baumannii*.

Phee et al. (4) reported that the daptomycin-colistin combination had no effect against colistin-susceptible strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, or *Pseudomonas aeruginosa* but demonstrated high efficacy against all colistin-susceptible strains of *A. baumannii*. These results are consistent with data published previously where a mutant strain of *E. coli* that lacked the outer membrane (*E. coli imp*) was fully susceptible to vancomycin (24) whereas the strain remained fully resistant to daptomycin and its derivatives (25). It has been suggested that daptomycin, after binding into cell membrane, induces alterations in the operon encoding YycFG, a two-component system present only in Gram-positive organisms and involved in controlling the cytoplasmic membrane integrity, leading to rapid cell death without lysis (26, 27). This proposed mechanism of action might explain daptomycin's absence of activity against Gram-negative bacteria. However, the high activity displayed against *A. baumannii* but not against many other Gram-negative bacterial species suggests the presence of striking differences between *A. baumannii* and other Gram-negative bacteria that should be further studied.

We have also explored other combinations, such as imipenem-

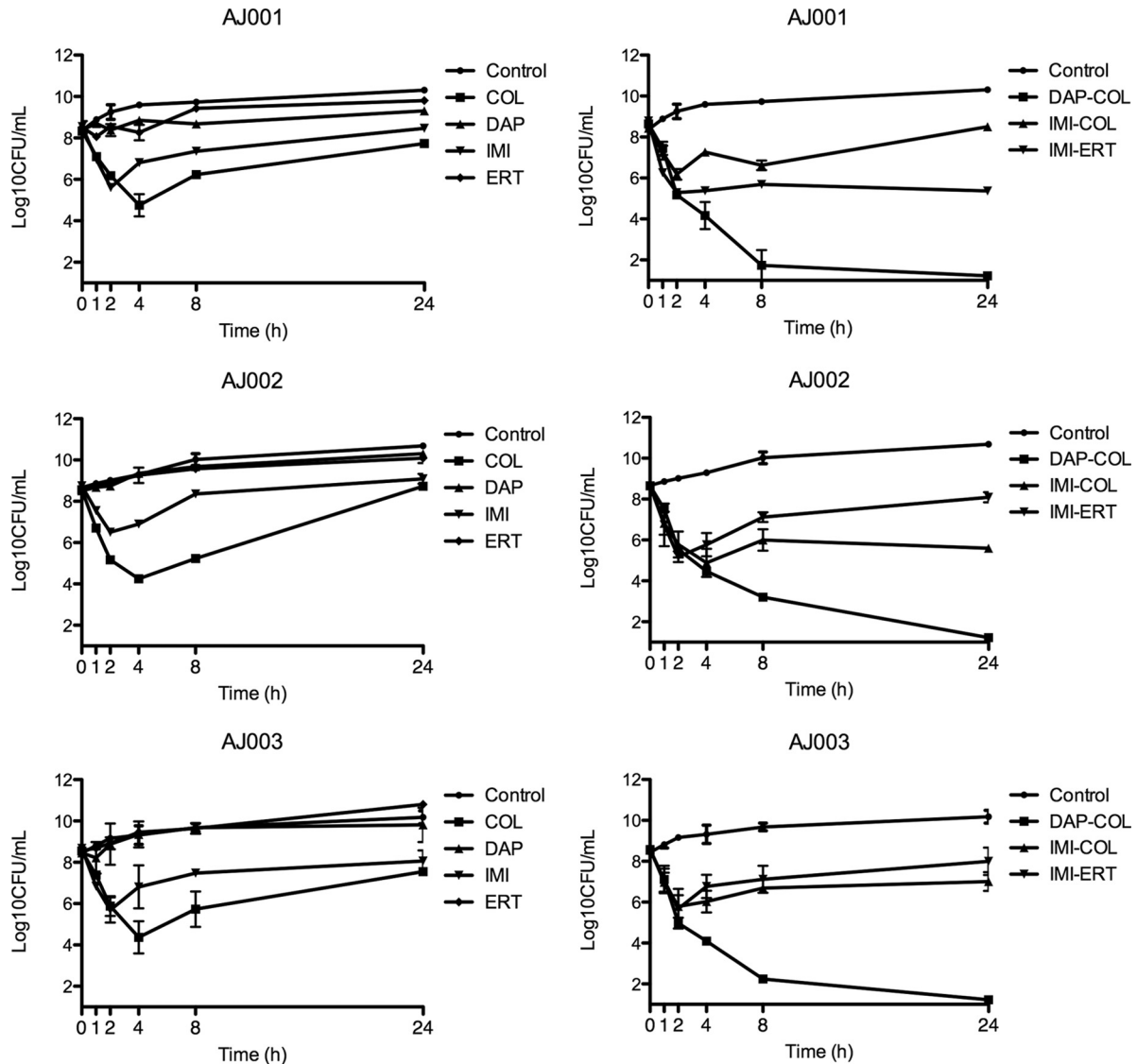


FIG 1 Activity of different single-agent regimens and combination regimens against three nonrelated strains of extensively drug-resistant *A. baumannii*. Symbols represent the mean numbers of viable colonies at each time interval. COL, colistin; DAP, daptomycin; IMI, imipenem; ERT, ertapenem.

colistin or double-carbapenem combinations, that have proven to be synergistic against other MDR Gram-negative organisms (28, 29). However, we did not find any activity with the ertapenem-imipenem combination and found limited efficacy of imipenem-colistin combinations. Interestingly, the imipenem-colistin combination led to the emergence of colistin resistance, but administration of colistin as a single-agent regimen did not result in colistin resistance. We do not have an explanation for this, but our results suggest that there might be some kind of interaction with imipenem and colistin.

Our work has some limitations. First, we tested only three strains of *A. baumannii*, so our results may not be generalizable to all strains; however, the consistency of the results against all three strains, and the fact that we used three unrelated strains, makes us believe that our results can be generalized. Second, our model ran for only 24 h and thus would not detect antimicrobial activity that might appear after 24 h or mechanisms of resistance. We also have

to admit that the high inoculum we used might have impaired the activity of imipenem. However, recent data from studies using the colistin-carbapenem combination did not show differences at low ($< \sim 10^8$ CFU/ml) or high ($\sim 10^{11}$ CFU/ml) bacterial density (30).

Finally, we acknowledge that *in vitro* studies do not always translate into similar results in clinical practice, so caution has to be advised prior to use. However, similar results have been reported with three other methodologies (3, 4), giving robustness to our results.

In the present situation of almost no therapeutic option against some strains of XDR *A. baumannii*, we believe that our results represent a novel strategy to add to the limited options against XDR *A. baumannii*.

ACKNOWLEDGMENT

We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12. <http://dx.doi.org/10.1086/595011>.
- Bergen PJ, Li J, Nation RL. 2011. Dosing of colistin-back to basic PK/PD. *Curr Opin Pharmacol* 11:464–469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.004>.
- Galani I, Orlandou K, Moraitou H, Petrikos G, Souli M. 2014. Colistin/daptomycin: an unconventional antimicrobial combination synergistic in vitro against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 43:370–374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.12.010>.
- Phee L, Hornsey M, Wareham DW. 2013. In vitro activity of daptomycin in combination with low-dose colistin against a diverse collection of Gram-negative bacterial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:1291–1294. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1875-z>.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8th ed. CLSI, Wayne, PA.
- He H, Li JC, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, Tsuji BT, Thompson PE, Roberts K, Velkov T, Li J. 2013. Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *J Antimicrob Chemother* 68:2311–2317. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt207>.
- Polillo M, Tascini C, Lastella M, Malacarne P, Ciofi L, Viaggi B, Bocchi G, Menichetti F, Danesi R, Del Tacca M, Di Paolo A. 2010. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma. *Ther Drug Monit* 32:200–205. <http://dx.doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181d3f5cb>.
- Dailly E, Bouquie R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R. 2011. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879:1137–1142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.038>.
- Steed ME, Vidaillac C, Rose WE, Winterfield P, Kaatz GW, Rybak MJ. 2011. Characterizing vancomycin-resistant *Enterococcus* strains with various mechanisms of daptomycin resistance developed in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4748–4754. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00084-11>.
- Vidaillac C, Parra-Ruiz J, Winterfield P, Rybak MJ. 2011. In vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic activity of NXL103 versus clindamycin and linezolid against clinical *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 38:301–306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.04.023>.
- Bergen PJ, Li J, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW. 2008. Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* 61:636–642. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm511>.
- Parra-Ruiz J, Bravo-Molina A, Pena-Monje A, Hernandez-Quero J. 2012. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Antimicrob Chemother* 67:2682–2685. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks272>.
- Congeni BL. 2010. Ertapenem. *Expert Opin Pharmacother* 11:669–672. <http://dx.doi.org/10.1517/14656561003631397>.
- Breilh D, Texier-Maugein J, Allaouchiche B, Saux MC, Boselli E. 2013. Carbapenems. *J Chemother* 25:1–17. <http://dx.doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000032>.
- Gordon NC, Png K, Wareham DW. 2010. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:5316–5322. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00922-10>.
- Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. 2011. In vitro activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 66:1047–1051. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr069>.
- Hornsey M, Phee L, Longshaw C, Wareham DW. 2013. In vivo efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Int J Antimicrob Agents* 41:285–287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.013>.
- Hornsey M, Wareham DW. 2011. In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3534–3537. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00230-11>.
- Petrosillo N, Giannella M, Antonelli M, Antonini M, Barsic B, Belancic L, Inkaya AC, De Pascale G, Grilli E, Tumbarello M, Akova M. 2014. Clinical experience of colistin-glycopeptide combination in critically ill patients infected with Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 58:851–858. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00871-13>.
- Kullar R, McClellan I, Geriak M, Sakoulas G. 2014. Efficacy and safety of daptomycin in patients with renal impairment: a multicenter retrospective analysis. *Pharmacotherapy* 34:582–589. <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1413>.
- Thibault N, Grenier L, Simard M, Bergeron MG, Beauchamp D. 1994. Attenuation by daptomycin of gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1027–1035. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.38.5.1027>.
- Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. 2006. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 27:224–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.10.012>.
- Eggert US, Ruiz N, Falcone BV, Branstrom AA, Goldman RC, Silhavy TJ, Kahne D. 2001. Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolipid derivatives of vancomycin. *Science* 294:361–364. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063611>.
- Nguyen KT, Ritz D, Gu JQ, Alexander D, Chu M, Miao V, Brian P, Baltz RH. 2006. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17462–17467. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608589103>.
- Baltz RH. 2009. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol* 13:144–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.031>.
- Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. 2013. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci* 1277:139–158. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06819.x>.
- Bergen PJ, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT, Sidjabat HE, Paterson DL, Li J, Nation RL. 2011. Clinically relevant plasma concentrations of colistin in combination with imipenem enhance pharmacodynamic activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5134–5142. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05028-11>.
- Oliva A, D'Abramo A, D'Agostino C, Iannetta M, Mascellino MT, Gallinelli C, Mastroianni CM, Vullo V. 2014. Synergistic activity and effectiveness of a double-carbapenem regimen in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother* 69:1718–1720. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku027>.
- Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, Bergen PJ, Nation RL, Li J, Tsuji BT. 2015. Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. *J Antimicrob Chemother* 70:1434–1442. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku567>.

4.2 Artículo 2

D. Parra, A. Peña-Monje, NM. Coronado-Álvarez, J. Hernández-Quero, J Parra-Ruiz. In Vitro efficacy of daptomycin and teicoplanin combined with ethanol, clarithromycin or gentamicin as catheter lock solutions. BMC Microbiology 2015; 15:245

OBJETIVO

Evaluar la eficacia de diferentes soluciones que contienen antibióticos en un modelo *in-vitro* de infecciones relacionadas con catéter.

MÉTODOS

- Se utilizaron cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM) obtenidas de pacientes con infección por catéter probada por este microorganismo.
- Se utilizaron como antibióticos daptomicina y vancomicina en combinación con claritromicina, etanol o gentamicina. La susceptibilidad de las cepas fue realizada mediante e-test
- Para la confección del modelo *in-vitro* se emplearon catéteres Introcan Safety® 14 G que fueron inoculados con una suspensión de cada una de las cepas de SERM e incubados durante 24h. Una vez producida la infección, los catéteres se sellaron con la solución antibiótica 24 h a 35°C.
- Tras cada periodo de 24h, algunos catéteres se procesaron para valorar la viabilidad bacteriana tras haber sido expuestas a los distintos regímenes antibióticos.

- Tras la finalización del sellado antibiótico, algunos catéteres se reincubaron con una solución rica en glucosa para valorar la persistencia de biofilm.
- El estudio estadístico se basó en la comparación de los resultados mediante el test ANOVA

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- Todas las combinaciones demostraron un descenso en la población de bacterias y, daptomicina demostró ser mejor que teicoplanina en monoterapia.
- La combinación de daptomicina con etanol o claritromicina demostró ser la más eficaz en la reducción del recuento bacteriano y, además, fue capaz de erradicar el biofilm al prevenir la recurrencia de la infección.
- No encontramos aparición de resistencias frente a ninguna de las combinaciones utilizadas.

Los resultados nos permitieron concluir la eficacia de las combinaciones de daptomicina con etanol o con claritromicina en el sellado de catéteres infectados por cepas de SERM, dado que fueron capaces de eliminar la infección aguda y prevenir la recurrencia.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



In vitro efficacy of daptomycin and teicoplanin combined with ethanol, clarithromycin or gentamicin as catheter lock solutions

Diego Parra¹, Alejandro Peña-Monje², Nieves María Coronado-Álvarez¹, José Hernández-Quero^{1,3} and Jorge Parra-Ruiz^{1,3*}

Abstract

Background: Despite widespread use, optimum choice of antimicrobial agents, concentrations, combinations and exposure times have not been determined for antibiotic lock technique (ALT). Our objective was to evaluate the efficacy of different antibiotic combinations using an in vitro model of catheter-related infection. Daptomycin (DAP) 5 mg/mL, teicoplanin (TEC) 5 mg/mL, both alone and combined with gentamicin (GM) 2.5 mg/mL, clarythromycin (CLA) 5 mg/mL or ethanol 35 % were evaluated against four clinical strains of methicillin resistant coagulase negative staphylococci. Lock solutions were renewed every 24 h.

Results: After 72 h catheters were reincubated with culture media to investigate bacterial regrowth. All antibiotic combinations resulted in significant reductions ($p < 0.05$) of Log(10) cfu/mL at 72 h for both organisms compared with controls. DAP resulted in significant reductions of Log(10) for all organism versus TEC ($p = 0.001$). Only DAP reached the limit of detection at 72 h, however did not prevent regrowth after 24 h of ALT removal. DAP + Ethanol and TEC + ethanol eradicated biofilm at 72 h, but only DAP + ethanol (against all strains) and DAP + CLA (against two strains) prevented regrowth at 24 h after ALT removal.

Conclusions: Based on these data, ALT with DAP + ethanol and DAP + CLA should be explored in clinical trials.

Keywords: Biofilm, Central line associated bloodstream infections, Antibiotic lock therapy

Background

Recent reports indicate that central line associated bloodstream infections (CLA-BSIs) are responsible of considerable burden of illness in many countries, with a pooled prevalence of 4,9 per 1000 central line days in ICUs from Latin America, Asia, Africa and Europe [1]. Many microorganisms can develop biofilms on central venous catheters And therefore be responsible of central line associated bloodstream infections (CLA-BSIs),

although the most commonly isolated microorganism from hospital-acquired central line associated bloodstream infections (CLA-BSIs), accounting for almost 35 % of cases, are coagulase-negative staphylococci (CoNS) [2]. Among CoNS, *Staphylococcus epidermidis* (SE) is responsible of a great number of those infections [3]. Pathogenesis of CLA-BSIs has been extensively reviewed; intraluminal or extraluminal surface colonization of catheters, subsequent biofilm formation, dispersal and entry into the bloodstream are the classical steps described in CLA-BSIs development [4–6].

Current guidelines recommend removal of catheters in CLA-BSIs due to *S. aureus* however, antibiotic lock therapy (ALT) could be used in other staphylococcal CLA-BSIs provided sepsis, endocarditis, suppurative thrombophlebitis or other septic complications have been excluded

* Correspondence: arraj@gmail.com

¹Laboratorio de Investigación Antimicrobiana, Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, 18012 Granada, Spain

³Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Avda Dr. Olóriz 16, 18012 Granada, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

[7, 8]. During ALT the lumen is filled with a highly concentrated antibiotic solution and allowed to dwell (lock) for a period of time to eradicate bacteria embedded in the intraluminal biofilm of the catheter [4]. Since 1980s several authors have reported case series regarding efficacy of ALT against different microorganisms, and although there are some comprehensive reviews on this topic [9, 10], its utility is still a matter of debate. Recent efforts have been made to overcome this paucity of data, but apart from the need of randomized controlled trials no other conclusions have been obtained [11].

Similarly, experimental evidence for the selection of antimicrobials, alone or in combination is scarce and limited to a 24–48 h period without further evaluation of the persistence of biofilm, limiting the interpretation of results [12–17].

To overcome some of these limitations we compared daptomycin and teicoplanin alone, and in combination with clarithromycin, gentamicin and ethanol, using an in vitro catheter model that evaluates their activity in a catheter lock solution by quantifying antimicrobial kill after 72 h of catheter-lock therapy. Both drugs are antibacterial agents with documented efficacy as catheter lock solutions [12, 18–20]. In addition, to evaluate relapse of infection we allowed catheters to dwell without antibiotic for another 24 h, simulating clinical practice of reutilization of central line after ALT.

