

Original

Comparación de la eficacia de quinupristina-dalfopristina en monoterapia y combinada con gentamicina, teicoplanina, imipenem o levofloxacinó en un modelo experimental de endocarditis por *Enterococcus faecium* multirresistente

J. Pérez Salmerón, F. Martínez García, D. Roldán Conesa, I. Lorente Salinas, F. López Fornás, J. Ruiz Gómez, J. Gómez Gómez, M. Segovia Hernández y M. Valdés Chávarri

Servicios de Cardiología y Microbiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia

RESUMEN

La incidencia de infecciones por *Enterococcus faecium* multirresistentes va aumentando a pesar de los avances que se han producido en antibioterapia. Por ello, se necesitan nuevos antibióticos para tratar las infecciones nosocomiales o comunitarias causadas por este microorganismo. El objetivo principal del presente estudio fue comparar la eficacia de quinupristina-dalfopristina (QD), sola o combinada con gentamicina (G), teicoplanina (T), imipenem (I) o levofloxacinó (L), en un modelo de endocarditis experimental en conejos por *E. faecium* multirresistente. Se utilizaron 110 animales, 28 como grupo control y 82 como grupos terapéuticos, que fueron G1: 18 animales con QD (30 mg/kg/8 h); G2: 18 con QD+G (6 mg/kg/12 h); G3: 16 con QD+T (20 mg/kg/12 h); G4: 14 con QD+I (60 mg/kg/8 h); y G5: 16 con QD+L (20 mg/kg/12 h). Se valoró la respuesta terapéutica comparando la concentración de *E. faecium* en las vegetaciones cardíacas expresada como \log_{10} de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC/g). Se realizaron pruebas de cinética de letalidad bacteriana para las asociaciones que mostraron mejor comportamiento in vivo: QD + I y QD + L. El patrón de sensibilidad de la cepa utilizada fue: sensible para L, intermedia para QD, resistente para T e I, y sin resistencia de alto grado para G. El tratamiento con QD logró una reducción significativa ($p < 0.001$) en las UFC/g respecto al grupo control (9,49 frente a 7,31). No hubo diferencias significativas entre los grupos G1 (QD sola), G2 (QD + G) y G3 (QD + T), consiguiendo estos tres grupos una reducción significativa respecto del grupo control ($p < 0.001$). No hubo diferencias entre G4 (QD + I) y G5 (QD + L). Estos dos grupos se mostraron como los más eficaces en reducir la media de UFC/g en las vegetaciones cardíacas (G4: 4,38 y G5: 4,04), con $p < 0.0001$ respecto al grupo control y $p < 0.001$ respecto a G1, G2 y G3. No se detectó ningún cambio en la CMI de QD durante el tratamiento. Sólo la curva de letalidad correspondiente a la concentración de I de 32 mg/l (0,25 x CMI) con QD 1 mg/l (0,25 x CMI) presentó una curva descendente a las 4 y 8 horas, sugiriendo una sinergia precoz que se perdió a las 8 horas. A la vista de estos resultados, la combinación de QD con I o L podría considerarse como alternativa terapéutica en la endocarditis por *E. faecium* multirresistente.

Palabras clave: Endocarditis infecciosa experimental - *Enterococcus faecium* multirresistente - Quinupristina-dalfopristina - Gentamicina - Teicoplanina - Imipenem - Levofloxacinó

Comparative study of treatment with quinupristin-dalfopristin alone or in combination with gentamicin, teicoplanin, imipenem or levofloxacin in experimental endocarditis due to a multidrug-resistant *Enterococcus faecium*

SUMMARY

The incidence of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* is increasing despite advances in antibacterial therapy. Thus, new antibiotics are required to treat hospital- or community-acquired infections caused by these multidrug-resistant organisms. The aim of this study was to compare the therapeutic efficacy of quinupristin-dalfopristin (QD) alone, or in combination with gentamicin (G), teicoplanin (T), imipenem (I) or levofloxacin (L) against a strain of multidrug-resistant *E. faecium* in an experimental model of aortic valve endocarditis in rabbits. The study group consisted of 28 control animals. Eighty-two animals were treated with one of the following antibiotic regimens: G1: 18 animals QD (30 mg/kg/8 h); G2: 18 animals QD+G (6 mg/kg/12 h); G3: 16 animals QD+T (20 mg/kg/12 h); G4: 14 animals QD+I (60 mg/kg/8 h); and G5: 16 animals QD+L (20 mg/kg/12 h). The response to therapy was determined by the comparison of the number of CFU/g of *E. faecium* in each vegetation. In vitro, time-kill studies looking for synergy for the combinations that showed better efficacy in vivo were done. The sensitivity of the strain was intermediate to QD, resistant to T and I, and sensitive to L. There was no high-level resistance to G. QD alone revealed a significant decrease ($p < 0.001$) in the CFU/g in the control group (9.49 vs. 7.31). There were no differences in the average of CFU/g between the QD alone (G1), QD+G (G2) and QD+T (G3) groups. These three groups revealed a significant difference in decrease of CFU/g respect of the group control ($p < 0.001$). There were no differences in the average of CFU/g between QD+I (G4) and QD+T (G5). These two groups revealed the greatest decrease in average CFU/g (G4: 4.38 and G5: 4.04) with differences respect of the group control ($p < 0.0001$) and respect of the groups G1, G2 and G3 ($p < 0.001$). We did not detect any alteration of MIC from QD in the course of the treatment for either of the final isolations. Only the time kill corresponding to concentrations of I 32 mg/l (0.25 x MIC) and QD 1 mg/l (0.25 x MIC) presents a descending slope in the curve at 4 and 8 h, suggesting an early synergy phenomenon, which was lost after 8 h. In light of these results, the combination QD with I and L may be considered suitable alternatives for the treatment of multiresistant *E. faecium*.

