Le Infezioni in Medicina, n. 4, 243-247, 2010

Articoli originali

Original articles

Sinergismo *in vitro* tra ulifloxacina e piperacillina/tazobactam verso isolati clinici di enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro esteso e AmpC

In vitro synergism of ulifloxacin plus piperacillin/tazobactam against clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum or AmpC-Type β-lactamases

Carlo Tascini[1], Elisabetta Mantengoli[2], Giulia Gemignani[1], Alessandro Leonildi[1], Tiziana Di Maggio[2], Serena Fondelli[1], Gian Maria Rossolini[2,3], Enrico Tagliaferri[1], Francesco Menichetti[1]

[1]U.O. Malattie Infettive, Ospedale Cisanello, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa, Italy
[2]Dipartimento di Biologia Molecolare, Sezione di Microbiologia, Università di Siena, Italy
[3]U.O. Microbiologia e virologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

INTRODUZIONE

I batteri Gram negativi della famiglia *Enterobacteriaceae* sono tra i più frequenti agenti eziologici di vari tipi di infezione. I fluorochinoloni e le cefalosporine ad ampio spettro sono gli antibiotici più comunemente impiegati nella pratica clinica, ma la resistenza a queste molecole è in aumento in tutto il mondo [1]. La produzione di enzimi come le beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) e l'ampicillinasi C (AmpC) è il principale meccanismo di resistenza acquisita alle cefalosporine ad ampio spettro nelle *Enterobacteriaceae*. Le ESBL sono in grado di idrolizzare tutte le cefalosporine, la piperacillina e l'aztreonam, ma risultano sensibili almeno *in vitro* agli inibitori suicidi delle penicillinasi, mentre l'ampicillinasi C conferisce resistenza anche a tutti gli inibitori suicidi e alle cefamicine ma può conservare una sensibilità residua verso il cefepime. I ceppi produttori di questi enzimi sono spesso resistenti anche ad aminoglicosidi, tetracicline, cotrimossazolo e fluorochinoloni [2]. La resistenza ai fluorochinoloni può essere mediata da una modifica o una protezione delle molecole bersaglio, da pompe di efflusso o enzimi che modificano il farmaco [3].
Gli schemi terapeutici più utilizzati per le infezioni gravi causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL o AmpC si basano sull'impiego dei carbapenemici.
Nell'ultimo decennio l'uso di questi farmaci è largamente aumentato, con conseguente selezione di ceppi resistenti ai carbapenemici tra le *Enterobacteriaceae*, ma anche tra i batteri Gram negativi non fermentanti come *Pseudomonas spp* ed *Acinetobacter baumannii* e alla diffusione di nuovi meccanismi di resistenza come la produzione di carbapenemasi [4]. Per questo motivo è importante individuare schemi terapeutici alternativi, non basati sui carbapenemici, efficaci verso batteri Gram negativi resistenti. Per i ceppi produttori di ESBL, l'uso di piperacillina/tazobactam è stato proposto sulla base dell'efficacia *in vitro* e della risposta clinica riportata in alcuni casi [5]. D'altra parte, sono stati descritti anche casi di fallimento clinico ed è stato ipo-

tizzato un effetto inoculo per spiegare una falsa sensibilità *in vitro* [6].
L'ulifloxacina è un fluorochinolone con attività *in vitro* verso batteri Gram negativi e Gram positivi comunemente isolati in caso di bronchite cronica, polmonite e infezione delle vie urinarie. Inoltre, l'ulifloxacina ha mostrato una minore tendenza di ciprofloxacina a selezionare batteri resistenti ed ha la migliore attività verso *Pseudomonas aeruginosa* tra i fluorochinoloni [7]. Una terapia di associazione può migliorare l'efficacia dei singoli antibiotici e prevenire la selezione di germi resistenti. Nel nostro studio abbiamo analizzato l'attività *in vitro* della combinazione di ulifloxacina e piperacillina/tazobactam e dimostrato il frequente sinergismo verso ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di ESBL e AmpC.