Results and discussion

Isolates were susceptible to daptomycin (MIC = 0.25 mg/L for all isolates) and to teicoplanin (MIC = 1 mg/L for 1022 and MIC = 2 mg/L for 1018, 1076, and 1098) and resistant to oxacillin (MIC > 1024 mg/L for all isolates), gentamicin (MIC > 32 mg/L for all isolates) and to clarithromycin (MIC > 128 mg/L for all isolates).

All antibiotic combinations resulted in significant reductions ($p < 0.05$) of $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ at 72 h compared with control. Among single-agent regimens, daptomycin resulted in significant reductions of $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ versus teicoplanin ($p = 0.001$) for all strains tested, however, neither daptomycin nor teicoplanin were able to reduce $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ below the limit of detection at 72 h, and full regrowth was observed after 24 h of ALT removal.

Regarding combinations, daptomycin plus ethanol or clarithromycin and teicoplanin plus ethanol or clarithromycin were able to eradicate biofilm at 72 h but only daptomycin plus ethanol against all strains and daptomycin plus clarithromycin against two strains prevented regrowth after ALT removal and reincubation with sterile fresh media (Table 1, Figs. 1, 2, 3 and 4).

Despite full regrowth of all CoNS after ALT removal no emergence of resistance was detected against any of the antibiotics tested.

In our study we found ethanol and clarithromycin combinations more efficacious than monotherapy with either daptomycin or teicoplanin. Although monotherapy reached the limit of detection at 72 h against some strains, only daptomycin plus ethanol or clarithromycin prevented regrowth after ALT discontinuation.

Main objective of ALT is catheter salvage, allowing for reutilization of the catheter after discontinuation of ALT. If complete eradication has not been achieved, bacterial regrowth and resurgence of clinical infection are likely to occur. In our study, in an attempt of mimicking clinical practice, we introduced a 24 h dwell period with fresh media after ALT removal.

Although many authors have reported eradication of microorganisms after ALT with daptomycin, vancomycin or linezolid, because relapse after ALT was not evaluated, their results cannot be extrapolated to clinical practice [12, 15, 21]. In our study, daptomycin alone (against one

Table 1 Mean bacterial count recovered from the in vitro catheter model at different time-points

Antimicrobial regimen	1018			1022			1076			1098		
	t = 0	t = 72	t = 96	t = 0	t = 72	t = 96	t = 0	t = 72	t = 96	t = 0	t = 72	t = 96
Control	8,017	9,02	8,97	7,92	8,67	9,02	7,82	8,45	8,83	7,83	9,12	9,16
Teicoplanin	8,02	4,45*	6,72	7,09	4,03*	6,57	7,04	3,94*	7,44	7,89	3,84*	6,32
Teicoplanin + gentamycin	8,03	5,12*	7,01	7,43	4,5*	6,59	7,52	3,22*	6,67	7,78	2,64*	5,29
Teicoplanin + ethanol	7,94	1*	4,45*	7,85	1*	2,3*	7,27	1*	3,43	7,93	1*	4,02*
Teicoplanin + clarithromycin	7,95	1,89*	4,23*	7,86	1,23*	4,32*	7,29	1*	3,04	7,82	1,78*	5,38
Daptomycin	8,24	2,87*, **	4,89*	7,33	1*, **	3,77*	7,32	2,54*	5,48	7,82	3,62*	5,92
Daptomycin + gentamycin	8,12	2,03*, **	5,67	7,51	3,69*	6,46	7,12	2,12*	4,92*	8,01	1,96*	5,01
Daptomycin + ethanol	7,98	1*	1*, **	7,79	1*	1*, **	7,027	1*	1*, **	8,01	1*	1*, **
Daptomycin + clarithromycin	8,34	1,45*	4,67*	7,95	1*	1*, **	7,57	1*	1*, **	7,83	1*	3,84*

Data expressed as $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$

T = 0: baseline. T = 72: end of antibiotic lock therapy. T = 96 h: after reincubation with sterile fresh media

* $p < 0.05$ versus control

** $p < 0.05$ vs teicoplanin (alone or in each combination compared against the same combination)

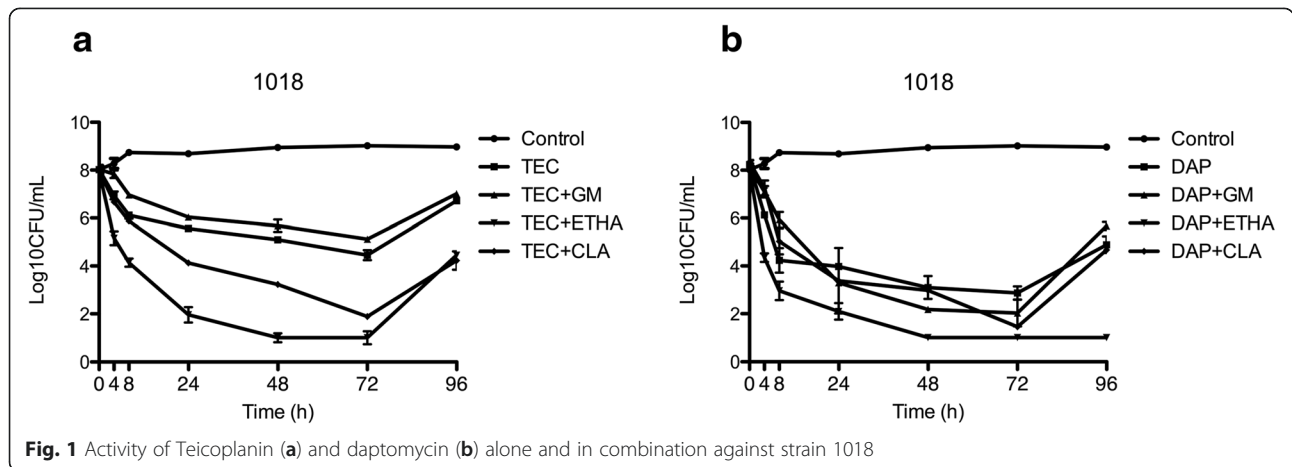


Fig. 1 Activity of Teicoplanin (a) and daptomycin (b) alone and in combination against strain 1018

strains) and some teicoplanin combinations achieved the limit of detection at 72 h but without complete eradication of biofilm. On the contrary, daptomycin plus clarithromycin (against two strains) and daptomycin plus ethanol (against all strains) maintained eradication after 24 h of ALT removal and re-incubation with fresh media, suggesting a potential role in salvage of infected catheters with a low rate of relapse.

A recent metanalysis support the use of ALT as adjunctive therapy in CLA-BSIs [11], however, a 20 % rate of relapse was observed in patients treated with ALT despite negative blood cultures drawn at the end of therapy. This high rate of relapse suggests the persistence of biofilm-embedded bacteria not detected immediately after end of therapy. Our results, negativization at 72 h, but regrowth after 24 h incubation with fresh media following ALT removal, corroborate what has been described, and might support the use of clarithromycin and ethanol combinations. Aumeran et al. reported the significant decrease of bacterial inoculum of MRSE in an

in vitro model of subcutaneous injection port infection using daptomycin, vancomycin or ethanol, with a significant regrowth after discontinuation of ALT, similar to what we found [22]. Although they used a different methodology, the similarity of our results suggest that our hypothesis is true and relapse of CLA-BSIs is related to biofilm persistence despite negative blood-cultures drawn from the catheter after ALT.

Chaudhury et al. reported the efficacy of ethanol at 20, 40 and 80 %, in an in vitro study of MRSA and MRSE biofilm-associated infection [23]. Ethanol at any of the concentrations tested was more efficacious than vancomycin, ciprofloxacin and gentamicin in their model of biofilm-associated infection. Similarly Qu et al. reported that lock therapy with ethanol at 40 % was more efficacious than oxacillin, gentamicin, vancomycin, ciprofloxacin and rifampicin, alone or in combination [24]. We tested ethanol at 40, 60 and 80 % and found a significant decrease in Log₁₀CFU/mL but without preventing regrowth after ALT discontinuation (data not shown). These

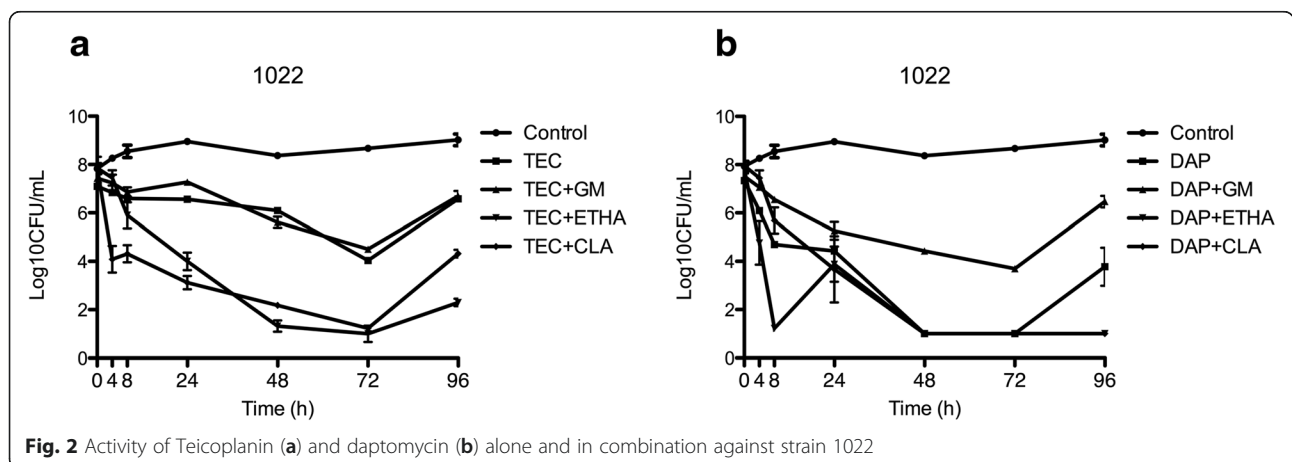
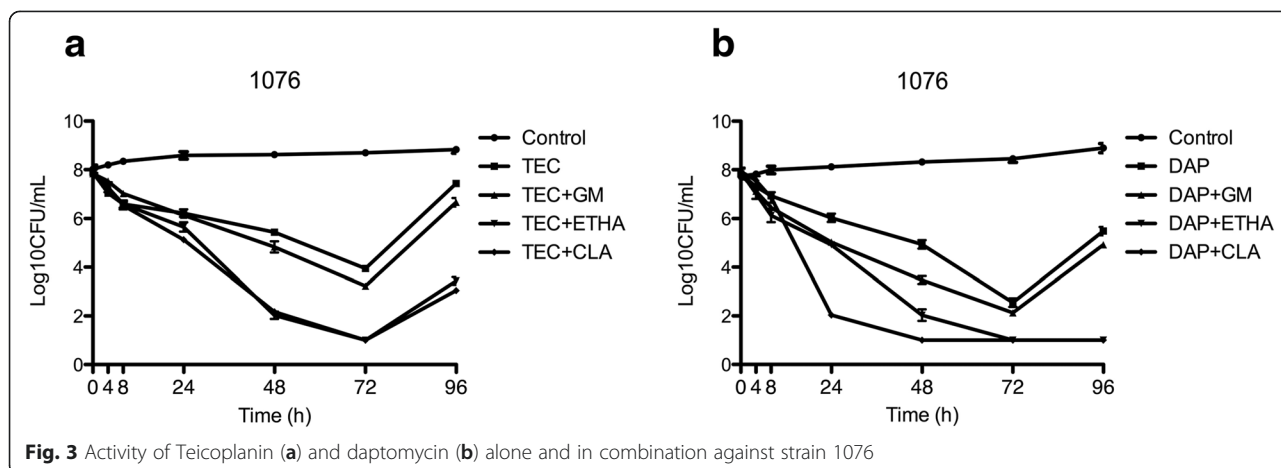


Fig. 2 Activity of Teicoplanin (a) and daptomycin (b) alone and in combination against strain 1022



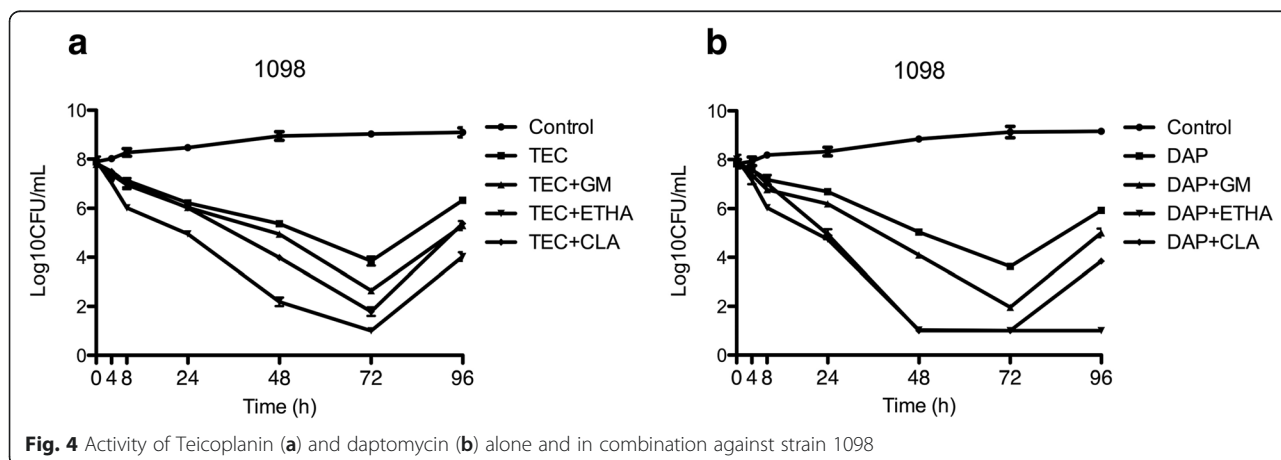
preliminary results, similar to those reported by Raad et al. [25] that reported the inability of ethanol alone to eradicate an in vitro model of MRSA biofilm or Aumeran et al. [22], prompted us to explore antibiotic-ethanol combinations.

Similarly to what Raad et al. reported [25] antibiotic-ethanol combinations were significantly better than monotherapies and prevented regrowth after reincubation. They found that only ethanol (25 %) plus minocycline (3 mg/mL) and triple combination of ethanol, minocycline and EDTA (30 mg/mL) were able to eradicate biofilm and prevent regrowth in a modified Robbins device. In this silicone disk biofilm colonization model, although ethanol plus minocycline performed better than single-regimen therapies and eradicated biofilm, only triple therapy was able to prevent regrowth. In our study, the in vitro model of catheter infection was different, however we obtained very similar results, suggesting that ethanol plus antibiotics could eradicate biofilm and prevent regrowth after antibiotic lock removal.

Finally, Clarithromycin has shown to interact with bacterial biofilms through a non-bactericidal or bacteriostatic

effect. It has been proven to inhibit the production of hexose, a basic component of staphylococcal biofilms [26]. Many authors have demonstrated this increased activity of clarithromycin combinations against staphylococcal biofilms despite no antibacterial activity of clarithromycin [27–30]. In this study, clarithromycin combinations outperformed single-regimen therapies. Daptomycin plus clarithromycin prevented regrowth of two strains, suggesting complete eradication of biofilm. On the other hand, Teicoplanin plus clarithromycin, although reduced the bacterial burden below the limit of detection, was not able to prevent regrowth, consistent with a reduced activity of teicoplanin against MRSE compared to that of daptomycin.

Our study has some limitations. Our protocol allowed for prolonged dwelling times, a situation that might limit its reproducibility in clinical practice. However, the fact that daptomycin plus ethanol and daptomycin plus clarithromycin (against two strain) were able to eradicate biofilm after only 72 h could avoid the need for this prolonged dwelling time. On the other hand, therapies longer than 3 days could improve our results. Second, we explored only four MRSE, so our results could not



be extrapolated to all CLA-BSIs, however, as previously commented, other authors have reported similar results with ethanol or clarithromycin combinations with different strains [24, 25, 28, 30] which make plausible that our results could be generalized to MRSE and maybe, against MRSA, although the latter should be taken with caution based on paramount differences between CoNs and *Staphylococcus aureus*. Third, we did not evaluate the biofilm forming capability of the MRSE strains. Although is true that biofilm forming ability is different among different strains, we have selected four strains isolated from catheters of patients with documented CLA-BSIs. This clinical aspect together with the high $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ recovered prior to any antibiotic challenge suggests high biofilm forming ability.

Finally we tried to simulate daily clinical practice, so we chose commercially available drug powders and IV solutions for human use to make antibiotic lock solutions instead of on analytical powder. Although most other studies have used analytical drugs powder and so, our results are not completely comparable, we believe that our results would have been the same with analytical powder and, what is more important, they are more reproducible in clinical practice. Finally, we relied on the absence of precipitation as an equivalent of drug-stability; although there can be loss of potency without physical changes, it is widely accepted that absence of precipitation is an equivalent of stability and lock solutions can be use if no physical changes are documented [31–33].

Conclusions

Our study provides strong evidence of the potential of daptomycin plus ethanol and daptomycin plus clarithromycin to eradicate biofilm and prevent regrowth after antibiotic lock removal. Although clinical trials should be performed, our results provide enough rationale supporting its use in antibiotic lock technique against MRSE.

Methods

Bacterial isolates

Four clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE); strains 1018, 1022, 1076, and 1098, recovered from catheters of patients with documented CLA-BSIs were selected from our collection.

Antibiotics and media

Daptomycin (Cubicin® Novartis Inc. Spain) was generously provided by the manufacturer. Teicoplanin (Targocid® Marion-Merrel S.A. Spain), clarithromycin (Klacid® Abbot Laboratories S.A.), and gentamicin (Normon S.A. Spain) were commercially purchased as drug powder (Teicoplanin and clarithromycin) or as 20 mg/mL IV solution (gentamicin). Ethanol was commercially purchased

as 70 % dilution (Lab. Reig Jofré. S.A. Spain). Drug powders were reconstituted following the CLSI guidelines [34].