Key words: Experimental endocarditis - Multiresistant *Enterococcus faecium* - Quinupristin-dalfopristin - Gentamycin - Teicoplanin - Imipenem - Levofloxacin

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la incidencia de infecciones por *Enterococcus faecium* está aumentando a pesar de los avances en terapéutica antimicrobiana. Este microorganismo con frecuencia es resistente a muchos de los antibióticos existentes, por lo que las infecciones que produce son a menudo extremadamente difíciles de tratar, incluyendo bacteriemias y endocarditis (1). Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos antibióticos que faciliten el tratamiento de las infecciones hospitalarias o comunitarias por él producidas.

Quinupristina-dalfopristina se compone de dos derivados semisintéticos de la pristinamicina en una relación 30:70. Es la primera combinación de estreptograminas hidrosolubles desarrollada para uso intravenoso en clínica humana (2), que impide el desarrollo bacteriano al bloquear la formación del enlace peptídico entre la cadena de péptidos en desarrollo, mediante la inhibición de la fijación del sustrato por la dalfopristina (estreptogramina del grupo A) y la inhibición de la elongación de la cadena polipeptídica por la quinupristina (estreptogramina del grupo B). Las dos estreptograminas, quinupristina y dalfopristina, poseen actividad bacteriostática contra las bacterias grampositivas; sin embargo, cuando se combinan, los componentes actúan de forma sinérgica, inhibiendo tanto la fase precoz como la

tardía de la síntesis proteica bacteriana, consiguiendo una actividad bactericida contra gran parte de las cepas de estafilococos y estreptococos, con una actividad entre 8 y 16 veces mayor que la de sus dos componentes por separado (3-5). Son diversos los modelos animales utilizados para el estudio de la eficacia *in vivo*, así como de las propiedades farmacocinéticas de quinupristina-dalfopristina. Los modelos experimentales de endocarditis en ratas y conejos son modelos ya establecidos que intentan reproducir las condiciones de inicio y progresión de esta infección en los humanos (6).

El objetivo principal del presente estudio fue comparar la eficacia terapéutica de la asociación quinupristina-dalfopristina (QD) en monoterapia y combinada con gentamicina (G), teicoplanina (T), imipenem (I) o levofloxacin (L) frente a una cepa multirresistente de *E. faecium* en un modelo experimental de endocarditis sobre válvula aórtica en conejos.

MATERIAL Y MÉTODO

Microorganismo

La cepa de *E. faecium* empleada fue aislada en varios hemocultivos de una mujer de 67 años que ingresó con fallo renal y fiebre.

Estudios *in vitro*

Valoración de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se define la CMI como la concentración más baja de antibiótico que inhibe el crecimiento de la bacteria. Se utilizaron tres métodos diferentes: microdilución en caldo (siguiendo las normas del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* –NCCLS– de Estados Unidos de América) (7), *E-test*[®] (AB-Biodisks, Solna, Sweden) y macrodilución en caldo, según recomendaciones del NCCLS (7).

Cinética de letalidad bacteriana

Se realizaron pruebas de cinética de letalidad bacteriana para las asociaciones que mostraron mejor comportamiento *in vivo*: QD+I y QD+L, siguiendo las normas del NCCLS (8). Con esta técnica se estudian los efectos bactericidas en el tiempo de dos antibióticos realizando curvas de letalidad para los dos fármacos por separado, así como con un tercer tubo con ambos juntos. Las curvas de muerte suministran una información dinámica de la actividad bactericida. El procedimiento es conceptualmente simple, pero incómodo y laborioso. Si ambos fármacos ejercen una actividad bactericida, puede ser difícil separar los efectos aditivos de los sinérgicos. Se dice que hay actividad sinérgica cuando se produce un aumento de la destrucción bacteriana de por lo menos 100 veces (≥ 2 logaritmos en base 10) la producida por el antibiótico más activo. Si la acción bactericida observada difiere en menos de 10 veces la del fármaco más activo, el efecto es aditivo o autónomo.

Endocarditis experimental

Todos los animales estudiados fueron tratados según los Códigos y Prácticas para el Uso y Cuidado de Animales en Procedimientos Científicos, de 1989.

La endocarditis fue inducida en 110 conejos de la raza New Zealand, con un peso medio de 2,2 kg, usando la técnica de Garrison y Freedman (9) modificada por Durack y Beeson (10). Los conejos fueron preanestesiados con clorpromazina a razón de 3 mg/kg de peso, por vía intramuscular, unos 15 minutos antes de la anestesia, y posteriormente anestesiados mediante la administración intravenosa lenta, a través de una vena marginal de la oreja, de ketamina a razón de 20 mg/kg de peso. Tras ello se procedió a rasurar la cara anterior del cuello y a pincelarla ampliamente con povidona yodada. El conejo se colocó en posición de decú-