MATERIALI E METODI

Sono stati presi in esame 10 isolati clinici appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*: 8 ceppi di varie specie produttori di beta-lattamasi ESBL o AmpC, un ceppo di *Klebsiella oxytoca* produttore dell'enzima K1 e un ceppo di *Salmonella enterica* sierotipo *parathypi* A che risultava sensibile ai fluorochinoloni *in vitro*, ma isolato in un caso di fallimento clinico con ciprofloxacina in monoterapia (Tabella 1). Tutti i ceppi sono stati isolati presso il laboratorio di Microbiologia dell'Unità di Malattie Infettive di Pisa. La produzione di ESBL in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp* è stata dimostrata secondo i criteri indicati dal *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) [8]. La produzione di ESBL è stata dimostrata con il test del

Tabella 1 - Isolati, meccanismo di resistenza, precedente trattamento antibiotico, MIC dei fluorchinoloni, MIC di ulifloxacina e piperacillina/tazobactam da soli e in associazione, Indice di Concentrazione Inibitoria Frazionata (∑FIC).

Ceppo	*Specie*	*Sito di isolamento*	*Terapia precedente (risultato clinico)*	*Meccanismo di resistenza*	*MIC CIP (mg/L)*	*MIC LEV (mg/L)*	*MIC ULI (mg/L)*	*MIC ULI + TZP (mg/L)*	*MIC TZP (mg/L)*	*MIC TZP + ULI (mg/L)*	*∑FIC*
226	*Serratia marcescens*	Osso	amoxicillina/clavulanato	AmpC	0,75	0,75	0,25	0,06	128	4	0,28
211	*Enterobacter cloacae*	Liquido peritoneale	ceftriaxone	AmpC	0,06	0,06	0,03	0,007	128	32	0,25
210	*Escherichia coli*	Liquido peritoneale	amoxicillina/clavulanato	CTX-M-1 ESBL	0,015	0,03	0,015	0,007	32	16	1
201	*Klebsiella pneumoniae*	Sangue, elettrodo di pacemaker	ceftriaxone	TEM-1, SHV-28 ESBL	0,75	0,75	0,25	0,06	2	0,12	0,18
202	*Proteus mirabilis*	Piede diabetico	amoxicillina/clavulanato	TEM-92 ESBL	6	6	4	1	2	1	0,75
206	*Proteus mirabilis*	Broncolavaggio	ceftazidime	TEM-92 ESBL	2	2	0,5	0,12	512	32	0,31
218	*Escherichia coli*	Piede diabetico	amoxicillina/clavulanato	TEM-92 ESBL	0,19	0,25	0,06	0,015	16	2	0,15
300	*Salmonella parathypi A*	Sangue	Ciprofloxacina (fallimento clinico)	-	0,5	0,75	0,25	0,12	1	0,12	0,625
204	*Klebsiella oxytoca*	Piede diabetico	amoxicillina/clavulanato	K1	0,75	0,75	0,25	0,12	8	1	0,625
215	*Klebsiella oxytoca*	Broncolavaggio	ceftriaxone	SHV-12 ESBL	0,38	0,38	0,25	0,12	256	128	1

AmpC: ampicillinasi C; ESBL: beta-lattamasi ad ampio spettro; K1: betalattamasi K1; MIC: concentrazione minima inibente; FIC: concentrazione inibitoria frazionata; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; ULI: ulifloxacina; TZP: piperacillina/tazobactam; MIC ULI+TZP: MIC di ulifloxacina in associazione; MIC TZP+ULI: MIC di piperacillina/tazobactam in associazione.