Susceptibility testing was performed using e-test methodology but for DAP that was performed by microdilution following CLSI guidelines [34]. Mueller Hinton broth supplemented with 50 µg/ml calcium, and 12.5 µg/ml magnesium (SMHB) was used for susceptibility testing involving DAP.

Tryptic Soy Broth supplemented with 1 % glucose (TSBg) was used for biofilm growth.

To evaluate drug stability, each solution was incubated over 72 h, and then evaluated for physical compatibility by particulate formation, colour change, or gas evolution [31–33]. All drug-combinations maintained their initial conditions and were considered stable.

In vitro model

Test organisms in TSBg at a starting inoculum of $\sim 10^6$ CFU/mL were added to the lumen of an Introcath Safety® 14 Ga × 2 in. catheter (Braun Medical Inc. USA). Each device was sealed and incubated for 24 h at 35 °C. After incubation, TSBg was removed and sterile drug-containing syringes were inserted into access port of the catheter. Each regimen (sufficient to fill the access port and full catheter) was slowly injected into each access port lumen and incubated at 37 °C. Antibiotic lock solutions were exchanged every 24 h for 72 h. After 72 h, last antibiotic lock solution was changed and catheters were filled again with fresh TSBg and incubated for another 24 h to reproduce reutilization after ALT.

Catheters were removed at 0, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h. The lock solution was removed and whole catheters were placed in a sterile tube filled with 10 mL of saline, vortexed, sonicated and flushed thoroughly. The bacterial suspension was then diluted and drop-plated on Tryptic soy agar (TSA) for bacterial enumeration. The limit of detection of this method of colony count determination was 2 Log extended to 1 Log by vacuum filtration.

Bactericidal activity was defined as > 3 Log kill reduction from initial inoculum at any time point, and emergence of resistance was assessed by E-test method.

Experiments were performed in triplicate to account for biological variability. Results are expressed as mean Log_{10} reduction.

Lock solutions evaluated

Teicoplanin at 5 mg/mL and daptomycin at 5 mg/mL (diluted in ringer lactate), both alone and in combination with gentamicin at 2.5 mg/mL, clarithromycin at 5 mg/mL and ethanol at 35 % were compared. For combination regimens, final concentrations were tailored to be the same as for monotherapies. As daptomycin activity is calcium-dependent, gentamicin and clarithromycin were

diluted in ringer lactate when combined with daptomycin and calcium was added to ringer lactate when daptomycin was combined with ethanol, to maintain the same calcium concentration in every daptomycin lock solution. Phosphate buffered saline (PBS) was used as control.

Statistical analysis

Time to achieve 99.9 % kill ($T_{99.9}$) was determined by linear regression (if $r^2 \leq 0.95$) or visual inspection.

Changes in bacterial CFU/mL were compared by ANOVA with Tukey's post-hoc test. A p value < 0.05 was considered significant.

Abbreviations

ALT: Antibiotic lock technique; DAP: Daptomycin; TEC: Teicoplanin; GM: Gentamicin; CLA: Clarithromycin; CLA-BSIs: Central line bloodstream infections; CoNS: Coagulase negative staphylococci; MRSE: Methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*; CLSI: Clinical laboratory standard institute; TSBg: Tryptic soy broth supplemented with 1 % glucose; TSA: Tryptic soy agar; PBS: Phosphate buffered saline; CFU: Colony forming units; MIC: Minimum inhibitory concentration; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Competing interest

JPR has received honoraria, consultancy fees and funding research from Novartis, Pfizer, Bayer and Astellas. JHQ has received honorary and consultancy fees from Novartis, Pfizer and Bayer. DP, AP, and NMCA, nothing to declare.

Authors' contributions

DP and AP carried out the in vitro studies; NMCA carried out the in vitro studies and performed the statistical analysis; JHQ participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. JPR conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was not funded by external support.

Author details

¹Laboratorio de Investigación Antimicrobiana, Hospital Universitario San Cecilio, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, 18012 Granada, Spain. ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, 18012 Granada, Spain. ³Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Cecilio, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Avda Dr. Olóriz 16, 18012 Granada, Spain.

Received: 24 March 2015 Accepted: 23 October 2015

Published online: 30 October 2015

References

- Rosenthal VD, Maki DG, Mehta Y, Leblebicioglu H, Memish ZA, Al-Mousa HH, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007–2012. Device-associated module. *Am J Infect Control*. 2014;42(9):942–56.
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(11):996–1011.
- Strasheim W, Kock MM, Ueckermann V, Hoosien E, Dreyer AW, Ehlers MM. Surveillance of catheter-related infections: the supplementary role of the microbiology laboratory. *BMC Infect Dis*. 2015;15:5.
- Weber DJ, Rutala WA. Central line-associated bloodstream infections: prevention and management. *Infect Dis Clin North Am*. 2011;25(1):77–102.
- Doshi RK, Patel G, Mackay R, Wallach F. Healthcare-associated infections: epidemiology, prevention, and therapy. *Mt Sinai J Med*. 2009;76(1):84–94.
- Simon A, Bode U, Beutel K. Diagnosis and treatment of catheter-related infections in paediatric oncology: an update. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(7):606–20.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):1–45.
- O'Grady NP, Chertow DS. Managing bloodstream infections in patients who have short-term central venous catheters. *Cleve Clin J Med*. 2011;78(1):10–7.
- Fernandez-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(1):117–29.
- Lebeaux D, Fernandez-Hidalgo N, Chauhan A, Lee S, Ghigo JM, Almirante B, et al. Management of infections related to totally implantable venous-access ports: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(2):146–59.
- O'Horo JC, Silva GL, Safdar N. Anti-infective locks for treatment of central line-associated bloodstream infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Nephrol*. 2011;34(5):415–22.
- LaPlante KL, Mermel LA. In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(8):2239–46.
- Balestrino D, Souweine B, Charbonnel N, Lautrette A, Aumeran C, Traore O, et al. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(10):3204–9.
- Bookstaver PB, Williamson JC, Tucker BK, Raad II, Sherertz RJ. Activity of novel antibiotic lock solutions in a model against isolates of catheter-related bloodstream infections. *Ann Pharmacother*. 2009;43(2):210–9.
- Sherertz RJ, Boger MS, Collins CA, Mason L, Raad II. Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(5):1865–8.
- Van Praagh AD, Li T, Zhang S, Arya A, Chen L, Zhang XX, et al. Daptomycin antibiotic lock therapy in a rat model of staphylococcal central venous catheter biofilm infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4081–9.
- Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(5):1656–60.
- Oncu S, Sakarya S. Comparison of different doses of vancomycin and teicoplanin lock solutions in catheters colonized with *Staphylococcus epidermidis*: An in vitro, blinded, antibiotic lock study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2005;66(4):364–74.
- Del Pozo JL, Garcia Cenoz M, Hernaez S, Martinez A, Serrera A, Aguinaga A, et al. Effectiveness of teicoplanin versus vancomycin lock therapy in the treatment of port-related coagulase-negative staphylococci bacteraemia: a prospective case-series analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(5):482–5.
- Meije Y, Almirante B, Del Pozo JL, Martin MT, Fernandez-Hidalgo N, Shan A, et al. Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect*. 2014;68(6):548–52.
- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Orlando F, Mocchegiani F, Silvestri C, et al. Comparative efficacies of quinupristin-dalfopristin, linezolid, vancomycin, and ciprofloxacin in treatment, using the antibiotic-lock technique, of experimental catheter-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4042–5.
- Aumeran C, Guyot P, Boisnoir M, Robin-Hennequin C, Vidal M, Forestier C, et al. Activity of ethanol and daptomycin lock on biofilm generated by an in vitro dynamic model using real subcutaneous injection ports. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(2):199–206.
- Chaudhury A, Rangineni J, Venkatramana B. Catheter lock technique: in vitro efficacy of ethanol for eradication of methicillin-resistant staphylococcal biofilm compared with other agents. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012.
- Qu Y, Istivan TS, Daley AJ, Rouch DA, Deighton MA. Comparison of various antimicrobial agents as catheter lock solutions: preference for ethanol in eradication of coagulase-negative staphylococcal biofilms. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 4):442–50.
- Raad I, Hanna H, Dvorak T, Chaiban G, Hachem R. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(1):78–83.
- Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Yokota T. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):138–41.

27. Furuhashi M, Iwamura M, Baba S, Inoue M. Combined effect of clarithromycin and imipenem/cilastatin against urinary biofilm infection after pyeloplasty. *Int J Urol*. 2003;10(4):228–30.
28. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Gomi K, Watanabe A. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Sci*. 2009;14(5):658–61.
29. Fujimura S, Sato T, Mikami T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(6):481–4.
30. Parra-Ruiz J, Vidallac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4329–34.
31. Anthony TU, Rubin LG. Stability of antibiotics used for antibiotic-lock treatment of infections of implantable venous devices (ports). *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(8):2074–6.
32. Fernandez-Hidalgo N, Almirante B, Calleja R, Ruiz I, Planes AM, Rodriguez D, et al. Antibiotic-lock therapy for long-term intravascular catheter-related bacteraemia: results of an open, non-comparative study. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(6):1172–80.
33. Droste JC, Jeraj HA, MacDonald A, Farrington K. Stability and in vitro efficacy of antibiotic-heparin lock solutions potentially useful for treatment of central venous catheter-related sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(4):849–55.
34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 8th ed. Wayne: CLSI; 2008.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.3 Artículo 3

Coronado Álvarez NM, Parra D, Parra Ruiz J. Clinical effectiveness of fosfomicin combinations against a variety of gram positive cocci. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2018 (in press)

OBJETIVO

La fosfomicina ha demostrado en algunos estudios previos *in vivo e in vitro* eficacia en tratamientos combinados frente a bacterias gram positivas. Sin embargo, a pesar de estos resultados tan esperanzadores, su empleo en la clínica es marginal, probablemente por el escaso número de estudios. Nuestro objetivo fue conocer la respuesta *in-vitro* al tratamiento de combinación de fosfomicina y comprobar si la extrapolación a la clínica de estos resultados se seguía de un beneficio terapéutico.

MÉTODOS

- Los estudios *in vitro* fueron realizados con cuatro cepas de *Staphylococcus aureus*, dos cepas resistentes a meticilina y dos sensibles, utilizando como antibióticos en combinación a fosfomicina. daptomicina, linezolid, imipenem, oxacilina y levofloxacino. La metodología empleada para valorar la actividad se basó en curvas de letalidad, utilizándose los antibióticos de estudio (daptomicina, cloxacilina, vancomicina, linezolid e imipenem) en dos concentraciones diferentes, 1 y 4 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La dosis de fosfomicina y gentamicina fue de 0,5 y

2 veces por encima de la CMI para valorar la existencia de sinergismo a dosis supra y sub-CMI.

- Las curvas de letalidad se hicieron con un inóculo inicial de 10^{8-9} y demostrando viabilidad a 0-1-2-4-8 y 24 horas. La sensibilidad de los microorganismos se realizó mediante E-test.
- Los datos clínicos se obtuvieron de la revisión retrospectiva de base de datos de bacteriemias del hospital, definiéndose éxito como desaparición de la misma

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- Los resultados in-vitro mostraron diferentes grados de respuesta en función de la dosis y los esquemas de tratamientos empleados. La asociación de fosfomicina a todos los antibióticos se tradujo en un aumento de la respuesta, si bien la combinación de fosfomicina y vancomicina fue inferior al resto de combinaciones.
- Los resultados clínicos demostraron un claro paralelismo con los estudios in-vitro, con una muy buena tasa de respuesta de las combinaciones antibióticas con fosfomicina (superior al 80% tanto en tratamiento de rescate como en primera línea), siendo la combinación de fosfomicina y vancomicina la que peores resultados clínicos tuvo.

Nuestros resultados confirman que la utilización de combinaciones antibióticas que incluyan fosfomicina, tanto como terapia de rescate o de primera elección, se traduce en un alto porcentaje de éxito y curación en pacientes con bacteriemia por

cocos grampositivos por lo que pensamos que estas combinaciones se deberían considerar en el tratamiento de infecciones bacteriémicas por gérmenes grampositivos.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Clinical efficacy of fosfomicin combinations against a variety of gram-positive cocci

Nieves M. Coronado-Álvarez^a, Diego Parra^{b,c}, Jorge Parra-Ruiz^{a,d,*}

^a Laboratorio de Investigación Anti Microbiana LIAM, Hospital Inmaculada, Grupo HLA SLU, Granada, Spain

^b Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias, Spain

^c Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Central de Asturias, Spain

^d Servicio de Medicina Interna, Hospital Inmaculada, Grupo HLA SLU, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2018

Accepted 8 May 2018

Available online xxx

Keywords:

Bacteraemia

Multidrug resistance

Antibiotics

Time-kill

ABSTRACT

Introduction: Over recent years we have witnessed an increase in the resistance of microorganisms to the available antimicrobials and a decrease in the number of new antimicrobials. Fosfomicin is a safe and cheap broad-spectrum antibiotic which has shown very promising results in combination therapy, mainly against gram-negative microorganisms. Little is known, however, about its clinical efficacy against gram-positive microorganisms.

Methods: We performed a retrospective review of all patients with severe gram-positive infections who received fosfomicin as part of their treatment from 2011 to 2017. We also performed *in vitro* time-kill assays to study the behaviour of fosfomicin with different antimicrobials against two strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and two strains of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA).

Results: Seventy-five patients were treated with different fosfomicin combinations. Among them, 61 (81%) were successfully treated. Daptomycin plus fosfomicin was the most effective combination. Overall, the treatment with fosfomicin was safe, and side effects were minor. There was only one major side effect that resolved after discontinuation of therapy. Time-kill studies demonstrated increased activity of fosfomicin combinations, with daptomycin-fosfomicin being the most active combination against both MRSA and MSSA strains.

Conclusions: Our results suggest that antimicrobial combinations including fosfomicin are an alternative and effective approach for gram-positive infections.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Eficacia clínica de las combinaciones de fosfomicina contra una variedad de cocos grampositivos

RESUMEN

Introducción: En los últimos años se ha ido produciendo un aumento de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos disponibles, y una disminución en el número de nuevos antimicrobianos. La fosfomicina es un antibiótico seguro y barato con un amplio espectro de actividad, que ha mostrado resultados muy prometedores en terapia de combinación, principalmente contra microorganismos gram-negativos. Sin embargo, poco se conoce sobre su eficacia clínica frente a microorganismos grampositivos.

Métodos: Revisión retrospectiva de todos los pacientes con infecciones graves por microorganismos grampositivos que recibieron fosfomicina como parte de su tratamiento, entre los años 2011 y 2017. También se realizaron curvas de letalidad *in vitro* para estudiar el comportamiento de la fosfomicina con diferentes antimicrobianos, frente a 2 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (SARM) y 2 cepas de *S. aureus* sensible a la metilina (SASM).

Palabras clave:

Bacteriemia

Multiresistencia

Antibióticos

Curvas de letalidad

* Corresponding author.

E-mail address: arrapj@gmail.com (J. Parra-Ruiz).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.05.009>

0213-005X/© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Resultados: Setenta y cinco pacientes recibieron tratamiento con diferentes combinaciones de fosfomicina. De ellos, 61 (81%) fueron tratados con éxito. Daptomicina más fosfomicina fue la combinación más efectiva. En general, el tratamiento con fosfomicina fue seguro, con efectos secundarios menores. Hubo solo un efecto secundario importante que se resolvió tras la suspensión del tratamiento. Las curvas de letalidad demostraron buena actividad de las combinaciones de fosfomicina, siendo la combinación daptomicina-fosfomicina la más activa, tanto frente a las cepas de SARM como de SASM.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que combinaciones con fosfomicina, pueden ser un tratamiento alternativo y efectivo en infecciones por grampositivos.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Introduction

Infections due to multidrug resistant microorganisms are an increasing problem and remain one of the biggest challenges in the treatment of infectious diseases. New multi-resistant profiles had been reported for gram-positive cocci. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and enterococci with vancomycin (VAN) and linezolid (LNZ) resistance or decreased susceptibility to daptomycin (DAP) had been notified. Moreover, new mechanisms of resistance have been recently found in Europe such as betalactamase production in *Enterococcus faecium*.^{1,2}

The optimal treatment for serious infections caused by these organisms is still unknown, and therefore studies of new therapeutic alternatives are needed. Antibiotic combination has been used not only as a strategy to avoid the appearance of resistance, but as a way of enhancing the activity of each of the combined antibiotic.³

Fosfomicin is a natural antibiotic that acts through an inhibition of an early step in cell wall synthesis. Although the drug is mainly used for non-complicated urinary infections, there is large evidence regarding its efficacy against a broad spectrum of gram-positive cocci, including MRSA and VRE, and gram-negative rods, including those producing extended spectrum betalactamases.⁴⁻⁸ In *S. aureus*, methicillin resistance does not confer cross-resistance to fosfomicin, remaining susceptible >90% of the isolates.⁹ In addition, although not currently recommended, fosfomicin monotherapy has proven high efficacy against difficult-to-treat MRSA infections, like osteomyelitis.¹⁰

Fosfomicin has shown in different *in vitro* and *in vivo* models synergism with almost all families of antimicrobials, suggesting and enormous potential of this inexpensive drug.¹¹⁻¹⁴ However, despite these promising *in vitro* and *in vivo* data, there is a paucity of data regarding the efficacy of FOS combinations in patients with gram-positive infections, and limited to case-reports of fosfomicin combinations as rescue therapy against MRSA.^{15,16} A multicentre open label study evaluating the efficacy of daptomycin plus fosfomicin has been completed in January 2018, but no results has been reported.¹⁷

Methods

In vitro studies

Microorganisms: Two MRSA and two MSSA clinical isolates recovered from patients with persistent bacteraemia were used for time-kill assays.