bito supino, inmovilizando las cuatro extremidades mediante cintas. Se practicó una cervicotomía paratraqueal derecha con disección y exteriorización de la arteria carótida común derecha. A continuación se realizó una arteriotomía transversal del vaso, introduciendo un catéter estéril de polietileno (*Centracath*[®], Vigon; Ecouen, France) con un diámetro interno de 0,8 mm y externo de 1,2 mm, avanzándolo hasta el ventrículo izquierdo. Se consideró que el catéter estaba en la posición correcta cuando transmitía el latido cardiaco de forma constante. El extremo craneal del catéter se seccionó a nivel del vaso, se selló su luz a la llama, dejando asomar aproximadamente 0,5 cm a fin de fijarlo a la arteria mediante una ligadura de seda. Finalmente se procedió al cierre y sutura de la herida por planos. El catéter se mantuvo en esta posición durante todo el experimento. Los animales fueron infectados 36 horas después de la colocación del catéter mediante la administración intravenosa, a través de una vena marginal de la oreja, de 1 ml de solución salina al 0,9% que contenía un inóculo de aproximadamente 10^8 UFC de un cultivo fresco del microorganismo. El día anterior a la preparación del inóculo se procedió a su resiembra en placas de agar sangre, incubándolas a 37 °C durante 24 horas. A partir de este cultivo se realizó una suspensión en 10 ml de solución salina al 0,9%, alcanzando una turbidez del 1 de la escala de McFarland, equivalente a 10^8 UFC/ml. La infección de los conejos se efectuó inmediatamente después de preparado el inóculo.

Hemocultivos

A las 48 horas de infectado el animal, inmediatamente antes del inicio del tratamiento antibiótico, se tomaron muestras de sangre para hemocultivo a todos los animales, obteniendo 4 ml a través de una vena marginal de la oreja e inoculándolos en frascos *Vital Aer*[®] (bioMérieux, France), siendo inmediatamente transportados al laboratorio y colocados en una estufa a 37 °C. A las 24 horas se realizó una primera observación del aspecto macroscópico de los frascos, comprobando la presencia o no de turbidez, y procediendo a tomar asépticamente una muestra de todos ellos y a sembrarla en placas con agar sangre. Los hemocultivos se consideraron positivos cuando a las 24-48 horas se evidenció la presencia de colonias y tinción de Gram de aspecto característico, con prueba de la catalasa negativa. Fueron excluidos del estudio los conejos con hemocultivo negativo y aquellos en que el crecimiento bacteriano obtenido no correspondía con el microorganismo estudiado, o bien presentaba más de una especie bacteriana (hemocultivo contaminado).

Tratamiento antibiótico

Los animales fueron divididos en seis grupos: 28 en el grupo control (Gc), 18 en el grupo de QD sola (G1), 18 en el de QD+G (G2), 16 en el de QD+T (G3), 14 en el de QD+I (G4) y 16 en el de QD+L (G5). Se inició el tratamiento antibiótico a las 48 horas de la inoculación bacteriana, inmediatamente tras la extracción de sangre para el cultivo. Los animales fueron tratados durante cinco días con las siguientes dosis y vías de administración: QD (Aventis Pharma) 30 mg/kg/8 h, vía intramuscular; G (Braun) 6 mg/kg/12 h, vía intramuscular; I (Merck Sharp & Dohme) 60 mg/kg/8 h, vía intramuscular; L (Aventis Pharma) 20 mg/kg/12 h, vía intramuscular. Los conejos del grupo control no recibieron tratamiento antibiótico.

Examen de las vegetaciones

Entre 8 y 12 horas después de la administración de la última dosis de los antibióticos los animales fueron sacrificados mediante inyección intravenosa rápida, por una vena marginal de la oreja, de 150 mg de tiopental sódico (Abbott Laboratorios, Chicago, IL, USA). Sólo aquellos animales que sobrevivieron hasta el momento del sacrificio fueron incluidos en el estudio. El examen posmortem se realizó inmediatamente después del sacrificio. Tras abrir la caja torácica se extrajo el corazón y se abrieron la raíz aórtica y el ventrículo izquierdo, comprobando la adecuada posición del catéter y el diagnóstico macroscópico de endocarditis mediante la visualización de las vegetaciones características. Se excluyeron aquellos conejos que presentaban una inadecuada posición del catéter o que no tenían vegetaciones. Tras la limpieza de los restos hemáticos de la cavidad cardíaca con solución salina al 0,9%, se extrajeron asépticamente las vegetaciones y se pesaron en una balanza de precisión. Después fueron homogeneizadas con 0,9 ml de solución salina al 0,9%, en un homogeneizador estéril Povel®. Posteriormente se realizaron diluciones en solución salina desde 1:10 hasta 1:10.000.000, y se sembraron 100 µl de cada una de las diluciones y del homogeneizado sin diluir en placas con agar sangre. Tras un periodo de incubación de 48 horas a 37 °C se efectuó el recuento de colonias y el resultado se expresó como log₁₀ del número de UFC por gramo de vegetación. El crecimiento de una sola colonia equivale a 100 UFC/g, por lo que el límite de detección del método es de 100 bacterias por mililitro de homogeneizado de verrugas cardíacas, y el valor asignado a aquellos cultivos estériles (curaciones) fue de 2, que corresponde al valor del log₁₀ de 100. Los microorganismos se identificaron por la presencia de colonias y la tinción de Gram de aspecto ca-

racterístico, con prueba de la catalasa negativa. Finalmente, a todos los aislamientos se les realizó determinación de su CMI para QD mediante tiras de *E-test*®, a fin de descartar mutaciones en el transcurso del tratamiento.