doppio disco su piastra usando il cefepime come beta-lattamico indicatore e la produzione di AmpC è stata dimostrata con il test del doppio disco su piastra con la cloxacillina, come già descritto in letteratura [9]. Gli isolati per cui è stata confermata la produzione di ESBL sono stati ulteriormente studiati con la metodica della *colony blot hybridization*, con sonde di DNA dei geni Bla_{TEM}, Bla_{SHV}, e Bla_{CTX-M} [10].
Le MIC per i chinoloni e per piperacillina/tazobactam sono state inizialmente determinate usando il metodo E-test®. Sulla base di dati preliminari di farmacocinetica e farmacodinamica sono stati adottati i seguenti *breakpoints* per l'ulifloxacina: sensibile per valore di MIC≤1 mg/L, intermedio per valore di MIC=2 mg/L, resistente per valore di MIC ≥4 mg/L [11]. Per piperacillina/tazobactam sono stati adottati i *breakpoints* raccomandati dal CLSI [12].
Dopo l'isolamento in coltura da campioni clinici i ceppi sono stati conservati a -80°C in terreno liquido tipo Brain Hearth Infusion addizionato con glicerolo al 10%.
Ulifloxacina (Angelini Farmaceutici, S. Palomba, Roma, Italia) e piperacillina/tazobactam (Sigma, St. Louis MO, Stati Uniti) in polvere sono state impiegate per preparare le soluzioni alle concentrazioni raccomandate dal CLSI, conservate a -20°C per un massimo di due settimane.
La sensibilità verso ulifloxacina e piperacillina/tazobactam è stata poi determinata con il metodo della microdiluizione in brodo secondo le indicazioni del CLSI [12].
Il sinergismo dei due antibiotici in combinazione è stato studiato con il "metodo della scacchiera" o *checkerboard*, incrociando diluizioni scalari dei due antibiotici in terreno liquido Mueller-Hinton con aggiunta di cationi (Oxoid) con un inoculo batterico di $5x10^5$ CFU/ml [12].
Abbiamo calcolato il rapporto tra MIC in combinazione e MIC del farmaco da solo, definito come Concentrazione Inibitoria Frazionata (*fractional inhibitory concentrations*: FIC), e la somma delle FIC dei due farmaci, l'Indice di Concentrazione Inibitoria Frazionata (FICI o ∑FIC), secondo la formula:

$$FICI = \frac{\text{MIC dell'antibiotico A in associazione}}{\text{MIC dell'antibiotico A da solo}} + \frac{\text{MIC dell'antibiotico B in associazione}}{\text{MIC dell'antibiotico B da solo}}$$

L'associazione è stata considerata come sinergica per FICI inferiore o uguale a 0,5; parzialmente sinergica per FICI tra 0,5 e 1; additiva per FICI uguale a 1, indifferente per FICI tra 1 e 4, antagonistica per FICI superiore a 4.
I test sono stati considerati attendibili quando la MIC di ogni antibiotico misurata inizialmente e poi al *checkerboard* non differivano di più di una diluizione.

RISULTATI

La Tabella 1 mostra il sito da cui è stato prelevato il campione, il meccanismo di resistenza e la terapia praticata in precedenza, la sensibilità verso i chinoloni e piperacillina/tazobactam e l'effetto dell'associazione sulle MIC.
Tutti i dieci ceppi batterici sono stati isolati in casi di infezioni gravi o difficili da trattare: 3 casi di infezione del piede diabetico, 2 peritoniti in cirrosi, 2 polmoniti, un caso di endocardite associata a *pace-maker* con batteriemia, un caso di osteomielite, un caso di febbre tifoide non responsiva alla ciprofloxacina. Prima del risultato dell'esame colturale era stata impostata terapia antibiotica empirica con amoxicillina-clavulanato in cinque casi, con ceftriaxone in tre casi, con ceftazidime in un caso e con ciprofloxacina in un altro caso. Tutti i casi erano andati incontro a fallimento terapeutico.
Sei ceppi batterici sono risultati produttori di ESBL di vario tipo e 2 di AmpC.
Tra i chinoloni, l'ulifloxacina è risultata la molecola con valori di MIC più bassi (MIC_{90}: 0,25 mg/L e MIC_{50}: 0,19 mg/L), seguita dalla ciprofloxacina (MIC_{90}: 2 mg/L, MIC_{50}: 0,38 mg/L) e dalla levofloxacina (MIC_{90} 2 mg/L e MIC_{50}: 0,75 mg/L). Per questo è stata scelta l'ulifloxacina per studiarne l'associazione con la piperacillina/tazobactam sugli isolati inclusi nello studio.
L'associazione è risultata pienamente sinergica nei confronti di 5 ceppi, inclusi due ceppi produttori di AmpC e tre ceppi produttori di ESBL, parzialmente sinergica verso tre ceppi, inclusi un ceppo produttore di ESBL e il ceppo di *K. oxytoca* produttore di K1, additiva verso due ceppi produttori di ESBL.
È interessante notare che l'associazione è risultata sinergica anche verso ceppi che mostravano una ridotta sensibilità ai due farmaci singolarmente, in particolare i ceppi 226, 211 e 206 resistenti a piperacillina/tazobactam e il ceppo 202 resistente all'ulifloxacina, che invece risultavano sensibili o intermedi allo stesso farmaco in associazione e con MIC facilmente raggiungibili alle dosi standard.