Susceptibility tests: Susceptibility testing was performed in duplicate by E-test. Quality control (QC) was performed using *S. aureus* ATCC 29213.

Antibiotics and regimens: Daptomycin (DAP), vancomycin (VAN), linezolid (LNZ), imipenem (IMP), gentamycin (GM), fosfomicin (FOS), oxacillin (OX) and levofloxacin (LEV) were

commercially purchased from Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain (vancomycin, imipenem, gentamycin, oxacillin and levofloxacin), Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland (daptomycin), Pfizer Madrid, Spain (linezolid) and Laboratorios ERN S.A. Barcelona, Spain (fosfomicin).

Regimens evaluated against MRSA included DAP, VAN, LNZ and IMP at 1× and 4× MIC alone and in combination with GM and FOS at 0.5× and 2× MIC. Regimens evaluated against MSSA included DAP, VAN, OXA and LEV at 1× and 4× MIC alone and in combination with GM and FOS at 0.5× and 2× MIC.

Media: Mueller Hinton Broth supplemented with 25 mg/L calcium and 12.5 mg/L magnesium (SMHB; Difco Laboratories, Detroit, MI) was used for all susceptibility testing and time kill experiments. For experiments using daptomycin, SMHB was supplemented with 50 mg/L calcium and 25 mg/L magnesium.

Time-kill assay: Time-kill assays were performed using a starting inoculum of 10⁸⁻⁹ CFU/ml. Inoculum in stationary phase of growth was prepared using an appropriate dilution of a 0.5 McFarland. Quantification of viability was performed at 0, 1, 2, 4, 8 and 24 h.

Samples were diluted in normal saline prior to drop plating onto Tryptic Soy Agar (TSA) plates. Antibiotic carryover was accounted using vacuum filtration. Plates were incubated at 35 °C (5% CO₂) for 18 h prior to colony counting. All tests were performed in triplicate to account for biological variability. The limit of detection of these methods of colony count determination was 2 log₁₀ CFU/ml extended to 1 log₁₀ CFU/ml by vacuum filtration.

Synergy was defined as a reduction >3 log CFU/ml over the most active antimicrobial agent alone, additive effect was defined as a reduction <3 log CFU/ml over the most active antimicrobial agent alone.

Clinical data

From 2011 fosfomicin was used as an add-on therapy in those patients with persistent bacteraemia, and from 2013 as initial combination therapy in selected patients with gram-positive cocci bacteraemia. Data from all patients who received fosfomicin for gram-positive cocci bacteraemia was recovered from the bacteraemia database. Patients were considered successfully treated if blood cultures sterilization was achieved after fosfomicin therapy.

Results

In vitro studies

MRSA strains

Daptomycin demonstrated rapid bactericidal activity at 4× MIC. T99.9% was achieved at 8 h. No other agent displayed similar activity in monotherapy.

In the synergy tests, the combination of DAP at 4×MIC with FOS at 2×MIC was the most active regimens achieving T99.9% at 4 h. All daptomycin combinations achieved the limit of detection at 24 h.

IMP-GM and IMP-FOS combination showed synergistic activity compared to that of IMP alone, however only IMP-FOS combinations achieved the limit of detection at 24 h against MRSA.

Vancomycin at 4×MIC with either GM at 0.5 or 2×MIC achieved the limit of detection at 24 h. However, VAN 1×MIC with either GM

at 0.5 or 2×MIC did not achieved the limit of detection. On the other hand, VAN-FOS combinations did not reach the limit of detection at any concentration.

Finally, linezolid at 4× MIC combined with GM at 2×MIC achieved the limit of detection against one strain, but not against the other. Linezolid at 4×MIC combined with FOS at 4×MIC achieved the limit of detection against both strains at 24 h (Fig. 1).

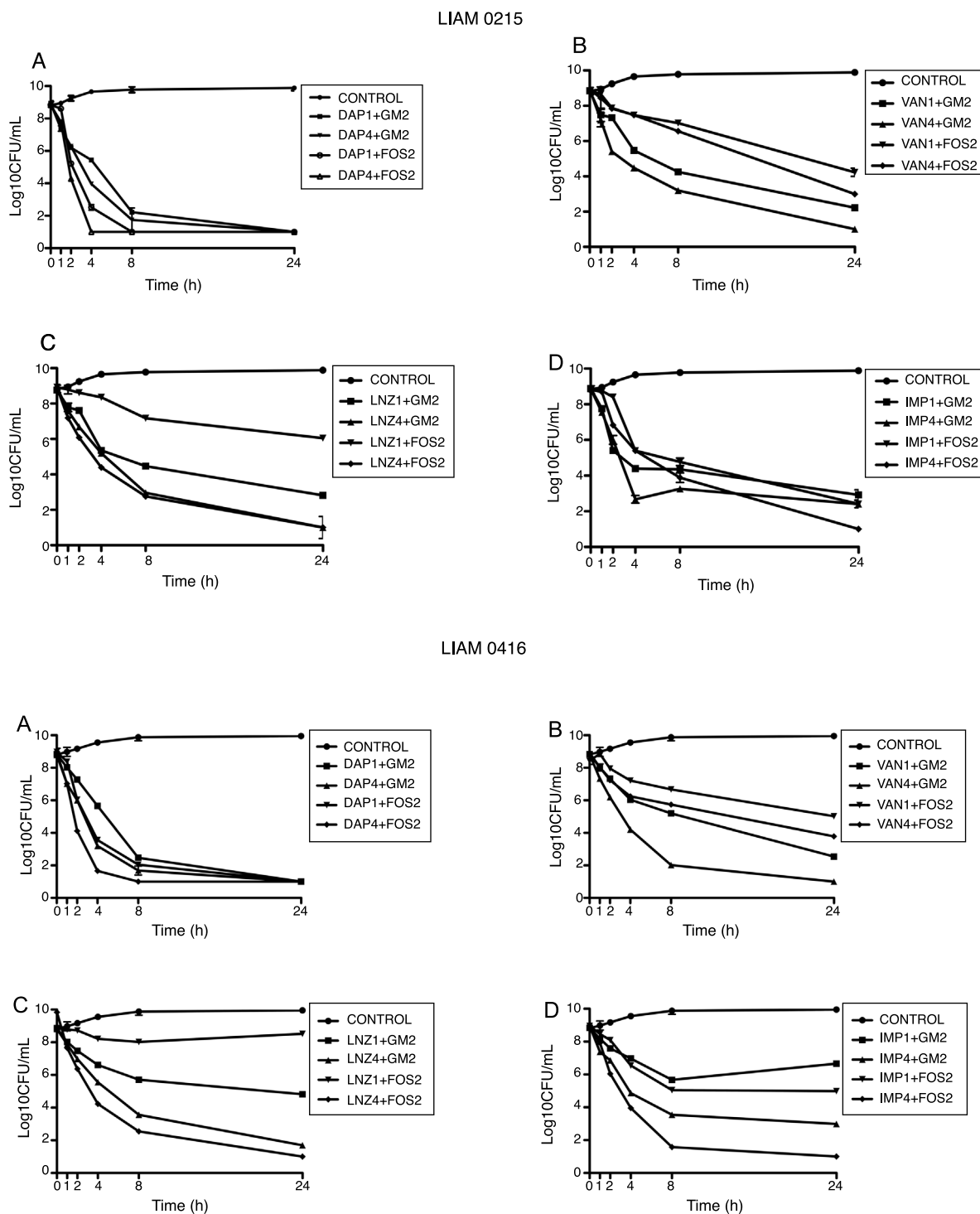


Fig. 1. Time kill studies of two MRSA clinical strain versus daptomycin, vancomycin, imipenem and linezolid in combination with gentamycin and fosfomicin. (A) Daptomycin combinations. (B) Vancomycin combinations. (C) Linezolid combinations. (D) Imipenem combinations. DAP1: daptomycin 1×MIC. DAP4: daptomycin 4×MIC. GM2: gentamycin 2×MIC. FOS2: fosfomicin 2×MIC. VAN1: vancomycin 1×MIC. VAN4: vancomycin 4×MIC. LNZ1: linezolid 1×MIC. LNZ4: linezolid 4×MIC. IMP1: imipenem 1×MIC. IMP4: imipenem 4×MIC.

MSSA strains

Daptomycin at 4×MIC was the most active regimens with T99.9% at 8 h and bactericidal activity at 4 h. At 1×MIC, daptomycin had bacteriostatic activity.

Daptomycin at 4×MIC plus either GM at 2×MIC or FOS at 2×MIC achieved the limit of detection at 4 h. Daptomycin at 1×MIC plus either GM at 2×MIC or FOS at 2×MIC achieved limit of detection at 24 h.

Levofloxacin and oxacillin displayed a very similar pattern, achieving the limit of detection at 4×MIC at 24 h and bactericidal activity at 8 h. At 1×MIC both agents did not achieve the limit of detection, being bacteriostatic at 24 h. Both LEV and OX at 4×MIC, combined with either GM at 2×MIC and FOS at 2×MIC, showed synergistic activity achieving the limit of detection at 8 h. The combination of LEV and OX at 1×MIC with GM and FOS at 2×MIC showed additive effect, being bactericidal at 8 h.

Finally, VAN at 4×MIC achieved the limit of detection and bactericidal activity at 24 h. At 1×MIC VAN displayed a bacteriostatic pattern. At 4×MIC, VAN combined with GM at 2×MIC achieved the limit of detection at 8 h. On the contrary, VAN at 4×MIC combined with FOS at 2×MIC was not able to achieve the limit of detection. The combination of VAN at 1×MIC with GM at 2×MIC showed additive effect, being bactericidal at 24 h. The combination of VAN at 1×MIC with FOS at 2×MIC, had indifferent effect (Fig. 2).

Clinical data

From January 2011 to June 2017 seventy-five patients were treated with different FOS combinations. Among them, 61 (81%) were successfully treated. Eight out of the 14 failures, defined as persistence of bacteraemia despite combination therapy, were with vancomycin plus fosfomycin. Globally, the combination of daptomycin plus fosfomycin was the most effective one, with 93% success rate. On the contrary, vancomycin plus fosfomycin was the less effective combination, with a 47% success rate.

FOS was prescribed as add-on therapy in 45 patients (Table 1). Those patients were initially treated with oxacillin (15 patients with MSSA infection), daptomycin (20 patients with MRSA or MSSA infection) or vancomycin (10 patients with MRSA infection) and, after 72 h of persistence of bacteraemia, FOS was added. Globally, after 48 h, combination therapy resulted in sterilization of blood cultures in 38 patients (84%) and persistence of bacteraemia in 7 patients (16%). Patients treated with daptomycin plus fosfomycin had the highest rate of sterilization and those treated with vancomycin plus fosfomycin had the lowest rate.

The other 30 patients received fosfomycin-based combination as initial therapy (Table 2). This group included patients treated with DAP-FOS combination (10 patients with MRSA infection), OX-FOS (7 patients with MSSA infection), VAN-FOS (5 patients with MRSA infection) and LNZ-FOS (8 patients with *Enterococcus faecium* infection). Globally, combination therapy resulted in sterilization of blood cultures in 24 patients (80%) after 48 h. Similar to patients treated with the add-on strategy, those treated with daptomycin plus fosfomycin had the highest rate of sterilization and those treated with vancomycin plus fosfomycin had the lowest rate.

Overall, FOS combinations were safe, with minor side effects like phlebitis or minor hypernatremia in nine patients. However, there was a severe side effect in one patient. An 81-year-old female suffering from aortic valve endocarditis, had acute cardiogenic pulmonary oedema secondary to sodium overload after 10 days of daptomycin–fosfomycin therapy that required ICU admission. Blood cultures were sterile at the moment of ICU admission, and the clinical situation resolved soon after combination therapy was discontinued. After ICU discharge, daptomycin monotherapy was

maintained for another 4 weeks, and there was clinical cure without relapse.

Discussion

Combination regimens that include FOS, as an add-on therapy or as first-line therapy resulted in a high success rate when used to treat gram-positive bacteraemia.

We performed time-kill curves comparing the efficacy of fosfomycin combination to that of gentamycin combinations. In our study, daptomycin–fosfomycin combinations showed potent *in vitro* activity against MRSA and MSSA isolates. In addition, additive or synergistic effect was demonstrated with all FOS combinations at 0.5 and 2×MIC FOS concentrations.

Our results correlates with previous data published in the literature describing *in vitro* synergistic effect with fosfomycin combinations.^{18,19} Interestingly, when used at sub-MIC concentration and combined with other antibiotics, FOS showed an additive effect. Descourouez et al. also reported this effect. They tested the effect of sub MIC concentration of FOS and daptomycin, amoxicillin and linezolid against 32 strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and found increased activity of all combinations.¹²

We also reviewed our clinical experience with fosfomycin in combination with other antibiotics like daptomycin, linezolid, oxacillin, and vancomycin. We used these combinations to treat 75 patients with gram-positive bacteraemia, showing good clinical outcomes even in those in which treatment with a prior first line regimen had failed. To our knowledge, this is the largest series of patients with infections caused by gram-positive microorganisms treated with antimicrobial combinations that included fosfomycin.

We decided to use the combination of linezolid plus fosfomycin based on *in vitro* data previously published demonstrating the efficacy of linezolid plus fosfomycin in an *in vitro* PK/PD model of simulated endocardial vegetations.²⁰ The results obtained in our patients treated with linezolid–fosfomycin combination supports our *in vitro* results.

There is a paucity of data regarding fosfomycin combinations in patients with severe gram-positive infections, and most of them limited to clinical cases and case series. Portier et al. reported the efficacy of cefotaxime–fosfomycin combination against *S. aureus* meningitis. This combination sterilized all CSF samples evaluated and clinical recovery was achieved in 21 out of 22 patients treated (95.2%).²¹ The same group reported the efficacy of cefotaxime 25 mg/kg plus fosfomycin 50 mg/g three to four times per day against a variety of MRSA infections (three patients with meningitis, six with bone and joint infections and seven with persistent bacteraemia). All patients were cured without relapses.²² More recently, Miro et al. described the efficacy of high dose daptomycin plus fosfomycin in three patients with left-sided endocarditis. All three patients (one with MSSA prosthetic aortic valve endocarditis and two with MRSA native valve endocarditis) were cured without relapses. Of interest, two patients had perivalvular abscesses and all three had failed prior antibiotic regimens (daptomycin and vancomycin alone).¹⁵ Similar to us, they also tested *S. aureus* strains to investigate the presence of synergism of the combination. Daptomycin plus fosfomycin showed synergism against 100% of MSSA strains tested (7/7), 60% of MRSA (3/5) and 50% of GISA (1/2).¹⁵

Finally, in a recent trial, patients with complicated MRSA bacteraemia or endocarditis who had failed first line therapy were offered rescue therapy with imipenem (1 g q8h) plus fosfomycin (2 g q6h). The authors included 16 patients (12 with endocarditis, 2 with vascular graft infection and 2 with complicated bacteraemia).

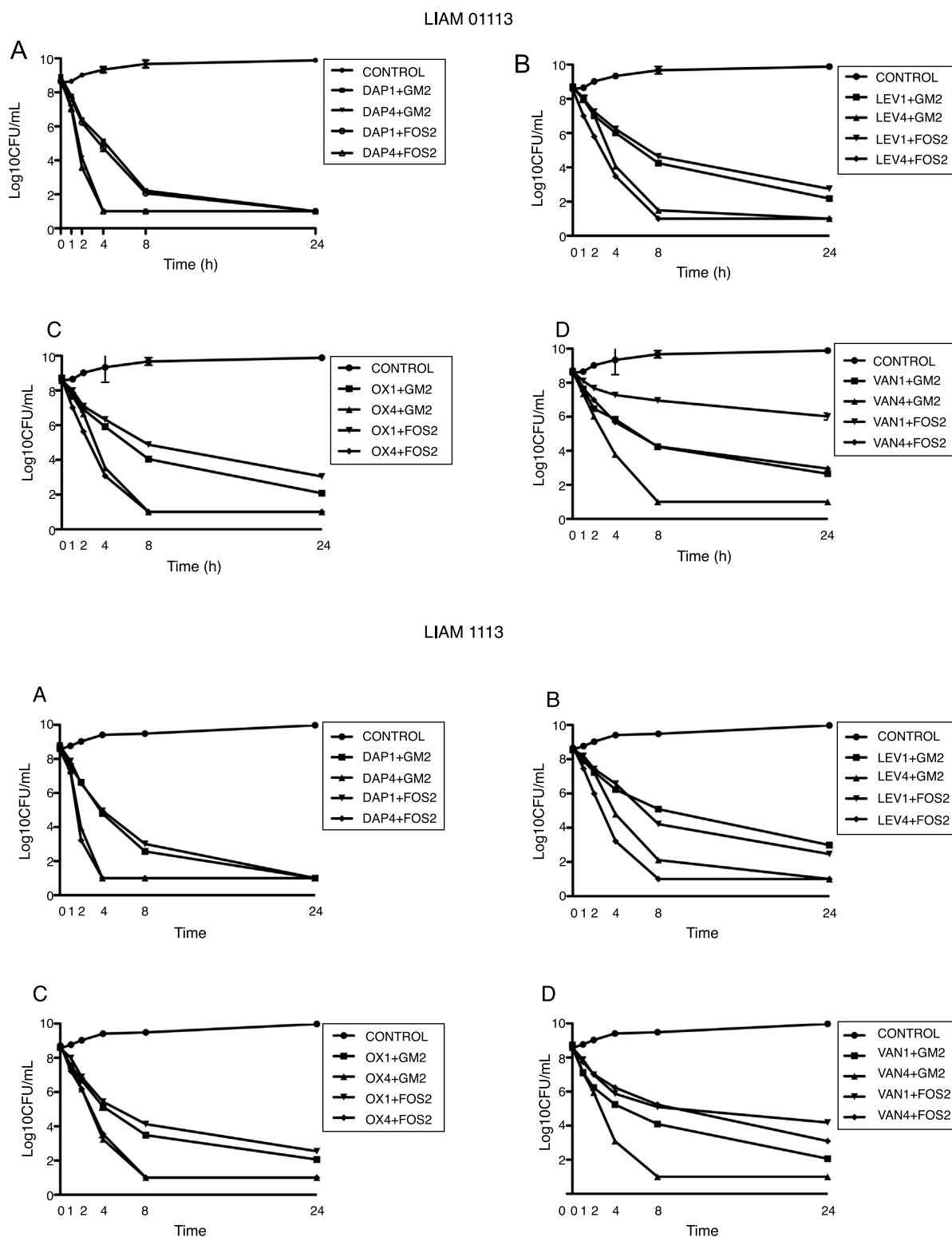


Fig. 2. Time kill studies of two MSSA clinical strain versus daptomycin, levofloxacin, oxacillin, and vancomycin in combination with gentamycin and fosfomycin. (A) Daptomycin combinations. (B) Levofloxacin combinations. (C) Oxacillin combinations. (D) Vancomycin combinations. DAP1: daptomycin 1×MIC. DAP4: daptomycin 4×MIC. GM2: gentamycin 2×MIC. FOS2: fosfomycin 2×MIC. LEV1: levofloxacin 1×MIC. LEV4: levofloxacin 4×MIC. OX1: oxacillin 1×MIC. OX4: oxacillin 4×MIC. VAN1: vancomycin 1×MIC. VAN4: vancomycin 4×MIC.