Valoración de la respuesta terapéutica

Para la valoración de la respuesta terapéutica se utilizó como parámetro la concentración de *E. faecium* en las vegetaciones cardíacas, expresada como logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). Treinta animales fueron excluidos del estudio: 11 del Gc (seis por muerte antes del sacrificio, cuatro por más de una especie bacteriana en el hemocultivo y uno por inadecuada posición del catéter); seis del G1 (QD) (cinco por muerte antes del sacrificio y uno por inadecuada posición del catéter); tres del grupo G2 (GD+G) (todos por muerte antes del sacrificio); cuatro del G3 (QD+T) (tres por muerte antes del sacrificio y uno por inadecuada posición del catéter); dos del G4 (QD+I) (muertos antes del sacrificio); y cuatro del G5 (QD+L) (tres por muerte antes del sacrificio y uno por inadecuada posición del catéter). Por tanto, finalmente fueron incluidos en el análisis 80 conejos.

Concentraciones de antibióticos

Las concentraciones de los antibióticos en suero se determinaron utilizando 1 ml de sangre de cada conejo, extraída de la vena marginal de la oreja en el momento previo a la tercera dosis del cuarto día de tratamiento antibiótico (valor valle) y 60 minutos después de la administración de la mencionada dosis (valor pico). Para la determinación de QD las muestras se introdujeron en un tubo que contenía 0,5 ml de ácido clorhídrico 0,25 N; la mezcla se agitó manualmente y luego se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue pasado a un tubo estéril y congelado inmediatamente a -80 °C. Las concentraciones antibióticas se determinaron mediante bioensayo para I, L y QD, con el medio *Bacto Agar Mueller-Hinton* (Difco, Detroit, Michigan, USA) y utilizando diferentes microorganismos según el antibiótico a evaluar. Para la determinación de I y L se usó *Escherichia coli* ATCC 25992 y para la de QD *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (11, 12). El medio para las placas se preparó con *Bacto Mueller-Hinton*; las placas fueron preparadas sobre una superficie nivelada para conseguir una profundidad uniforme de 4 mm, y posteriormente fueron sembradas con *E. coli* o *Staphylococcus aureus* con un inóculo ajustado a la turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Las soluciones estándar del antimio-

crobianos se prepararon utilizando como diluyente suero de conejo libre de antimicrobianos. Para I se hicieron diluciones progresivas que contenían 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/l. Para L se prepararon diluciones de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 mg/l. Para QD las diluciones fueron de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,06 mg/l. Sobre la superficie del agar, previamente sembrado con la cepa correspondiente, se aplicaron discos de papel estériles carentes de antibiótico (*Sterile Blanks*, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) con 5 µl de cada una de las alícuotas referidas en los párrafos anteriores. El análisis se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones. De igual modo se impregnaron discos con las muestras correspondientes a los niveles pico y valle y homogeneizado de las vegetaciones. Las placas fueron incubadas a 35 °C en una atmósfera aerobia durante 24 horas, para que se visualizaran con exactitud zonas medibles de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de papel de filtro. El diámetro medio de las zonas de inhibición y según las diluciones empleadas, permitió trasladar los datos a un papel milimetrado y trazar una curva estándar y gráficas de regresión lineal, sobre las que, multiplicando por el factor de dilución, se pudo calcular la concentración sérica de los diferentes antimicrobianos en estudio. Para la determinación de G se utilizó un sistema automático de enzimoanálisis competitivo con anticuerpos monoclonales en un equipo *ACA IV Discrete Clinical Analyzer* (Dabe Boehringer). Para la determinación de T se utilizó un sistema automático de inmunoensayo (*TDX System*, Abbott).

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. La normalidad de las variables se comprobó utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Tanto el peso de las vegetaciones como el \log_{10} de las UFC/g siguieron una distribución normal, por lo que fueron tratadas en el análisis ulterior con métodos paramétricos. Para la compa-

ración de medias entre cada grupo de tratamiento y el grupo control se utilizó la prueba de la *t* de Student. La comparación de medias entre los diferentes grupos tratados G3-G5 se realizó mediante la prueba de la *t* de Student. Las comparaciones múltiples de las medias de los grupos con más asociaciones diferentes (G2-G5) se realizaron mediante la prueba de Bonferroni. Se consideró que existía significación estadística con una $p < 0.05$. El análisis estadístico se efectuó utilizando el programa SPSS (para Windows, versión 7.5.2S).

RESULTADOS

Estudios *in vitro*

Sensibilidad antibiótica

De todos los antibióticos empleados, el microorganismo sólo era sensible a L, presentaba sensibilidad intermedia a QD y era claramente resistente a T e I. No había resistencia de alto grado a G. El fenotipo de resistencia al glucopéptido fue *vanA*. QD se comportaba como bacteriostático para nuestro microorganismo.

CMI, peso de las vegetaciones y concentraciones de antibióticos

La Tabla 1 muestra las CMI de los diferentes antibióticos, el peso de las vegetaciones y las concentraciones pico y valle de cada antibiótico en suero. No encontramos diferencias significativas en el peso de las vegetaciones entre los diferentes grupos de antibióticos.

Cinética de letalidad bacteriana

Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados de las curvas de letalidad. Las curvas de QD + I o L, no mostraron fenómenos de sinergia ni antagonismo. Sólo la curva correspondiente a I 32 mg/l (0,25 \times CMI) más QD 1 mg/l (0,25

Tabla 1. Comparación de las CMI, del peso de las vegetaciones y de las concentraciones séricas pico y valle de los antibióticos.