DISCUSSIONE

Una terapia antibiotica basata sui soli chinoloni può andare facilmente incontro a fallimento clinico per la selezione di ceppi resistenti a causa dell'insorgenza di mutazioni puntiformi in corso di trattamento [13]. La probabilità di successo terapeutico con i chinoloni sembra correlata alla MIC , ma tale informazione non è sempre disponibile nella pratica clinica perché i sistemi automatici studiano solo un numero limitato di concentrazioni del farmaco e spesso non danno un valore preciso di MIC [14]. La piperacillina/tazobactam ha una scarsa efficacia sui ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di AmpC mentre i ceppi produttori di ESBL possono risultare falsamente sensibili *in vitro* per un effetto inoculo. È consigliabile quindi ricorrere ad una terapia d'associazione almeno nelle infezioni gravi per aumentare la probabilità di successo e ridurre il rischio di selezionare ceppi resistenti. Sono stati descritti casi di successo *in vitro* con l'associazione di levofloxacina con imipenem o piperacillina/tazobactam nei confronti di isolati clinici di *E. coli* produttori di ESBL e levofloxacina con imipenem nei confronti di *P. aeruginosa* [15, 16]. In quest'ultimo caso la combinazione dei due farmaci è risultata attiva anche su ceppi che mostravano una ridotta sensibilità ad uno dei due farmaci. Nel nostro studio abbiamo dimostrato *in vitro* il possibile sinergismo dell'associazione di piperacillina/tazobactam e ulifloxacina verso ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di ESBL e AmpC. Riteniamo che in casi selezionati il laboratorio di microbiologia possa utilizzare le tecniche descritte per aiutare in tempo utile il clinico a scegliere la terapia più efficace, ottimizzare le risorse e ridurre il rischio di selezionare germi resistenti.

Key words: ESBL, AmpC, synergism, ulifloxacin, piperacillin/tazobactam.

Finanziamento: nessuna fonte di finanziamento
Conflitti di interesse: il dr Carlo Tascini ha ottenuto grant educazionali da Angelini Farmaceutici. Approvazione del Comitato Etico: non richiesta.

RIASSUNTO

I batteri della famiglia *Enterobacteriaceae* produttori di beta-lattamasi di tipo ESBL e AmpC sono ormai di frequente riscontro nella pratica clinica. I carbapenemici sono gli antibiotici più utilizzati in questi casi e di conseguenza la resistenza a queste molecole è in aumento. È necessario quindi individuare schemi terapeutici efficaci non basati sui carbapenemici. Abbiamo esaminato 10 ceppi di *Enterobacteriaceae* isolati da pazienti già trattati con beta-lattamici o chinoloni senza risposta clinica; 8 di questi isolati erano produttori di ESBL o AmpC. L'ulifloxacina è risultata avere concentrazioni minime inibenti (MIC) inferiori a ciprofloxacina e levofloxacina. La combinazione di piperacillina/tazobactam e ulifloxacina è risultata pienamente sinergica nei confronti di 5 ceppi e parzialmente sinergica verso 3 ceppi. Tale combinazione è risultata sinergica anche nei confronti di 3 ceppi resistenti a piperacillina/tazobactam e un ceppo resistente a ulifloxacina, con MIC in combinazione facilmente raggiungibili con dosi standard. I nostri risultati *in vitro* dimostrano una possibile attività sinergica tra piperacillina/tazobactam e ulifloxacina verso ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di ESBL e AmpC. Studi clinici potrebbero confermarne l'efficacia *in vivo* di questa associazione antibiotica.