All patients had negative blood cultures after 72 h of initiation of imipenem plus fosfomycin with a 69% success rate.²³ Our results are quite close to that described in this trial. We also had a very early negativization of cultures in most patients, suggesting a high bactericidal activity of fosfomycin combinations.

Regarding safety, del Rio et al. reported the safety of FOS combinations, being well tolerated. In their cohort, there was only one major side effect due to excessive sodium overload in a cirrhotic patient.²³ Similarly, we did not have severe side effects with fosfomycin combinations, being safe in all patients but one,

Table 1
Gram-positive bacteremia episodes treated with fosfomycin combinations as an add-on therapy.

Combination	Number of patients	Microorganisms	Source	Sterile blood culture
DAP-FOS	20	MRSA	Bacteremia (5) CRB (5) IE (7) PJI (3)	19/20
OX-FOS	15	MSSA	Bacteremia (6) CRB (3) IE (6)	14/15
VAN-FOS	10	MRSA	Bacteremia (5) CRB (2) IE (3)	5/10

DAP: daptomycin; FOS: fosfomycin; OX: cloxacillin; VAN: vancomycin; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA: methicillin-susceptible *S. aureus*; CRB: catheter-related bacteremia; IE: infectious endocarditis; PJI: Prosthetic joint infection.

Table 2
Gram-positive bacteremia episodes treated with fosfomycin combinations as initial therapy.

Combination	Number of patients	Microorganisms	Source	Sterile blood culture
DAP-FOS	10	MRSA	Bacteremia (4) CRB (3) IE (3)	9/10
OX-FOS	7	MSSA	Bacteremia (2) CRB (1) IE (4)	6/7
VAN-FOS	5	MRSA	Bacteremia (3) CRB (2)	2/5
LNZ-FOS	8	<i>E. faecium</i>	Bacteremia (2) IE (6)	7/8

DAP: daptomycin; FOS: fosfomycin; OX: cloxacillin; VAN: vancomycin; LNZ: linezolid; MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA: methicillin-susceptible *S. aureus*; CRB: catheter-related bacteremia; IE: infectious endocarditis.

who suffered acute cardiogenic pulmonary oedema secondary to sodium overload. The patient had complete recovery after fosfomycin discontinuation.

Finally, we would like to highlight that clinical outcomes parallel what we observed *in vitro*, being daptomycin plus fosfomycin the most effective combination, with vancomycin plus fosfomycin showing poor efficacy. In addition, linezolid plus fosfomycin and oxacillin plus fosfomycin showed good results in our *in vitro* models. Similarly, in our series, good clinical outcomes were observed with daptomycin, oxacillin and linezolid combinations, whereas patients treated with vancomycin plus fosfomycin had poor clinical results, suggesting a good correlation of *in vitro* and *in vivo* data.

Despite the limitations related to the low number of episodes included, and the heterogeneity of cases included (different microorganisms, different infections and different comorbidities), we believe that our study provides valuable data regarding fosfomycin-based antimicrobial combinations as an alternative and effective approach for gram-positive infections.

Ethical approval

The local Research Ethic Board of our Institution approved the study protocol and waived the requirement of informed consent because of its design.

Informed consent

Based on the retrospective nature of the study, no informed consent was required.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contribution

NMCA, and DP carried out the *in vitro* studies, reviewed clinical charts and helped to draft the manuscript. NMCA and JPR performed the statistical analysis. JPR conceived the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

JPR has received honoraria, consultancy fees and funding research from Novartis, Pfizer, and ERN laboratories. DP and NMCA, nothing to declare.

References

- Napolitano LM. Emerging issues in the diagnosis and management of infections caused by multi-drug-resistant, gram-positive cocci. *Surg Infect (Larchmt)*. 2005;6 Suppl. 2:S-S5.
- Canton R, Ruiz-Garbajosa P. Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:543-51.
- Korzeniowski O, Sande MA. Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: a prospective study. *Ann Intern Med.* 1982;97:496-503.
- Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Kapaskelis A, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:497-9.
- Netikul T, Leelaporn A, Leelarasmea A, Kiratisin P. In vitro activities of fosfomycin and carbapenem combinations against carbapenem non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:609-10.
- Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum

- beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:43–50.
7. Shorr AF, Pogue JM, Mohr JF. Intravenous fosfomycin for the treatment of hospitalized patients with serious infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15:935–45.
 8. Yim J, Smith JR, Rybak MJ. Role of combination antimicrobial therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections: review of the current evidence. *Pharmacotherapy.* 2017;37:579–92.
 9. Falagas ME, Roussos N, Gkegkes ID, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: a review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18:921–44.
 10. Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R, Kozakowski N, Georgopoulos A, et al. Efficacy of fosfomycin in experimental osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:931–3.
 11. Sahuquillo Arce JM, Colombo Gainza E, Gil Brusola A, Ortiz Estevez R, Canton E, Gobernado M. In vitro activity of linezolid in combination with doxycycline, fosfomycin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter.* 2006;19:252–7.
 12. Descourouez JL, Jorgenson MR, Wergin JE, Rose WE. Fosfomycin synergy in vitro with amoxicillin, daptomycin, and linezolid against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from renal transplant patients with infected urinary stents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1518–20.
 13. Farina C, Russello G, Chinello P, et al. In vitro activity effects of twelve antibiotics alone and in association against twenty-seven *Enterococcus faecalis* strains isolated from Italian patients with infective endocarditis: high in vitro synergistic effect of the association ceftriaxone-fosfomycin. *Chemotherapy.* 2011;57:426–33.
 14. Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, et al. Daptomycin, fosfomycin, or both for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an experimental rat model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4999–5003.
 15. Miro JM, Entenza JM, Del Rio A, et al. High-dose daptomycin plus fosfomycin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4511–5.
 16. Chen LY, Huang CH, Kuo SC, et al. High-dose daptomycin and fosfomycin treatment of a patient with endocarditis caused by daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*: case report. *BMC Infect Dis.* 2011;11:152.
 17. Shaw E, Miro JM, Puig-Asensio M, et al. Daptomycin plus fosfomycin versus daptomycin monotherapy in treating MRSA: protocol of a multicentre, randomised, phase III trial. *BMJ Open.* 2015;5:e006723.
 18. Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, et al. Fosfomycin–daptomycin and other fosfomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:606–10.
 19. DiCicco M, Neethirajan S, Weese JS, Singh A. In vitro synergism of fosfomycin and clarithromycin antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMC Microbiol.* 2014;14:129.
 20. Coronado-Álvarez NM, Badiola J, Ruiz-Ruigómez M, Hernández-Quero J, Parra-Ruiz J. Evaluation of Linezolid versus vancomycin, alone or combined with fosfomycin or gentamycin against *Enterococcus faecium* in an in vitro PK/PD model of simulated endocardial vegetations. In: European congress of clinical microbiology and infectious diseases. 2015. p. 1385.
 21. Portier H, Armengaud M, Becq-Giraudon B, et al. Treatment with a cefotaxime-fosfomycin combination of staphylococcal or enterobacterial meningitis in adults. *Presse medicale.* 1987;16:2161–6.
 22. Portier H, Kazmierczak A, Lucht F, Tremeaux JC, Chavanet P, Duez JM. Cefotaxime in combination with other antibiotics for the treatment of severe methicillin-resistant staphylococcal infections. *Infection.* 1985;13 Suppl. 1:S123–8.
 23. Del Rio A, Gasch O, Moreno A, et al. Efficacy and safety of fosfomycin plus imipenem as rescue therapy for complicated bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicenter clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2014;59:1105–12.

5. DISCUSIÓN

Globalmente, en los trabajos que forman parte de esta tesis, se exploran, mediante estrategias de farmacocinética y farmacodinámica *in vitro*, nuevas combinaciones antibióticas frente a bacterias multirresistentes. A pesar del gran número de antibióticos disponibles en la actualidad, debido al aumento progresivo de las resistencias bacterianas, el arsenal terapéutico eficaz ha ido reduciéndose de manera paulatina, siendo necesario recurrir al empleo de antibióticos descubiertos hace muchos años, en algunos casos más de 50 años, y en desuso por efectos secundarios o poca eficacia clínica. El conocimiento de los parámetros PK/PD de estos antibióticos han permitido diseñar estudios *in vitro* que han optimizado tanto su perfil de seguridad, como de eficacia, dando como resultado una segunda oportunidad para su empleo en la clínica.

En estos trabajos desarrollamos tres modelos diferentes PK/PD que nos han permitido establecer dosis y regímenes de antibióticos no utilizados en la actualidad, o muy poco utilizados, y con un enorme potencial de eficacia clínica.

En la publicación **número uno (Cordoba et al., Antimicrob Agents Chemoth 2015;59: 7316-9)** utilizamos un modelo PK/PD *in vitro* y dinámico de bacteriemia, demostrando la eficacia de la combinación daptomicina-colistina contra tres cepas de *Acinetobacter baumannii* no relacionadas, y con múltiples resistencias antibióticas (MDR, del inglés multi drug resistant). Las combinaciones daptomicina-colistina en nuestro modelo, fueron más eficaces que la colistina en monoterapia y que las otras combinaciones utilizadas en el trabajo.

Aunque otros autores como Galani en 2014 y Phee en 2013 reportaron la eficacia de la combinación colistina-daptomicina contra cepas MDR de *A. baumannii*, esos grupos usaron diferentes metodologías, principalmente curvas de letalidad TK (del

inglés Time-Kill), ensayos de tablero de ajedrez o el método de dilución de agar E-test, los cuales son modelos estáticos, es decir, la concentración antibiótica no varía en función del tiempo. Nosotros, por el contrario, usamos un modelo PK/PD dinámico que simula las condiciones fisiológicas humanas del tratamiento antibiótico de una bacteriemia. Brevemente, el sistema *in vitro* se compone de un compartimento central con dos puertos, lleno con medio de cultivo estéril, donde se inoculan las bacterias; tras un periodo de crecimiento, se inyectan los antibióticos, en forma de bolus, del mismo modo a como se inyectaría el antibiótico a un paciente. Este compartimento central está conectado, por uno de los puertos, con un compartimento externo, que le suministra medio de cultivo estéril, a una velocidad dada que permite alcanzar una renovación del medio de cultivo del compartimento central idéntica a la vida media del antibiótico utilizado, simulando el aclaramiento que sufre el antibiótico en el interior del cuerpo humano. Por el otro puerto, se conecta a otro compartimento externo que sirve de almacenaje del medio de desecho (figura 5).

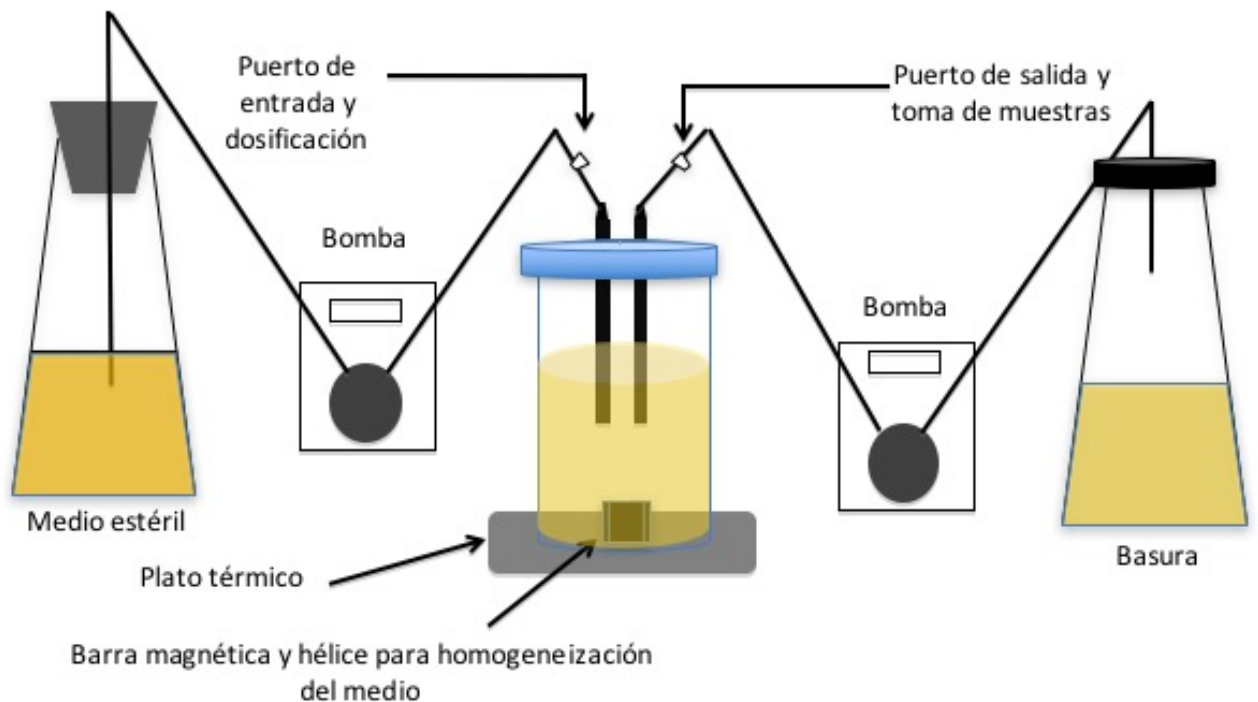


Figura 5. Modelo esquemático del modelo in vitro PK/PD de bacteriemia empleado en el artículo Cordoba et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59: 7316-9.

La variación de las concentraciones del antibiótico, simulando la farmacocinética humana (C_{max} , $T_{1/2}$, C_{min}) es lo que permite catalogar este modelo PK/PD como dinámico, y lo que lo diferencia enormemente con los estudios previamente publicados. Otras combinaciones de agentes anti-Gram-positivos con colistina contra *A. baumannii* se han estudiado.

Las bacterias gramnegativas son naturalmente resistentes a una gran variedad de antibióticos, como por ejemplo, glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina), lipoglucopeptidos (telavancina) o lipopéptidos (daptomicina), sin embargo son varios los autores que han comunicado la existencia de sinergismo (aumento de la

actividad sumatoria de la de cada uno de los antibióticos por separado) de combinaciones de colistina con estos antibióticos frente a bacterias que, teóricamente, deberían ser resistentes; así Gordon et al en 2010 y Wareham et al en 2011 publicaron la eficacia de la combinación de colistina con vancomicina y con teicoplanina, respectivamente, destacando en ambos casos, la necesidad de dosis menores de las habituales, tanto para vancomicina como para teicoplanina.

También en el año 2011, y de nuevo en ese año, Hornsey et al publicaron los resultados *in vitro* e *in vivo* de combinaciones de teicoplanina y vancomicina con colistina frente a *A. baumannii* multirresistente con resultados prometedores, demostrando una mayor eficacia la combinación colistina-vancomicina.

Posteriormente el mismo grupo publicó, en el año 2013, los resultados de la combinación telavancina-colistina, utilizando los mismos modelos *in vitro* e *in vivo*, siendo superior a la colistina en monoterapia.

En 2014 Petrosillo et al. informaron de la eficacia de combinaciones de glucopéptido-colistina en una unidad de cuidados intensivos en pacientes infectados con microorganismos gramnegativos multirresistentes (60% de ellos fueron *A. baumannii*) existiendo a su vez una coinfección con gérmenes grampositivos en un 17%. Aquellos que recibieron combinaciones de glucopéptido-colistina tuvieron una mayor probabilidad de supervivencia. Otro de los resultados llamativos fue que la existencia de insuficiencia renal, uno de los efectos secundarios más temidos del empleo tanto de glucopéptidos como de la colistina, no fue más frecuente entre los pacientes que recibieron terapia combinada con

glucopéptidos durante más de cinco días. La explicación para la mayor eficacia de la combinación fue que el empleo combinado se asoció con un menor riesgo de aparición de resistencias a la colistina entre las cepas de *A. baumannii*.

¿Cuál sería la explicación para este sinergismo entre colistina y antibióticos que, en principio son intrínsecamente ineficaces?