Grupo	CMI (mg/l)	Peso vegetaciones (mg)	Concentración sérica, pico/valle (mg/l)*
G1: QD	2-4	104,06 \pm 55,21	3,2 \pm 0,5/<0,1
G2: QD+G	4	111,00 \pm 87,30	7,6 \pm 0,8/<0,1
G3: QD+T	>256	102,20 \pm 51,11	59,6 \pm 7,8/36,1 \pm 9,9
G4: QD+I	128	105,75 \pm 58,46	73,2 \pm 15,4/<3,125
G5: QD+L	1-2	108,25 \pm 65,46	5,6 \pm 0,9/0,4 \pm 0,2

*Media \pm desviación estándar.

Tabla 2. Curvas de letalidad de quinupristina-dalfopristina e imipenem.

	0 horas	4 horas	8 horas	24 horas
Control	5,09	7,30	7,60	7,90
Quinupristina-dalfopristina 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,09	6,60	6,72	7,80
Quinupristina-dalfopristina 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,09	5,32	5,60	7,42
Quinupristina-dalfopristina 4 mg/l (CMI)	5,09	5,15	4,60	4,70
Imipenem 32 mg/l (0,25 × CMI)	5,09	6,51	6,80	7,90
Imipenem 64 mg/l (0,5 × CMI)	5,09	6,40	6,40	6,40
Imipenem 128 mg/l (CMI)	5,09	4,30	4,08	4,86
Imipenem 32 mg/l (0,25 × CMI) + QD 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,09	5,90	6,10	7,30
Imipenem 32 mg/l (0,25 × CMI) + QD 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,09	4,90	4,38	7,08
Imipenem 32 mg/l (0,25 × CMI) + QD 4 mg/l (CMI)	5,09	5,15	4,30	4,30
Imipenem 64 mg/l (0,5 × CMI) + QD 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,09	5,41	5,51	6,30
Imipenem 64 mg/l (0,5 × CMI) + QD 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,09	4,94	4,90	6,30
Imipenem 64 mg/l (0,5 × CMI) + QD 4 mg/l (CMI)	5,09	5,08	4,90	4,55
Imipenem 128 mg/l (CMI) + QD 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,09	4,96	4,51	4,78
Imipenem 128 mg/l (CMI) + QD 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,09	5,08	4,90	4,38
Imipenem 128 mg/l (CMI) + QD 4 mg/l (CMI)	5,09	4,68	4,90	4,15

Tabla 3. Curvas de letalidad de quinupristina-dalfopristina y levofloxacin.

	0 horas	4 horas	8 horas	24 horas
Control	5,78	7,40	7,60	7,90
Quinupristina-dalfopristina 0,25 mg/l (1/16 × CMI)	5,78	7,10	7,20	7,40
Quinupristina-dalfopristina 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,78	6,79	6,81	7,34
Quinupristina-dalfopristina 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,78	5,40	5,72	7,50
Quinupristina-dalfopristina 2 mg/l (0,5 × CMI)	5,78	5,26	5,40	7,30
Quinupristina-dalfopristina 4 mg/l (CMI)	5,78	5,08	5,02	5,14
Levofloxacin 0,5 mg/l (0,5 × CMI)	5,78	6,11	6,69	7,20
Levofloxacin 1 mg/l (CMI)	5,78	4,74	4,74	4,63
Levofloxacin 0,5 mg/l (0,5 × CMI) + QD 0,25 mg/l (1/16 × CMI)	5,78	6,15	6,50	7,20
Levofloxacin 0,5 mg/l (0,5 × CMI) + QD 0,5 mg/l (0,125 × CMI)	5,78	5,94	6,00	7,30
Levofloxacin 0,5 mg/l (0,5 × CMI) + QD 1 mg/l (0,25 × CMI)	5,78	5,20	5,10	7,10
Levofloxacin 0,5 mg/l (0,5 × CMI) + QD 2 mg/l (0,5 × CMI)	5,78	5,08	5,00	7,00
Levofloxacin 1 mg/l (CMI) + QD 0,25 mg/l (1/16 × CMI)	5,78	5,48	5,30	5,00
Levofloxacin 1 mg/l (CMI) + QD 2 mg/l (0,5 × CMI)	5,78	5,04	5,00	4,90
Levofloxacin 1 mg/l (CMI) + QD 4 mg/l (CMI)	5,78	4,90	4,68	4,68

× CMI) presenta una pendiente descendente entre las 4 y 8 horas, de forma diferente a la pendiente ascendente cuando cada uno de estos antibióticos se utiliza de forma aislada. Aunque no alcanza una diferencia de 2 log₁₀, el fenómeno de la sinergia es evidente entre las 4 y las 8 horas, desapareciendo pasadas 8 horas (Fig. 1).

Endocarditis experimental

La Fig. 2 muestra la concentración bacteriana en las vegetaciones cardiacas (UFC/g) expresada como log₁₀ de todos los grupos. Se encontró *E. faecium* en todas las vegetaciones de todos los conejos del grupo control, lo que indica que no hubo curaciones espontáneas. Todos los antibióti-

cos utilizados, en mayor o menor medida, reducían significativamente la concentración bacteriana en las vegetaciones. Los valores más altos se encontraron en el grupo control y los más bajos en los grupos 4 y 5 (QD+I y QD+L). QD en monoterapia demostró una reducción significativa (p < 0.001) de la concentración bacteriana respecto del grupo control. No hubo diferencias al comparar entre sí los grupos tratados G1-G3, consiguiendo igualmente estos tres grupos una reducción significativa respecto del grupo control (p < 0.001). No hubo diferencias significativas entre G4 y G5. Ambos grupos mostraron una media de concentración de UFC/g inferior a la del resto de los grupos (p < 0.0001 respecto al grupo control y p < 0.001 respecto a G1, G2 y G3). Fueron, por tanto, los dos grupos más eficaces en re-