SUMMARY

Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and ampicillinase C (AmpC) producing Enterobacteriaceae are nowadays frequently isolated in clinical practice. Carbapenems are generally the drugs of choice in such a case and resistance to these molecules is on the rise. Rationalizing their use is to be considered essential, possibly identifying alternative regimens. We thus examined 10 strains of Enterobacteriaceae isolated from patients previously unsuccessfully treated with a beta-lactam or a quinolone; eight strains were either ESBL or AmpC producers. Ulifloxacin showed minimum inhibitory concentrations (MICs) lower than ciprofloxacin and levofloxacin. Tested with the checkerboard method, the association of ulifloxacin and piperacillin/tazobactam proved fully synergistic on five strains and partially synergistic on three. The above association was fully synergistic towards three strains resistant to piperacillin/tazobactam and one strain resistant to ulifloxacin, with MICs in association easily obtainable at standard doses. Our in vitro study demonstrates a synergistic activity of ulifloxacin and piperacillin/tazobactam in association towards ESBL and AmpC-producing Enterobacteriaceae. Clinical studies are needed to confirm in vivo the effectiveness of this regimen.

BIBLIOGRAFIA

[1] Rossolini G.M., Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empiric therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, suppl 6, 2-8, 2008.

[2] Winkour P.L., Canton R., Casellas R., Casella J.M., Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β-lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* 32, S94-S103, 2001.

[3] Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1109-1117, 2003.

[4] Rossolini G.M. Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1557-1558, 2005.

[5] Pillay T., Pillay D.G., Adhikari M., Sturm A.W. Piperacillina/tazobactam in the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections in neonates. *Am. J. Perinatol.* 15, 47-51, 1998.

[6] Pfaller M.A., Segreti J. Overview of the clinical profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* 42: S153-63, 2006.

[7] Roveta S., Schito A.M., Marchese A., Schito G.C. Microbiological rationale for the utilisation of prulifloxacin, a new fluoroquinolone, in the eradication of serious infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 366-372, 2005.

[8] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disks tests; Approved Standards, *9th ed. CLSI Document M2- A9*, Vol. 26 No 1. Wayne PA: 2006.

[9] Jacoby G.A. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161-182, 2009.

[10] Perilli M., Dell'Amico E., Segatore B., et al. Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 40, 611-614, 2002.

[11] Montanari M.P., Mingoia M., Varaldo P.E. In vitro antibacterial activities of AF3013, the active metabolite of prulifloxacin, against nosocomial and community Italian isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3616-3622, 2001.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility; *CLSI document M100-S19*, Wayne PA; 2009.

[13] Tumbarello M., Sali M., Trecarico E.M., et al. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamases-producing *E. coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3244-3252, 2008.

[14] DeFife R., Scheetz M.H., Feinglass J.M., Postelnick M.J., Scarsi K.K. Effects on difference in MIC values on clinical outcomes in patients with bloodstream infections caused by gram negative organisms treated with levofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 174-179, 2009.

[15] Drago L., de Vecchi E., Nicola L., Legnani D., Lombardi A., Gismondo M.R. In vitro synergy and selection of resistance by fluoroquinolones plus amikacin or β-lactam against extended-spectrum β-lactamases-producing *E. coli*. *J. Chemother.* 17, 46-53, 2005.

[16] Lister P.D., Wolter D.J., Wickman P.A., Reisbig M.D. Levofloxacin/imipenem prevents emergence of high-level resistance among *P. aeruginosa* strains already lacking susceptibility to one or both drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 999-1003, 2006.