El empleo de colistina, debido a su mecanismo de acción, aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias gramnegativas, lo que hace que las hace susceptibles a antimicrobianos que de otro modo no tendrían ningún efecto contra ellas. Aunque este mecanismo de acción podría explicar la actividad potenciada de las combinaciones de colistina con vancomicina, teicoplanina o rifampicina, no queda aclarado completamente el efecto de la combinación daptomicina-colistina contra *A. baumannii*. Si bien todas esas otras combinaciones han mostrado eficacia frente a otros gramnegativos (por ejemplo, frente a *Escherichia coli*), lo que concordaría con la hipótesis presentada, esto no es así con la combinación daptomicina-colistina. Phee et al. demostraron en 2013 que la combinación daptomicina-colistina no tenía actividad frente a cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* o *Pseudomonas aeruginosa*, pero sí frente a cepas de *A. baumannii*.

Estos resultados de distinta actividad según la bacteria son consistentes con datos publicados previamente por Eggert, et al en 2001. Los autores utilizaron una cepa mutante de *E. coli* (*E. coli imp*), a la cual se le alteraba la capacidad de formación

de la membrana externa, volviéndolas grampositivas, y completamente susceptibles a vancomicina y sus derivados. Sin embargo, pese a no tener membrana externa, esta cepa de *E coli* mutante se mantuvo completamente resistente a daptomicina. Esta falta de actividad frente a esta cepa de *E. coli_{imp}* es común a otros lipopéptidos derivados de la daptomicina, como demostraron Nguyen et al en 2006.

La explicación podría estar en el mecanismo de acción de la daptomicina. Si bien su mecanismo exacto de actuación no se conoce, se ha sugerido que la unión de la daptomicina a la membrana celular de la bacteria induce alteraciones en el operón YycFG, que es un sistema de doble componente, presente solo en organismos grampositivos e involucrado en el control la integridad de la membrana citoplasmática. Esta alteración conduciría a una muerte celular rápida sin lisis (Baltz RH, 2009, Bayer AS, 2013). Este mecanismo de acción propuesto podría explicar la ausencia de actividad de daptomicina contra bacterias gramnegativas, incluso frente a aquellas que han perdido su membrana externa; sin embargo, no explica la elevada actividad mostrada contra *A. baumannii*, que es un gramnegativo. Creemos que este dato sugiere la presencia de diferencias notables entre *A. baumannii* y otras bacterias gramnegativas que debe estudiarse, si bien no era el objetivo de nuestro trabajo estudiar este fenómeno.

Como comparadores de la combinación daptomicina-colistina utilizamos combinaciones más habituales, como por ejemplo imipenem-colistina, o la combinación de dos carbapenemes, que han demostrado sinergia frente a otros

gramnegativos MDR. Ninguna de estas combinaciones fue superior a daptomicina-colistina.

Nos gustaría resaltar que, a pesar de lo publicado en estudios frente a *P. aeruginosa* con la combinación carbapenem-colistina (Bergen et al, 2011), o frente a *K. pneumoniae* panresistente con combinaciones de doble carbapenem (Oliva et al, 2014), los resultados de nuestro estudio no nos permiten recomendar ninguna de estas combinaciones frente a *A. baumannii* MDR. No podemos aventurar una explicación a la falta de actividad de estas combinaciones, como tampoco podemos explicar la aparición de resistencia a colistina en los modelos que emplearon la combinación imipenem-colistina y no así en los modelos que utilizaron colistina en monoterapia. Es posible que mecanismos de resistencia cruzada, o inducidos por la exposición a imipenem fuesen los resultados, pero no se realizaron estudios específicos al respecto.

Finalmente, nos gustaría señalar otro aspecto que no parece especialmente relevante en la combinación daptomicina-colistina. Como se ha señalado anteriormente, la toxicidad renal es uno de los efectos adversos más preocupantes de la utilización de colistina y de glucopéptidos, por lo que la combinación de estos dos fármacos, especialmente en pacientes críticos es siempre un elemento disuasorio. La daptomicina no se asocia con la producción e daño renal, incluso en pacientes con filtrado glomerular muy disminuido o que precisan hemodiálisis (Kullar et al, 2014). Y no sólo no presenta toxicidad renal, sino que algunos datos *in vivo* sugieren que la daptomicina podría tener un cierto efecto nefroprotector

cuando se utiliza con otros antibióticos nefrotóxicos, como por ejemplo la gentamicina (Thibault et al, 1998), por lo que no es esperable que la combinación daptomicina-colistina sea responsable de toxicidad renal, a diferencia de lo descrito con combinaciones de glucopéptido-colistina, haciendo esta combinación una opción atractiva en casos de infección por *A. baumannii* MDR o XDR (extremadamente resistente, del inglés extreme drug resistant).

Como cualquier estudio, nuestro trabajo tiene limitaciones. La primera de ellas es que sólo hemos realizado el estudio con tres cepas de *A. baumannii*, por lo que nuestros resultados no pueden generalizarse a todos los aislados de *A. baumannii*; sin embargo, la consistencia de los resultados, muy similares frente a las tres cepas, el haber realizado todos los estudios por duplicado, y el hecho de que utilizamos tres cepas no relacionadas entre sí, nos hace creer que nuestros resultados pueden generalizarse. En segundo lugar, la duración de nuestro modelo fue de 24h y, por lo tanto, no es capaz de detectar actividad antimicrobiana que pueda aparecer después de 24 horas o mecanismos de resistencia con la exposición continuada, si bien la presencia de recrecimiento en algunas combinaciones, y la esterilización del medio con las combinaciones de daptomicina-colistina, hacen poco probable actividad antimicrobiana posterior. También tenemos admitir que el alto inóculo bacteriano utilizado podría haber afectado la actividad de imipenem y ertapenem, ya que es conocido el efecto inóculo en la actividad de los carbapenemes, sin embargo, otros autores (Ly et al, 2015) han comunicado una eficacia similar con combinaciones colistina-carbapenem, independientemente del empleo de un bajo (10^8 UFC/mL) o alto (10^{11} UFC/mL) inóculo bacteriano.

Finalmente, somos conscientes que los estudios *in vitro* no siempre se traducen en resultados similares en la práctica clínica, por lo que, a la espera de resultados clínicos, se debe ser cauto a la hora de utilizar esta combinación, si bien la existencia de resultados similares con otras tres metodologías *in vitro*, da solidez a nuestros resultados. Por todo ello creemos que, frente a infecciones por *A. baumannii* XDR, nuestros resultados representan una estrategia novedosa y eficaz que agregar al armamentario terapéutico actual.

En la **publicación número 2 (Parra D. et al, BMC Microbiology 2015,15: 245)** evaluamos la actividad de distintas combinaciones en un modelo PK/PD estático de sellado de catéter.

Las infecciones por catéter son una de las infecciones más frecuentes en pacientes hospitalizados, y especialmente en pacientes críticos. De ahí nuestro interés en emplear este modelo. Los microorganismos más frecuentemente involucrados en este tipo de infecciones son cocos grampositivos, especialmente estafilococos coagulasa negativos, por lo que decidimos emplear cepas de *Staphylococcus epidermidis* con perfiles de sensibilidad y resistencias similares a las que habitualmente producen este tipo de infecciones, sensibles a daptomicina (CMI = 0.25 mg/L) y teicoplanina (CMI= 1 mg/L para la cepa 1022 y CMI = 2 m /L para las cepas 1018, 1076 y 1098) y resistentes a cloxacilina (CIM> 1024 mg/L), gentamicina (CIM> 32 mg/L) y para claritromicina (MIC> 128 mg/L).

El modelo empleado se basa en un catéter, empleado habitualmente en la clínica para la canalización de vías venosas, que se inocula con una solución que favorece la formación de una biopelícula, y tras un periodo de incubación a 35°C, se sella, inyectando la solución antimicrobiana cuya actividad se quiere evaluar, recambiando el contenido cada 24h. Tras el periodo de tratamiento establecido, el catéter se procesa para cultivo, permitiendo determinar la eficacia del tratamiento (figura 6).

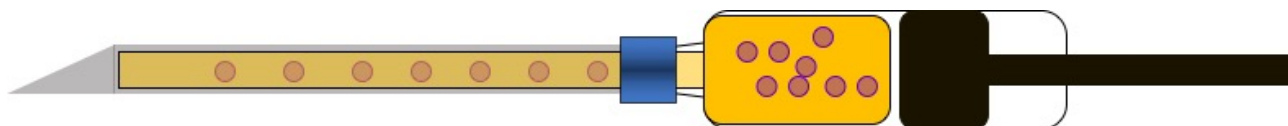


Figura 6. Representación esquemática del modelo de sellado de catéter. Las bacterias (círculos) son introducidas dentro del catéter en una solución con alta concentración de azúcares que favorece la producción de biofilm, para posteriormente ser sometidas a distintos tratamientos.

Todas las combinaciones utilizadas dieron como resultado reducciones significativas ($p < 0.05$) del recuento bacteriano, expresado como variación del $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ a las 72h en comparación con un control sin antimicrobiano. Entre los regímenes de agente único, la daptomicina fue la que produjo mayor reducción, con una diferencia significativa en el $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ comparado con la que produjo la teicoplanina ($p = 0.001$), para todas las cepas probadas; sin embargo, ni la daptomicina ni la teicoplanina, pudieron reducir el recuento bacteriano por debajo

del límite de detección a las 72h, apreciándose un recrecimiento completo a las 24h de eliminación del sellado antibiótico, lo que indica que las bacterias existentes eran completamente viables.

Por las características de las infecciones asociadas a biopelículas (biofilms), y por datos previos de nuestro grupo (Parra-Ruiz J et al, 2010) decidimos valorar la actividad de la combinación de daptomicina y teicoplanina con claritromicina, por la actividad específica anti-biofilm de la claritromicina, incluso frente a cepas resistentes a ésta (Parra-Ruiz J et al, 2010). Así mismo, decidimos utilizar la combinación de daptomicina y teicoplanina con etanol.

Los resultados con estas combinaciones fueron mucho más llamativos, tanto la daptomicina como la teicoplanina fueron capaces de reducir el recuento bacteriano por debajo del límite de detección, mostrando una enorme eficacia, sin embargo, tras retirar el sellado, y reincubar los catéteres con medio de cultivo estéril, aquellos que habían sido tratados con las combinaciones teicoplanina-claritromicina y teicoplanina-etanol mostraron un recrecimiento completo, lo que indica la persistencia de bacterias viables. Por el contrario, aquellos catéteres tratados con daptomicina-etanol y dos de los cuatro catéteres tratados con daptomicina-claritromicina no mostraron recrecimiento, indicativo de erradicación completa del biofilm.

A pesar del recrecimiento completo de todas las cepas de *S. epidermidis* después de la eliminación del sellado con antibióticos, no se detectó la aparición de resistencias contra ninguno de los antibióticos utilizados, similar a lo que sucede en

la clínica cuando se tratan infecciones asociadas a biofilms, lo que es compatible con el conocimiento actual de los biofilms.

El objetivo principal de la terapia con sellado antibiótico es el rescate del catéter, lo que permite su reutilización tras completar el sellado. Si no se ha logrado la erradicación bacteriana, tras comenzar de nuevo a utilizarlo, en muchas ocasiones para infundir soluciones glucosadas o nutrición parenteral, soluciones que se comportan como un magnífico medio de cultivo, lo más frecuente es que reaparezca la infección, que no se trataría de una reinfección, sino de una reactivación de la infección que no erradicamos inicialmente. En nuestro estudio, en un intento de simular lo que sucede en la práctica médica habitual, para conseguir la traslación clínica de los resultados *in vitro*, decidimos, tras la finalización del sellado, volver a reincubar los catéteres con una solución rica en glucosa durante 24 horas sin antibiótico, para comprobar la erradicación bacteriana. Esta segunda fase, que hasta donde conocemos no se había realizado con anterioridad, nos permitió detectar la persistencia de bacterias viables en los catéteres tratados con las combinaciones con teicoplanina, a pesar de que, si no se hubiese realizado esa reincubación, se habrían considerado como estériles.

Esta diferencia en nuestro modelo con los estudios publicados por otros autores (Giacometti et al, 2005, Sheretz et al, 2006, LaPlante et al, 2007) que también comunicaron resultados favorables con daptomicina, vancomicina o linezolid, nos permite realizar una comparación exacta de nuestros resultados.

En la actualidad, el tratamiento de la bacteriemia relacionada con catéter implica la retirada del mismo, reservándose la opción de tratamiento mediante sellado del catéter con antibiótico, junto con tratamiento antibiótico sistémico en pacientes estables y con catéteres tunelizados de larga duración (recomendación 2B), y en aquellos casos en los que no es posible la retirada del mismo. Esta recomendación viene derivada de metaanálisis que han demostrado resultados aceptables en pacientes de las características descritas (O'Horo et al, 2011), especialmente en el caso de infecciones por *S. epidermidis*.

Es llamativo que, en los estudios evaluados, se encontró una tasa de recidiva de hasta el 20% (reaparición de la infección tras retirar el sellado y reiniciar la utilización del catéter), a pesar de que los cultivos de sangre realizados al final de terapia fueron negativos. Esta alta tasa de recaída sugiere la persistencia de bacterias incrustadas en biofilm no detectadas inmediatamente después del final de la terapia. Nuestros resultados, negativización a las 72 h, pero reaparición del crecimiento tras 24 h de reincubación con medio fresco, después de la eliminación del sellado, son completamente coincidentes con lo descrito en la clínica y apoyan tanto los resultados como lo novedoso de la metodología empleada en nuestro trabajo.

En nuestro estudio decidimos valorar la utilidad del etanol como solución de sellado basándonos en datos publicados previamente. En la literatura médica existen datos acerca de la eficacia de etanol a concentraciones de 20%, 40% y 80% frente a cocos grampositivos (*S. aureus* y *S. epidermidis*), con tasas de erradicación, en

modelos *in vitro*, superior a muchos antibióticos utilizados como comparador (Qu et al, 2009, Chaudhury et al, 2012), sin que se detectase alteración de las propiedades biomecánicas de los catéteres utilizados en los estudios (Chaudhury et al, 2012).

En nuestro estudio evaluamos tres concentraciones diferentes de etanol, 40, 60 y 80%, encontrando una disminución significativa del recuento bacteriano, pero sin prevenir la reaparición del crecimiento al suspender el sellado y reincubar los catéteres, de nuevo sugiriendo persistencia del biofilm. La valoración de los resultados, junto a los datos comentados previamente, y otros estudios disponibles en la literatura médica (Raad et al. 2007, Aumeran et al, 2013), nos llevaron a introducir una nueva estrategia terapéutica consistente en la utilización de un sellado mixto con la combinación de etanol y antibiótico.

Los resultados obtenidos, erradicación e inhibición del recrecimiento posterior, sustentan nuestra teoría de erradicación del biofilm con la terapia combinada etanol-daptomicina. La asociación de etanol-teicoplanina si bien fue superior a la teicoplanina en monoterapia no fue capaz de prevenir el recrecimiento, probablemente por una menor actividad de la teicoplanina en comparación con la daptomicina. si bien podrían argumentarse otros motivos para explicar esta menor actividad, como, por ejemplo, la existencia de una interacción entre etanol y teicoplanina, previo a la utilización de cualquier terapia de combinación mantuvimos la combinación durante 24h a 35°C para detectar la existencia de precipitado. Es evidente que la ausencia de un precipitado macroscópico no descarta por completo la existencia de una interacción, pero es conocido y aceptado por la comunidad científica que la ausencia de precipitación es considerada como un equivalente de la estabilidad de la combinación, (Anthony et al, 1999, Droste JC et al, 2003,

Fernández-Hidalgo N et al, 2006), por lo que creemos que la menor actividad de las combinaciones basadas en la teicoplanina son debidas a una menor actividad intrínseca de la teicoplanina, y no a una interacción de ésta con claritromicina o etanol.

Otros autores han comunicado también la eficacia de la combinación antibiótico-etanol, lo que refuerza la plausibilidad de los datos obtenidos. Raad et al comunicaron los resultados de la combinación etanol-minociclina y etanol-minociclina-EDTA en un modelo de biofilm sobre discos de silicona en dispositivo Robbins, siendo la terapia triple capaz de erradicar el biofilm y prevenir el recrecimiento bacteriano tras la suspensión del tratamiento. Tanto la metodología (tipo de modelo in vitro) como los materiales sobre los que se creó el biofilm fueron diferentes a los utilizados por nosotros, pero sus resultados fueron bastante similares, lo que creemos que confiere robustez a nuestros resultados.

Con respecto al empleo de claritromicina, como hemos señalado con anterioridad, nuestro grupo había comunicado previamente la existencia de sinergismo, en un modelo in vitro dinámico de biofilm, de las combinaciones daptomicina-claritromicina y moxifloxacino-claritromicina (Parra-Ruiz J et al, 2010), por lo que decidimos valorar si las combinaciones de claritromicina con daptomicina y teicoplanina mejorarían los resultados obtenidos con la monoterapia. Los datos obtenidos en nuestro trabajo corroboran los publicados previamente, demostrando la actividad específica anti-biofilm de la claritromicina.

El mecanismo de esta actividad anti-biofilm de la claritromicina se basa en la inhibición de la producción de hexosa, un componente básico del biofilm, tanto de los cocos grampositivos (Yasuda H et al, 1994), como de los bacilos gramnegativos (Yasuda et al, 1993). Algunos datos sugieren que la actividad de la claritromicina no se limita a inhibir la producción de hexosa, sino que, además, podrían acelerar la destrucción del biofilm.