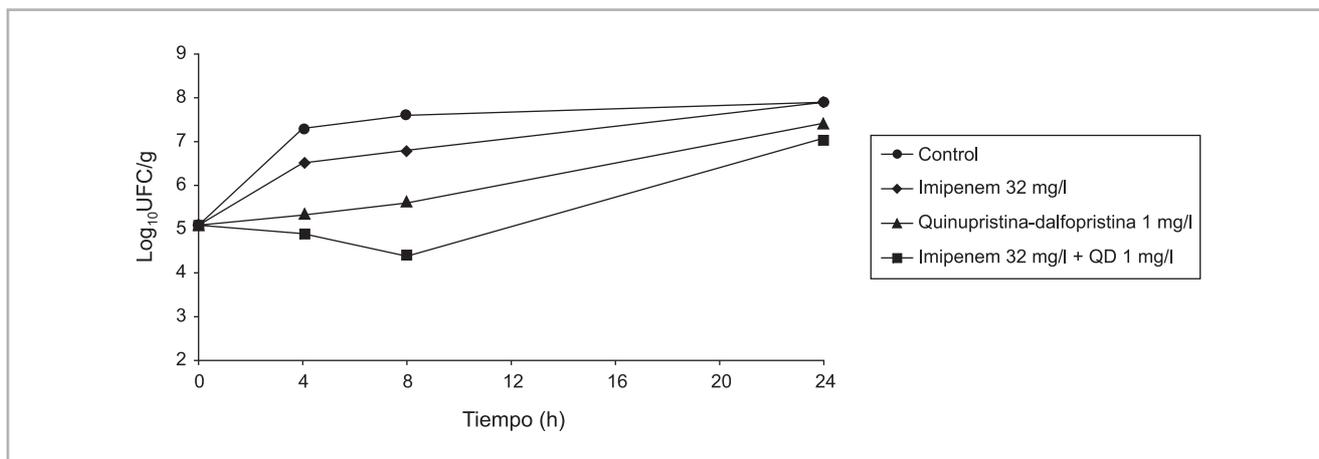


Figura 1. Curvas de letalidad de imipenem 32 mg/l (0,25 x CMI) y quinupristina-dalfopristina 1 mg/l (0,25 x CMI).

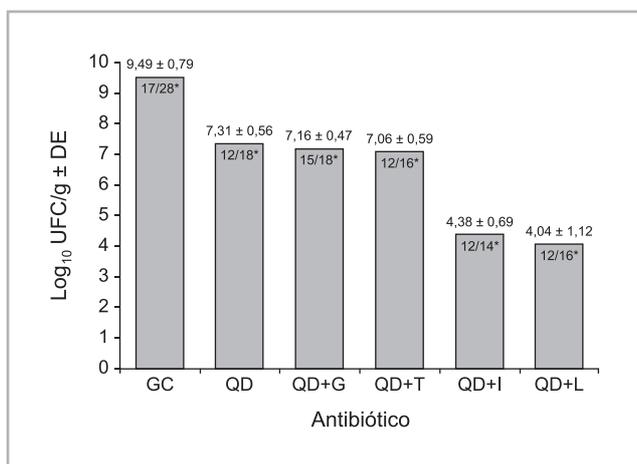


Figura 2. GC: grupo control; QD: quinupristina-dalfopristina; G: gentamicina; T: teicoplanina; I: imipenem; L: levofloxacino. *Número de animales incluidos/número total de animales en ese grupo.

ducir el número de unidades formadoras de colonias por gramo de vegetación cardiaca en nuestro modelo experimental. No se encontraron alteraciones de la CMI para el microorganismo en el transcurso del tratamiento, por lo que podemos afirmar que no se produjeron mutaciones espontáneas durante nuestro estudio.

DISCUSIÓN

QD en monoterapia redujo significativamente la concentración de *E. faecium* en las vegetaciones cardiacas en comparación con el grupo control. Sin embargo, el hecho de que a los cinco días de tratamiento la concentración bacteriana persista en 7,31 unidades logarítmicas de UFC/g levanta dudas acerca de su eficacia en monoterapia en las in-

fecciones graves por *E. faecium* con sensibilidad intermedia a este antimicrobiano.

Aunque QD ha demostrado un efecto bactericida frente a *S. aureus* y otros cocos grampositivos, sobre *E. faecium* se comporta como bacteriostático (13, 14). Linden y cols. (15), en un trabajo retrospectivo sobre infecciones sistémicas por *E. faecium* multirresistente tratadas con QD, observan una tasa de respuesta global del 66%, aunque cae al 20% en pacientes con endocarditis (15). Otros autores (16, 17) también observan fallos terapéuticos al utilizar QD en monoterapia o combinada con otros antimicrobianos en endocarditis por *E. faecium* resistente a la vancomicina. McNeil y cols. (16) describen un paciente con bacteriemia persistente por *E. faecium* multirresistente a pesar de recibir tratamiento durante más de dos meses con QD, en asociación inicialmente con cloranfenicol y después con doxiciclina; y Safdar y cols. (17) describen otro caso similar de una endocarditis sobre válvula protésica, con persistencia de la bacteriemia por *E. faecium* multirresistente después de 12 días de monoterapia con QD. Aunque se ha publicado la aparición de resistencias durante el tratamiento con QD (18-22), nosotros no hemos encontrado variaciones en la CMI en ninguno de los grupos. En nuestra serie, los grupos QD+I (G4) y QD+L (G5) se comportaron de modo semejante y fueron mejores que el resto de los grupos (G1-G3). Aunque no hemos encontrado bibliografía con estas combinaciones, pensamos que ambas pueden ser de utilidad para el tratamiento de las infecciones graves por *E. faecium* multirresistente, pero se precisan estudios que confirmen su eficacia clínica. El hecho de que QD+I redujera en casi 3 unidades logarítmicas la concentración bacteriana en las vegetaciones con respecto a QD en monoterapia (7,31 frente a 4,38), a pesar de que nuestro microor-

ganismo era claramente resistente al imipenem, tiene un gran interés. Aunque la sinergia de QD+I se ha descrito para otros microorganismos diferentes de *E. faecium*, es la primera comunicación de este fenómeno para *E. faecium* multirresistente (23, 24). El análisis de la curva de letalidad para concentraciones de I de 32 mg/l ($0,25 \times \text{CMI}$) y de QD de 1 mg/l ($0,25 \times \text{CMI}$) muestra una curva descendente para la asociación QD+I hasta las 8 horas, a diferencia de la pendiente ascendente de cada uno de los antibióticos solos, pero la pendiente se hace ascendente a partir de la octava hora hasta las 24 horas. Es razonable pensar que una administración repetida de ambos antibióticos cada 8 horas, tal como se hizo en nuestro modelo experimental, podría prolongar la pendiente descendente de la curva correspondiente a la asociación QD+I y explicar con ello los resultados obtenidos en el modelo experimental *in vivo*. Precisamente, las concentraciones para las cuales encontramos este fenómeno de sinergia se corresponden con las alcanzadas en clínica humana con estos dos antibióticos (24-30). Un fenómeno de sinergia similar ha sido comunicado por Eliopoulos y cols. (31). En el artículo se analizan 50 cepas de *E. faecium* multirresistentes mediante el método de damero, buscando fenómenos de sinergia de QD con cloranfenicol, doxiciclina, ampicilina, imipenem, vancomicina y teicoplanina, observando sinergia sólo en una de las 50 cepas analizadas mediante el método de damero, para concentraciones de QD de 0,5 mg/l combinada con 32 mg/l de imipenem. Las CMI para esa cepa en el mismo damero eran de 2 y 128 mg/l para QD e I, respectivamente, es decir, $0,25 \times \text{CMI}$ para ambos antibióticos. Por lo tanto, los parámetros de CMI son exactamente los mismos que los utilizados en nuestra curva de muerte analizada anteriormente.

El buen comportamiento de QD+L era de esperar dada la buena actividad *in vitro* del levofloxacino frente a nuestro microorganismo. Chambers y cols. (26) observaron una excelente respuesta a L en un modelo experimental de endocarditis en conejos cuando el microorganismo causal era *S. aureus*; sin embargo, resulta ineficaz cuando se trata de *Streptococcus viridans*. En nuestro estudio se demuestra la buena actividad de L frente a nuestra cepa de *E. faecium* multirresistente, aunque son necesarios otros estudios que confirmen esta buena actividad en colecciones amplias de esta especie.

La asociación de T o G con QD en nuestro estudio no mostró fenómeno de sinergia. En el artículo de Eliopoulos y cols. (31) se refiere que la combinación QD+T fue sinérgica en dos de las 50 cepas y antagónica en tres. Ambas situaciones se dieron sólo en las cepas sensibles a T, sin observar fenómenos de sinergia ni antagonismo en ninguna de las cepas resistentes a T. Nuestra cepa, que era resisten-

te a T, tampoco mostró fenómenos de sinergia ni antagonismo, en línea con lo publicado por estos autores.

Finalmente, las concentraciones pico y valle de los antibióticos administrados fueron las esperadas, mostrando resultados similares a los publicados en la bibliografía consultada (24-30).

Aunque hemos usado el modelo experimental de endocarditis infecciosa en conejos por su simplicidad, reproducibilidad, relativo bajo coste, posibilidad de utilizar un gran número de animales y semejanza histológica con la endocarditis humana, existen diferencias entre la endocarditis humana y la experimental, por lo que la simple extrapolación de estos resultados a la clínica diaria ha de hacerse con cautela.

Correspondencia: Mariano Valdés Chávarri, C/Acislo Díaz nº 2, 14 A, 30005 Murcia. Tel.: +34 629 656 731; Fax: +34 968 369 9558; e-mail: valdeschavari@valdeschavari.e.telefonica.net

BIBLIOGRAFÍA

1. Wade, J.J., Rolando N., Casewell, M.W., Williams, R. *Serious infection caused by multiply-resistant Enterococcus faecium*. Microbial Drug Resistance 1995; 1: 241-243.
2. Pepper, K., Bouanchaud, D. *In vitro activity of quinupristin/dalfopristin (RP 59500) against Gram-positive pathogens – An update*. Exp Opin Invest Drugs 1996; 5: 357-363.
3. Barrière, J.C., Bouanchaud, D.H., Paris, J.M., Rolin, O., Harris, N.V., Smith, C. *Antimicrobial activity against Staphylococcus aureus of semisynthetic injectable streptogramins: RP 59500 and related compounds*. J Antimicrob Chemother 1992; 30 (Suppl. A): 1-8.
4. Bouanchaud, D.H. *In-vitro and in-vivo synergic activity and fractional inhibitory concentration (FIC) of the components of a semisynthetic streptogramin RP 59500*. J Antimicrob Chemother 1992; 30 (Suppl. A): 95-100.
5. Neu, H.C., Chin, N., Gu, J. *The in-vitro activity of new streptogramin, RP 59500, RP 57669 and RP 54476, alone and in combination*. J Antimicrob Chemother 1992; 30 (Suppl. A): 83-94.
6. Zac, O., O'Reilly, T. *Animals models in the evaluation of antimicrobial agents*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1527-1531.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th informational supplement. Approved standard M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA 1997.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, vol. 12, nº 19. Tentative guideline M26-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA 1992.
9. Garrison, P.K., Freedman, L.R. *Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from the placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart*. Yale J Biol Med 1970; 42: 394-410.
10. Durack, D.T., Beeson, P.B. *Experimental bacterial endocarditis I. Colonization of a sterile vegetation*. Br J Exp Pathol 1972; 53: 44-49.