El hecho de haber empleado en los estudios comentados, y en otros posteriores (Furuhata M et al, 2003), bacterias que son intrínsecamente resistentes a la actividad de la claritromicina (como *P. aeruginosa*) o cepas seleccionadas con resistencia adquirida (cepas de *S. epidermidis* resistentes) sugieren que la actividad anti-biofilm es independiente del mecanismo general de actividad antibacteriana de la claritromicina. Estos datos son consistentes con la existencia de actividad anti-biofilm en otros miembros de la familia de los macrólidos, como por ejemplo la azitromicina (Saini H et al, 2015).

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el protocolo que usamos permitió tiempos de permanencia prolongados, una situación que podría limitar su reproducibilidad en la práctica clínica. Habitualmente el sellado no se realiza durante 24h seguidas, sino que se permite un tiempo de empleo del catéter. No obstante, dado que daptomicina más etanol y daptomicina más claritromicina (contra dos cepas) fueron capaces de erradicar el biofilm después de solo 72h creemos que tiempos inferiores a 24h, pero extendiéndose más allá de 72h podría evitar la necesidad de este tiempo de permanencia prolongado. Por otro lado, la terapia más de 3 días podría mejorar nuestros resultados.

En segundo lugar, hemos de admitir que tan sólo hemos valorado nuestros resultados frente a cuatro cepas de *S. epidermidis* resistentes a metilicina (y a otros antibióticos), por lo que nuestros resultados no podrían extrapolarse a todas las bacteriemias relacionadas con catéter; sin embargo, como anteriormente se comentó en la discusión, otros autores han informado resultados similares usando combinaciones de etanol o claritromicina con diferentes cepas que hacen plausible que nuestros resultados podrían generalizarse a la mayoría de las infecciones por *S. epidermidis* y, tal vez, a las infecciones por *S. aureus*, aunque esto último debe tomarse con precaución, por las enormes diferencias que existen entre los estafilococos coagulasa negativos y *S. aureus*.

En tercer lugar, no hemos evaluado la capacidad de formación de biofilm de las cepas de *S. epidermidis* utilizados. A pesar de que es cierta la diferente capacidad de formación de biofilm entre diferentes cepas, podría darse el caso de que nuestras cepas no fuesen formadoras de biofilm, o que lo hiciesen en escasa cuantía, lo que variaría la significación de los hallazgos encontrados. No obstante, en nuestro estudio las cuatro cepas utilizadas fueron aisladas de catéteres de pacientes con bacteriemias por catéter documentadas, lo que indica que, independientemente de su capacidad de producir un biofilm, todas las cepas utilizadas son representativas de la infección clínica que pretendíamos simular. Además, el alto inóculo obtenido antes de comenzar con el sellado ($> 8 \text{ Log}_{10}$ UFC/mL) sugiere una elevada capacidad de formación de biofilm, por lo que creemos que las cepas empleadas son muy representativas de este tipo de infecciones.

Finalmente, se podría argumentar que no hemos utilizado sustancia valorada para realizar los experimentos (antibióticos proporcionados por los laboratorios con garantía de pureza). Es cierto que esto podría artefactar en parte los resultados, ya que podríamos haber utilizado teicoplanina con un menor grado de pureza y, por tanto, con una menor actividad. Sin embargo, y en un intento por ajustarnos todo lo posible a las condiciones reales a las que nos enfrentamos los clínicos, decidimos utilizar preparados comerciales en forma de polvo seco para reconstituir, o soluciones intravenosas ya comercializadas para uso humano. La mayoría de los estudios publicados con anterioridad han utilizado sustancia valorada y, por lo tanto, nuestros resultados no serían completamente comparables. En cualquier caso, creemos que los resultados habrían sido muy similares usando sustancia valorada y, lo que es más importante, habrían sido menos reproducibles en la práctica clínica, ya que en una UCI de cualquier hospital no se dispone de sustancia valorada, sino de preparados comerciales idénticos a los que hemos utilizado en nuestro estudio.

Por último, en la publicación **número tres (Coronado-Álvarez et al, Enfermedades Infecciosa y Microbiología clínica 2018, en prensa)** los regímenes de combinación que incluyen fosfomicina, como una terapia complementaria o como primera línea se tradujeron en una alta tasa de éxito cuando se usan para tratar enfermos con bacteriemias por microorganismos grampositivos.

En este trabajo realizamos experimentos *in vitro* consistentes en curvas de letalidad, en las que comparamos la actividad de combinaciones basadas en fosfomicina con combinaciones basadas en la gentamicina, demostrando una mayor actividad de las combinaciones basadas en la fosfomicina, especialmente aquellas que incluyeron daptomicina y fosfomicina, que mostraron una enorme eficacia frente a *S. aureus*, tanto sensibles como resistentes a meticilina.

Nuestros resultados se correlacionan con datos previos publicados en la literatura. El grupo del Dr. Ariza publicó en el año 2013 los resultados de la combinación de daptomicina y fosfomicina en un modelo *in vivo* de infección protésica, el conocido como “tissue cage modelo”. Brevemente, este modelo consiste en colocar de manera subcutánea un dispositivo cuadrado, una “caja” en un animal de experimentación (habitualmente una rata wistar). Esas cajas contienen unas láminas en su interior que pueden ser de distintos materiales (en función del tipo de modelo que se quiera reproducir). Tras inocular dichas “cajas” con bacterias, y esperar a que se genere un biofilm sobre ellas, se inyectan dosis humanizadas del antibiótico (o combinaciones de antibióticos) al animal de experimentación que difundirán al interior de las cajas, actuando contra el biofilm. Tras los días programados de tratamiento se sacrifica al animal y se realiza el recuento bacteriano para comprobar la eficacia del tratamiento (Garrigos C et al, 2013). En este modelo, la combinación daptomicina-fosfomicina fue un tratamiento eficaz, concluyendo los autores que esta combinación podría ser un buen régimen alternativo para el tratamiento de las infecciones protésicas en casos de no poder usarse combinaciones con rifampicina, tratamiento de elección en las infecciones

protésicas. Además, demostraron que la ser utilizada la fosfomicina en combinación con daptomicina no aparecieron resistencias al tratamiento, que si se había producido con el uso de fosfomicina en monoterapia. Curiosamente, el efecto beneficios de la fosfomicina se produce también cuando se utiliza, combinada con otros antibióticos, a una concentración inferior a la CMI de la bacteria, produciendo un efecto aditivo, disminuyendo así considerablemente sus potenciales efectos indeseables en pacientes con infecciones y situaciones clínicas donde no se puedan usar grandes cantidades de sodio o volúmenes de infusión muy altos.

El beneficio de las dosis sub-CMI de la fosfomicina también ha sido descrito por otros autores. Descourouez et al también han documentado este efecto. Los autores probaron el efecto de la concentración por debajo de la CMI de fosfomicina en combinación con daptomicina, amoxicilina y linezolid, contra treinta y dos cepas de *Enterococcus faecium* con resistencia a la vancomicina, encontrando una buena actividad de todas las combinaciones.

En nuestro trabajo pretendimos valorar, del mismo modo que estos otros autores, la eficacia de dosis infra terapéutica de fosfomicina, por lo que, además de utilizar una dosis eficaz (2 x CMI), utilizamos también una dosis infra terapéutica (0,5 x CMI). Los resultados que obtuvimos son comparables a los previos, con un efecto sinérgico de la combinación supra-CMI y efecto aditivo con la combinación sub-CMI.

En este trabajo, además de los datos obtenidos in vitro y, espoleados por ellos, nos decidimos trasladarlos a la clínica. En un primer momento decidimos utilizar las

combinaciones de fosfomicina en el tratamiento de pacientes con bacteriemias persistentes por grampositivos que habían fracasado previamente a otros tratamientos y, posteriormente, modificamos la pauta de tratamiento inicial de pacientes con bacteriemias graves por bacterias grampositivas, pasando a utilizar en primera línea las combinaciones de fosfomicina.

Durante el periodo de estudio de este trabajo tratamos 75 pacientes con combinaciones de fosfomicina con daptomicina, cloxacilina, linezolid y vancomicina, mostrando, globalmente, buenos resultados clínicos, incluso en aquellos en los que el tratamiento con un régimen previo de primera línea había fracasado. Hasta donde nosotros sabemos, esta es la serie más grande de pacientes con infecciones causadas por microorganismos grampositivos tratados con combinaciones antimicrobianas que incluyen fosfomicina como parte del esquema terapéutico.

Una de las combinaciones empleadas en nuestro estudio, no evaluada previamente en la clínica, fue la asociación de linezolid más fosfomicina. Basado en datos *in vitro* que nuestro grupo había publicado previamente, donde demostramos la eficacia de esta combinación en un modelo PK/PD de vegetaciones endocárdicas simuladas (Coronado-Álvarez et al, 2015). Los resultados obtenidos en esta serie en aquellos pacientes con endocarditis infecciosa por enterococos tratados con la combinación de linezolid-fosfomicina apoya nuestros resultados *in vitro* publicados previamente, confirmando nuestra hipótesis de la traslacionalidad de los resultados *in vitro* en la práctica clínica.

Los resultados clínicos de las combinaciones con fosfomicina han sido publicados previamente, si bien como casos aislados, o series cortas de casos clínicos. En la década de los años 80 del pasado siglo, un grupo francés comunicó la eficacia de combinaciones de cefalosporinas y fosfomicina frente cepas de *S. aureus* y enterobacterias (Portier et al, 1987). Esta combinación esterilizó todas las muestras de LCR evaluadas y se logró la recuperación clínica en 21 de los 22 pacientes tratados (95,2%). El mismo grupo, pero previamente (Portier et al, 1985) habían comunicado la eficacia de cefotaxima 25 mg/kg más fosfomicina 50 mg/kg de tres a cuatro veces por día contra una variedad de infecciones por SARM (tres pacientes con meningitis, seis con infecciones óseas y articulares y siete con persistencia de bacteriemia). Todos los pacientes fueron curados sin recaídas. Los resultados obtenidos en nuestra serie son compatibles con los datos existentes previamente. Si bien es cierto que resulta llamativa la eficacia de la combinación de fosfomicina-cefotaxima frente a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina y, por tanto, resistentes a todos los betalactámicos, otros autores han comunicado una gran eficacia de fosfomicina con otros betalactámicos (del Rio et al, 2014), y en nuestro estudio *in vitro* también encontramos dicha eficacia. La combinación de imipenem con fosfomicina fue capaz de alcanzar el límite de detección de la técnica, indicativo de erradicación bacteriana en el modelo, a pesar de tratarse de una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina. El mecanismo por el cuál la fosfomicina es capaz de revertir la resistencia a los betalactámicos no es del todo bien conocido, pero podría estar relacionado con la inhibición en una de las primeras fases de la síntesis del peptidoglicano, lo que provocaría una activación masiva de la PBP2 (Penicillin

Binding Proteins), lugar principal de actuación de los betalactámicos frente a *S. aureus*, revirtiendo la resistencia a la meticilina (Najioulah F et al, 1992).

La combinación más eficaz en nuestro estudio fue la asociación de daptomicina con fosfomicina, tanto en el modelo *in vitro* como en el estudio clínico. Si bien no es la primera vez que se describe esta asociación, si creemos que es el estudio que ha incluido un mayor número de pacientes. El grupo de José María Miró, del Hospital Clínico de Barcelona, publicó previamente la eficacia de esta asociación (daptomicina-fosfomicina) en tres pacientes con endocarditis infecciosa (uno con endocarditis por SASM sobre válvula aórtica protésica y dos con endocarditis valvular nativa por SARM). En los tres casos se trató de tratamientos de rescate, y dos de ellos presentaban abscesos perivalvulares, consiguiéndose la erradicación de la infección en los tres casos (Miró JM et al, 2012). Así mismo los autores realizaron estudios de letalidad con 14 cepas de *S. aureus* con distintos perfiles de resistencia [7 SASM, 5 SARM y 2 con sensibilidad intermedia a glicopéptidos (GISA, del inglés glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus*)]. La combinación de daptomicina más fosfomicina mostró sinergismo contra el 100% de las cepas SASM probadas, frente al 60% de los SARM y de un 50% sobre las cepas GISA.

Estos resultados son, globalmente, muy similares a los obtenidos por nosotros, tanto en el estudio *in vitro*, como en el estudio clínico lo que contribuye a reforzar y dar consistencia tanto a los resultados obtenidos, como a la metodología empleada.

Para ir concluyendo, nos gustaría ampliar los resultados del estudio comentado con anterioridad, también del grupo de José María Miró (del Río et al, 2014). Los autores trataron 16 pacientes con infecciones por SARM (bacteriemia complicada o endocarditis infecciosa), en los cuáles había fracasado la terapia de primera línea, utilizando como tratamiento de rescate, imipenem más fosfomicina. En todos los casos, tras 72h de tratamiento, se produjo una negativización los cultivos, siendo la tasa global de éxito de un 69%. Nuevamente, nuestros resultados son bastante similares a los descritos por del Río et al. Las combinaciones empleadas en nuestro estudio mostraron una negativización muy temprana de los cultivos en la mayoría de los pacientes, sugiriendo una alta actividad bactericida de las combinaciones, y si bien la tasa de éxito global en nuestra serie fue superior, los resultados pueden ser considerados similares, ya que algunos de los antibióticos utilizados en nuestra serie tienen una mayor actividad per se frente a SARM, por lo que es esperable una cierta mayor eficacia.

Para concluir, no queremos dejar de resaltar lo llamativo de la seguridad de las combinaciones con fosfomicina. Si es importante que un tratamiento sea eficaz, no lo es menos que dicho tratamiento sea eficaz y no se asocie con importantes efectos secundarios. La fosfomicina para administración intravenosa está formulada como sal disódica, por lo que su empleo en dosis elevadas puede dar a lugar a una sobrecarga de sodio, con el consiguiente riesgo de sobrecarga de volumen. En nuestra serie, de 75 pacientes, muchos de ellos en situación de gravedad clínica, solo tuvimos un efecto secundario grave secundario a esta sobrecarga de volumen. Una paciente que presentó un cuadro de edema pulmonar

cardiogénico secundario a la sobrecarga de volumen. La paciente precisó de asistencia en la UCI, recuperándose por completo tras la modificación del tratamiento antibiótico. Es de señalar que, en el momento de sufrir el edema pulmonar, la paciente había negativizado los cultivos.

Este magnífico perfil de seguridad es corroborado por los datos del estudio de del Río et al (del Río et al, 2014), quienes comunicaron también un único efecto adverso grave, si bien en su caso, un paciente con cirrosis hepática, falleció como consecuencia de la sobrecarga de volumen secundaria a la sobrecarga de sodio que provoca el tratamiento con fosfomicina.

De acuerdo a la ficha técnica de la fosfomicina para administración intravenosa (https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/50882/FT_50882.pdf), cada gramo de fosfomicina disódica contiene 330 mg de sodio, por lo que el tratamiento con fosfomicina a las dosis recomendadas para las infecciones graves (3-4 g de fosfomicina cada 6-8 horas), conduce a la administración de 1-1,32 g de sodio cada 6 o cada 8 horas. Es posible que, en algunos pacientes, como en aquellos con cirrosis hepática, o en situación de edema pulmonar cardiogénico establecido, esta dosis de sodio hace que el empleo de fosfomicina en dosis elevadas no sea la mejor opción posible. Sin embargo, hemos de ser conscientes que 500 mL de suero salino contienen 4,5 g de cloruro sódico, o lo que es lo mismo, 1,77 g de sodio (https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/32773/32773_ft.pdf), por lo que el tratamiento a dosis plenas de fosfomicina sería equivalente al tratamiento con 1500 mL al día de suero fisiológico, lo que explica la baja incidencia de sobrecarga de volumen secundaria al tratamiento con fosfomicina en las series publicadas,

incluida la nuestra. De nuevo, hemos de admitir la existencia de algunas limitaciones; si bien a pesar de éstas, relacionadas fundamentalmente con el bajo número de episodios incluidos (aunque se trata de la mayor serie publicada hasta la fecha), y la heterogeneidad de los casos analizados (se han incluido diferentes microorganismos, diferentes infecciones y diferentes comorbilidades), creemos que nuestro estudio proporciona datos valiosos sobre el empleo de nuevas combinaciones antimicrobianas basadas en la fosfomicina para el tratamiento de infecciones graves por grampositivos.

Finalmente nos gustaría incidir en la traslacionalidad de los datos *in vitro*. En las curvas de letalidad practicadas en nuestro laboratorio, las combinaciones con daptomicina, cloxacilina y linezolid mostraron una buena eficacia, mientras que las combinaciones con vancomicina no alcanzaron el límite de detección, indicativo de una menor eficacia *in vitro*. Los resultados clínicos muestran un gran paralelismo a los hallazgos observados *in vitro*, lo que sugiere que los estudios *in vitro* son capaces de predecir lo que sucederá en la clínica, que es la base la investigación traslacional, y la hipótesis que dio origen a los estudios publicados y a esta tesis doctoral.

6.- CONCLUSIONES

1. El conocimiento de los parámetros PK/PD es básico para una correcta prescripción antibiótica, tanto en cuanto a la dosificación, como en cuanto a la elección del intervalo de administración.
2. El empleo de los antibióticos de acuerdo a estos parámetros PK/PD se asocia con un aumento de la eficacia, una disminución de los efectos secundarios y minimiza la posibilidad de aparición de resistencias a los mismos por parte de los microorganismos causantes de infecciones.
3. Los modelos *in vitro* han demostrado su utilidad para la evaluación de nuevos abordajes terapéuticos mediante el empleo de combinaciones antibióticas que, a priori, no deberían presentar actividad contra determinadas bacterias, permitiendo encontrar alternativas en situaciones donde las opciones terapéuticas empezaban a escasear.
4. El empleo de modelos *in vitro* permite simular infecciones sobre las que desarrollar mejores abordajes terapéuticos en función de parámetros PK/PD, sin poner en riesgo la salud de pacientes.
5. El empleo de modelos *in vitro* permite simular condiciones de gravedad clínica (elevado inóculo bacteriano, insuficiencia renal, hipoproteïnemia) similares a las que presentan los pacientes críticos, grupo frecuentemente excluido de los ensayos clínicos habituales.

6. Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* son reproducibles en la práctica habitual del trabajo del clínico, demostrando una adecuada traslacionalidad de los estudios *in vitro*, objetivo final de cualquier investigación clínica.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Aziz MH, Lipman J, Akova M, Basetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, et al. Is prolonged infusion of piperacillin/tazobactam and meropenem in critically ill patients associated with improved pharmacokinetic/pharmacodynamic and patient outcomes? An observation from the Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients (DALI) cohort. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:196-207.

Álvarez Lerma. Resistencia Zero. En UCI. ¿Mito o realidad? XXV Reunion de Trabajo de Enfermedades Infecciosas y Sepsis. Editorial Entheos. 2014. ISBN: 978-84-697-1451-5.

Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not for myce anymore. *Antimicrobial Resistance. Clin Infect Dis* 2007; 44:79-86.

Avendaño López MC. La resistencia antimicrobiana. Algunos aspectos de un grave problema. *An Real Acad Farm.* 2017; 83:380-91.

Baltz RH. Daptomycin. Mechanism of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin in Chemical Biology* 2009; 13:144-51.

Banin E, Hughes D, Kuipers OP. Editorial: bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS microbiol Rev* 2017, DOI :10.1093/femsre/fux016.

Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1277:139–58.

Bergen PJ, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT, Sidjabat HE, Paterson DL, Li J, Nation RL. Clinically relevant plasma concentrations of colistin in combination with imipenem enhance pharmacodynamic activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:5134–42.

Bergen PJ, Li J, Nation RL. Dosing of colistin-back to basic PK/PD. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11: 464–9.

Bergen PJ, Li J, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K, Milne RW. Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:636–42.

Bigger, J.W. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir J Med Sci* 1944; 227:533-68.

Bilinski J, Robak K, Peric Z, Marchel H, Karakulska-Prystupiak E, Halaburda K, Rusicka P, Swoboda-Kopec E, Wroblewska M, Wiktor-Jedrzejczak, Basak GW. Impact of gut colonization by Antibiotic- resistant bacteria on the outcomes of

allogenic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective, single center study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016; 22:1087-93.

Bird GT, Farquhar-Smith P, Wigmore T, Potter M, Gruber PC. Outcomes and prognostic factors in patients with haematological malignancy admitted to a specialist cancer intensive care unit: a 5-year study. *Br J Anaesth* 2012; 108:452-9.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad Bugs, no Drugs: No ESCAPE!! An update from the infectious Disease Society of America *Clin Infect Dis* 2009;48;1-128.

Breilh D, Texier-Maugein J, Allaouchiche B, Saux MC, Boselli E. Carbapenems. *J Chemother* 2013; 25:1–17.

Bundtzen, R.W., Gerber, A.U., Cohn, D.L., Craig, W.A. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981;3:28-37.

Canut Blasco A, Aguilar Alfaro L, Cobo Reinoso J, Giménez Maestre MJ, Rodríguez Gascón A. Análisis farmacocinético-farmacodinámico en Microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33:48-57).

Canton, R., Ruiz-Garbajosa, P. Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus spp.*). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31: 543-51.

Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2013.

Chen, L.Y., Huang, C.H., Kuo, S.C., Hsiao, C.Y., Lin, M.L., Wang, F.D., Fung, C.P. High-dose daptomycin and fosfomicin treatment of a patient with endocarditis caused by daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus*: case report. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 152.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 2008th ed. CLSI, Wayne, PA.

Congeni BL. Ertapenem. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11:669–72.

Cornejo Juárez P, Vilar Compte D, Pérez Jiménez C, Ñamendys Silva SA, Sandoval Hernández S, Volkow fernández P. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *Int J of Infect Dis* 2015;31: 31-34.

Coronado-Alvarez N.M., Badiola J., Ruiz-Ruigómez M., Hernández-Quero J. Parra-Ruiz J., 2015. Evaluation of Linezolid versus vancomycin, alone or combined with clarythromycin or gentamycin against *Enterococcus faecium* in an in vitro PK/PD model of simulated endocardial vegetations. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2015; P1385.

Craig WA. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing in mice and humans. Clin Infect Dis 1998; 26:1-12.

Craig WA Bogelman B. The postantibiotic effect. Ann Intern Med. 1987; 106:900-2).

Dailly E, Bouquie R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2011; 879:1137–1142.

Danhof M, de Lange ECM, della Pasqua OE; Ploeger BA, Voskuyl RA. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic(PK/PD) modeling in translational drug research. Trends in Pharmacological Sciences 2008;29: 186-91.

Del Rio A, Gasch O, Moreno A, Pena C., Cuquet J, Soy D, Mestres, C.A. Suarez, C, Pare J.C, Tubau F, Garcia de la Maria C, Marco F, Carratala J, Gatell J.M, Gudiol F, Miro JM, Investigators F, 2014. Efficacy and Safety of Fosfomycin Plus Imipenem

as Rescue Therapy for Complicated Bacteremia and Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Multicenter Clinical Trial. Clin Infect Dis 2014; 59: 1105-12.

Descourouez JL, Jorgenson MR, Wergin JE, Rose WE, 2013. Fosfomicin synergy in vitro with amoxicillin, daptomycin, and linezolid against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from renal transplant patients with infected urinary stents. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 1518-20.

DiCicco M, Neethirajan S, Weese JS, Singh A. In vitro synergism of fosfomicin and clarithromycin antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. BMC Microbiol 2014; 14: 129.

Doern GV. Antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol 2011;49 (Suppl.9:S4).
Hagle H, Fleischman R, Musselman AD. The effective concentration of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci and *Treponema pallidum*. J bacterial 1950; 59:625-43.

Eggert US, Ruiz N, Falcone BV, Branstrom AA, Goldman RC, Silhavy TJ, Kahne D. Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolipid derivatives of vancomycin. Science 2001; 294:361-4.

ESCMID Conference on Reviving Old Antibiotics. October 2014 Viena.

EUCAST. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf.

Farina C, Russello G, Chinello P, Pasticci MB, Raglio A, Ravasio V, Rizzi M, Scarparo C, Vailati F, Suter F, Italian Infective Endocarditis Study G. In vitro activity effects of twelve antibiotics alone and in association against twenty-seven *Enterococcus faecalis* strains isolated from Italian patients with infective endocarditis: high in vitro synergistic effect of the association ceftriaxone-fosfomycin. *Chemotherapy* 2011; 57: 426-33.

Galani I, Orlandou K, Moraitou H, Petrikkos G, Souli M. 2014. Colistin/daptomycin: an unconventional antimicrobial combination synergistic in vitro against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43:370–4.

Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. Fosfomycin-daptomycin and other fosfomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 606-610.

Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temociclin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect* 2015;21: 899-905.

Goodman & Gilman. Las bases de la farmacología, 11ª Edición. 2007. Editor Brunton LL. Editorial McGraw Hill. España.

Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:5316–22.

He H, Li JC, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, Tsuji BT, Thompson PE, Roberts K, Velkov T, Li J. 2013. Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2311–17.

Hornsey M, Phee L, Longshaw C, Wareham DW. In vivo efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41:285–7.

Hornsey M, Wareham DW. In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3534–37.

Kollef MH, Bassetti M, Burnham J, Dimopoulos G, Garnacho Montero J, Lipman J, Luyt CE, Nicolau DP, Postma MJ, Torres A, Wrlte T, Wunderink RG. The Intensive Care research agenda on multidrug-resistant bacteria, antibiotics, and stewardship. *Intensive Care Med* 2017; 43:1187-97.

Korzeniowski O, Sande MA. Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: A prospective study. *Ann Intern Med* 1982; 97: 496-503.

KPMG LLP. The global economic impact of anti-microbial resistance. London: KPMG; 2014.

<https://www.kpmg.com/UK/en/IssuesAndInsights/ArticlesPublications/Documents/PDF/Issues%20and%20Insights/amr-report-final.pdf>

Kullar R, McClellan I, Geriak M, Sakoulas G. Efficacy and safety of daptomycin in patients with renal impairment: a multicenter retrospective analysis. *Pharmacotherapy* 2014; 34:582–9.

Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Vo L, Schein J. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. *INFECT Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:47-53.

Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322:107.-31.

Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, Bergen PJ, Nation RL, Li J, Tsuji BT. Colistin and doripenem combinations against

Pseudomonas aeruginosa: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:1434–42

Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth J, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Lijequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-drug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268-81.

Miro JM, Entenza JM, Del Rio A, Velasco M, Castaneda X, Garcia de la Maria C, Giddey M, Armero Y, Pericas JM, Cervera C, Mestres CA, Almela M, Falces C, Marco F, Moreillon P, Moreno A. Hospital Clinic Experimental Endocarditis Study, G. High-dose daptomycin plus fosfomycin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4511-15.

Moureau AS, martin Loeches M, Povoá P, Salluh J, Rodriguez A, Thille AW, Diaz Santos E, Vedes E, Lobo SM, Mégarbane B, Molero Silvero E, Coelho L, Argaud L, Sánchez Iniesta R, labreuche J, Rouzé A, Nseir S. impact of immunosuppression on incidence, aetiology and outcome of ventilator-associated lower tract infections. *Eur resp Journal* 2018; 51 1701656; DOI: 10.1183/13993003.01656-2017.

Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;55: 601-07.

Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Clin Microbiol Infect* 2015;21, 881-85.

Najioulah F, Pellon G, Freney J, Michel G, Fleurette J. Fosfomycin enhances the expression of penicillin-binding protein 2 in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1992;76 :221-6.

Napolitano LM, Emerging issues in the diagnosis and management of infections caused by multi-drug-resistant, gram-positive cocci. *Surg Infect (Larchmt)* 2005 6 Suppl 2: S-5-22.

Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS. Framework for optimisation of the clinical use of colistine and polymyxin B: The Prato polymyxin consensus; *Lancet Infect Dis* 2015;15: 225-34.

Netikul T, Leelaporn A, Leelarasmee A, Kiratisin P. In vitro activities of fosfomycin and carbapenem combinations against carbapenem non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 609-10.

Nguyen KT, Ritz D, Gu JQ, Alexander D, Chu M, Miao V, Brian P, Baltz RH. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:17462–7.

Oliva A, D'Abramo A, D'Agostino C, Iannetta M, Mascellino MT, Gallinelli C, Mastroianni CM, Vullo V. Synergistic activity and effectiveness of a double-carbapenem regimen in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 1718–20.

O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: The Review of Antimicrobial Resistance; 2014.

O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: The Review on Antimicrobial Resistance; 2016.

Olofsson SK, Cars O. Optimizing drug exposure to minimize selection of Antibiotic Resistance. Clin Infect Dis 2007;45 (Suppl 2): S129-36.

Parra-Ruiz J, Vidailac C, Rose W, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:4329-34.

Pastor A, Cantón E. Interacciones de las bacterias y el antimicrobiano durante la fase de efecto postantibiótico. Revista Esp Quimioter. 1999;12(4).

Pea F. Practical concept of pharmacokinetics/pharmacodynamics in the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29:153-9.

Pea F, Viale P. The antimicrobial Therapy Puzzle: Could Pharmacokinetic-Pharmacodynamic relationships be helpful in addressing the issue of appropriate pneumonia treatment in critically ill patients? *Clin Infect Dis* 2006;42: 1764-71.

Pea F, Viale P, Furlanut M. Antimicrobial therapy in critically ill patients: a review of pathophysiological conditions responsible for altered disposition and pharmacokinetic variability. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 1009-34.

Petrosillo N, Giannella M, Antonelli M, Antonini M, Barsic B, Belancic L, Inkaya AC, De Pascale G, Grilli E, Tumbarello M, Akova M. Clinical experience of colistin-glycopeptide combination in critically ill patients infected with Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:851–8.

Phee L, Hornsey M, Wareham DW. In vitro activity of daptomycin combination with low-dose colistin against a diverse collection of Gram-negative bacterial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:1291–4.

Piddock LJ. The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? *Lancet Infect Dis* 2012; 12:249-53.

Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R, Kozakowski N, Georgopoulos A, Burgmann H. Efficacy of fosfomicin in experimental osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 931-3.

Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R, Kozakowski N, Lagler H, Georgopoulos A, Burgmann H. Daptomycin, fosfomicin, or both for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in a 363 experimental rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4999-5003.

Polillo M, Tascini C, Lastella M, Malacarne P, Ciofi L, Viaggi B, Bocci, G, Menichetti F, Danesi R, Del Tacca M, Di Paolo A. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 200–5.

Portier H, Armengaud M, Becq-Giraudon B, Bousser J, Desbordes JM, Duez JM, Kazmierczak A, Korinek AM, Laisne MJ, Pangon B. Treatment with a cefotaxime-fosfomicin combination of staphylococcal or enterobacterial meningitis in adults. *Presse Medicale* 1987; 16: 2161-2166.

Portier H, Kazmierczak A, Lucht F, Tremeaux JC, Chavanet P, Duez JM. Cefotaxime in combination with other antibiotics for the treatment of severe methicillin-resistant staphylococcal infections. *Infection* 1985; 13 Suppl 1: S123-8.

Potrel L, Jayol A, Nordmann P. Polymixins: Antibacterial Activity Susceptibility testing and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Review 2017; 30: 557-96.

Rello J, Lagunes L, Alves J, Pulcini C, Conway-Morris A, Alp E, schouten J, Mer M, Zhang Z. Top Ten Resistant Microorganism at intensive care unit: a 2018 global expert survey (TOTEM study protocol). J Emerg Crit Care Med 2018; 2:6.

Roberts JA, Joynt GM, Choi GYS, Gomersall CD, Lipman J. How to optimise antimicrobial prescriptions in the Intensive care Unit. Principles of individualised dosing using pharmacokinetics and pharmacodynamics. Int Journal of Antimicrob Agents 2012;39: 187-92.

Roberts JA, Paul SK, Akova M, Bassetti M, De Waele JJ, Dimopoulos G, Kaukonen KM, Koulenti D, Martin C, Montravers P, Rello J, Rhodes A, Starr T, Wallis SC, Lipman J, DALI Study Authors. DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients: Are current beta-lactam antibiotic doses sufficient for critically ill patients? Clin Infect Dis 2014 ; 58 : 1072-83.

Roberts JA, Pharm B, lipman J. Pharmacokinetics issues for antibiotics in the critically ill patient. Crit Care Med 2009 ;37: 840-51.

Sahuquillo Arce JM, Colombo Gainza E, Gil Brusola A, Ortiz Estevez R, Canton E, Gobernado M. 2006. In vitro activity of linezolid in combination with doxycycline,

fosfomicin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter 2006; 19: 252-7.

Saini H, Chhibber S, Harjai K. Azithromycin and ciprofloxacin: a possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents. 2015 Apr;45: 359-67.

Saiz-Rodriguez M, Romero Palacian DR, Abad-Santos F. Infecciones como causa de ingreso urgente en adultos en un hospital terciario. IBJ Clin Pharmacol 2017 1(1):e0004

Shaw E, Miro J.M, Puig-Asensio M, Pigrau C, Barcenilla F, Murillas J, Garcia- Pardo G, Espejo E, Padilla B, Garcia-Reyne A, Pasquau J, Rodriguez-Baño J, Lopez-Contreras J, Montero M, de la Calle C, Pintado V, Calbo E, Gasch O, Montejo, M., Salavert, M., Garcia-Pais, M.J., Carratala, J., Pujol, M., Spanish Network for Research in Infectious, D., Instituto de Salud Carlos Iii, M.S., Geih, 2015. Daptomycin plus fosfomicin versus daptomycin monotherapy in treating MRSA: protocol of a multicentre, randomised, phase III trial. BMJ Open 2015; 5: e006723.

Shorr AF, Pogue JM, Mohr JF, 2017. Intravenous fosfomicin for the treatment of hospitalized patients with serious infections. Expert Rev Anti Infect Ther 2017; 15: 935-45.

Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 18:96-104.

Steed ME, Vidailac C, Rose WE, Winterfield P, Kaatz GW, Rybak MJ. Characterizing vancomycin-resistant *Enterococcus* strains with various mechanisms of daptomycin resistance developed in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4748–54.

Tabah A, Koulenti D, Laupland K, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EURO-BACT International cohort Study. *Intensive Care Med* 2012; 38: 1930-45.

Thibault N, Grenier L, Simard M, Bergeron MG, Beauchamp D. Attenuation by daptomycin of gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1027–35.

Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. 2006. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:224–8.

Torrabadella de Reynoso P. Sepsis Grave. Editorial ediciones Experiencia, S.L. 2002 ISBN: 84.932264-9-1.

Tozer TN, Rowland M. Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. The Quantitative Basis of Drug Therapy. Editorial Lippincot and Wilkins. 2006. ISBN: 0-7817-5149-7.

US department of health and human services Food and Drug administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry antimicrobial drug products: Use of noninferiority trials to support aproval. FDA 2010.

Varguese JM, Roberts JA, Lipman J. Antimicrobial Pharmacokinetic and Pharmacodynamic issues in the Critically Ill with severe Sepsis and Septic Shock. Crit Care Clin 2011; 27:19-34.

Vidaillac C, Parra-Ruiz J, Winterfield P, Rybak MJ. In vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic activity of NXL103 versus clindamycin and linezolid against clinical Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes isolates. Int J Antimicrob Agents 2011; 38:301–6.

Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. In vitro activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2011; 66:1047–51.

Yim J, Smith JR, Rybak MJ. Role of Combination Antimicrobial Therapy for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Infections: Review of the Current Evidence. *Pharmacotherapy* 2017; 37: 579-92.