11. Sabath, L.D., Anhalt, P. *Assay of antimicrobial*. En: Lennette, E.H., Balows, A., Hansler, W.J., Truant, J.P. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC 1980; 485-490.
12. Edberg, S.C. *The measurement of antibiotic in human body fluids: Techniques and significance*. En: Lorian, S. (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore 1986; 386-476.
13. Matsumura, S.O., Louie, L., Louie, M., Simor, A.E. *Synergy testing of vancomycin-resistant Enterococcus faecium against quinupristin-dalfopristin in combination with other antimicrobial agents*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2776-2779.
14. Caron F., Gold, H.S., Wennersten, C.B., Farris, M.G., Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M. *Influence of erythromycin resistance, inoculum growth phase, and incubation time on assessment of the bactericidal activity of RP 59500 (quinupristin/dalfopristin) against vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 41: 2749-2753.
15. Linden, P.K., Moellering, R.C., Wood, A.C. y cols. *Treatment of vancomycin-resistant Enterococcus faecium infections with quinupristin-dalfopristin*. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1816-1823.
16. McNeil, S.A., Clarck, N.M., Chandrasekar, P.H., Kauffman, C.A. *Successful treatment of vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia with linezolid after failure of treatment with Synercid (quinupristin/dalfopristin)*. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 403-404.
17. Safdar, A., Bryan, C.S., Stinson, S., Saunders, Jr., D.E. *Prosthetic valve endocarditis due to vancomycin-resistant Enterococcus faecium: Treatment with chloramphenicol plus minocycline*. *Clin Infect Dis* 2002; 34: E61-E63.
18. Linden, P.K. *Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections*. *Drugs* 2002; 62: 425-441.
19. Moellering, R.C., Linden, P.K., Reinhardt, J., Blumberg, E.A., Bompert, F., Talbot, H.H. *The efficacy and safety of quinupristin-dalfopristin for the treatment of infections caused by vancomycin-resistant Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 252-261.
20. Chow, J.W., Donahedian, S.M., Zervos, M.J. *Emergence of increased resistance to quinupristin/dalfopristin during therapy for Enterococcus faecium bacteremia*. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 90-91.
21. Millichap, J.T., Ristow, T.A., Noskin, G.A., Peterson, L.R. *Selection of Enterococcus faecium strains with stable and unstable resistance to the streptogramin RP 59500 using stepwise in vitro exposure*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 25: 15-20.
22. Aeschlimann, J.R., Zervos, M.J., Rybak, M.J. *Treatment of vancomycin-resistant Enterococcus faecium with RP 59500 (quinupristin/dalfopristin) administered by intermittent or continuous infusion, alone or in combination with doxycycline, in an in vitro pharmacodynamic infection model with simulated endocardial vegetations*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 2: 2710-2715.
23. Lorian, V., Esanu, Y., Amaral, L. *Ultrastructure alterations of Staphylococcus aureus exposed to RP 59500*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 625-628.
24. Vouillamoze, J., Entenza, J.M., Féger, C., Glauser, M.P., Moreillon, P. *Quinupristin-dalfopristin combined with β -lactam for treatment of experimental endocarditis due to Staphylococcus aureus constitutively resistant to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1789-1795.
25. Caron, F., Pestel, M., Kitzis, M.D., Lemeland, J.F., Humbert, G., Gutmann, L. *Comparison of different β -lactam-glycopeptide-gentamicin combinations for an experimental endocarditis caused by a highly β -lactam-resistant and highly glycopeptide-resistant isolate of Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 1995; 171: 106-112.
26. Chambers, H.F., Liu, Q.X., Chow, L.L., Hackbarth, C. *Efficacy of levofloxacin for experimental aortic-valve endocarditis in rabbits infected with viridans group streptococcus or Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2742-2746.
27. Fantin, B., Leclercq, R., Garry, L., Carbon, C. *Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in Enterococcus faecium on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 931-935.
28. Caron, F., Carbon, C., Gutmann, L. *Triple-combination penicillin-vancomycin-gentamicin for experimental endocarditis caused by a moderately penicillin- and highly glycopeptide-resistant isolate of Enterococcus faecium*. *J Infect Dis* 1991; 164: 888-893.
29. Brandt, C.M., Rouse, M.S., Laue, N., Stratton, C.W., Wilson, W.R., Steckelberg, J.M. *Effective treatment of multidrug-resistant enterococcal experimental endocarditis with combinations of cell wall-active agents*. *J Infect Dis* 1997; 175: 232-233.
30. Entenza, J.M., Caldelari, I., Glauser, M.P., Moreillon, P. *Efficacy of levofloxacin in the treatment of experimental endocarditis caused by viridans group streptococci*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 775-786.
31. Eliopoulos, G.M., Wennersten, C.B. *Antimicrobial activity of quinupristin-dalfopristin combined with other antibiotics against vancomycin-resistant enterococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1319-1324.