

F. López-Fabal  
E. Culebras  
I. Bonilla  
M. Gómez  
J. J. Picazo

# Actividad *in vitro* de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en Unidad de Cuidados Intensivos

Servicio de Microbiología  
Hospital Clínico San Carlos  
Madrid

**Introducción.** Ante el incremento de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y para determinar la posibilidad de que se tratase de un brote epidémico causado por la diseminación de una única cepa, se recogieron 12 muestras consecutivas de distintos pacientes que fueron identificadas y a las que posteriormente se determinó su sensibilidad a los antibióticos utilizados habitualmente para el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo.

**Métodos.** Mediante la amplificación de secuencia basada en la reacción en cadena de la polimerasa (*repetitive sequence-based polymerase chain reaction*, rep-PCR) se determinó la relación clonal entre los aislados utilizando los *primers* BOX y ERIC y se estudió la actividad *in vitro* frente a estas cepas de colistina, rifampicina, doxiciclina y azitromicina para determinar en qué casos la combinación de colistina con alguno de los otros tres antibióticos presentaba actividad sinérgica.

**Resultados.** Los estudios de sensibilidad apuntan a la presencia de varias cepas de *P. aeruginosa* como responsables de las infecciones respiratorias producidas por este microorganismo en la UCI, hecho que fue corroborado mediante los estudios clonales realizados. En los estudios de sinergia las asociaciones de colistina con doxiciclina y con azitromicina presentaron actividad sinérgica para alguno de los aislados.

**Discusión.** Los resultados de los estudios clonales revelan la presencia de cinco clones diferentes entre los aislados seleccionados, por lo que podemos concluir que no se trata de un brote de *P. aeruginosa* en la UCI. La actividad sinérgica de la asociación de colistina con azitromicina, doxiciclina y rifampicina ha sido menor de la esperada y se observa un elevado porcentaje de resultados indiferentes.

**Palabras clave:**

*P. aeruginosa*. Actividad sinérgica. Colistina. Rep-PCR.

Rev Esp Quimioter 2008;21(3):189-193

---

Correspondencia:  
Fátima López-Fabal  
Servicio de Microbiología  
Hospital Clínico San Carlos  
Prof. Martín Lagos, s/n  
28040 Madrid  
Correo electrónico: fatimalopez2010@yahoo.es

## *In vitro* activities of colistin combinations against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the intensive care unit

**Introduction.** As the number of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* has risen in the intensive care unit (ICU) of the San Carlos Clinic Hospital, 12 consecutive isolates from different patients were collected to determine the possibility of an epidemic outbreak caused by the spread of a single strain. We determined the antimicrobial susceptibility to the most common agents used in the treatment of infections caused by this bacteria. The results of susceptibility studies suggest that different strains of *P. aeruginosa* are responsible for the respiratory tract infections in ICU.

**Methods.** The clonal relationship between the isolates using was determined using BOX and ERIC primers by means of repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR). The *in vitro* activity of these strains against colistin, rifampicin, doxycycline and azithromycin was studied to determine in which cases the combination of colistin with any of the other three antibiotics was synergistic.

**Results.** Sensitivity studies point out the presence of several strains of *P. aeruginosa* as the causal agents of respiratory infections produced by this microorganism in the ICU. Combinations of colistin with doxycycline and colistin with azithromycin were synergistic for some isolates in the synergy studies.

**Discussion.** Clonal studies reveal the presence of five different clones among our isolates. Therefore we can conclude that there was no outbreak of *P. aeruginosa* in the ICU. Synergistic activity of combinations of colistin plus azithromycin, colistin plus doxycycline and colistin plus rifampicin was less than expected and a high percentage of indifferent results was observed.

**Key words:**

*P. aeruginosa*. Synergistic activity. Colistin. Rep-PCR.

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales agentes de la infección nosocomial. Está asociado a infecciones complicadas del tracto respiratorio o bacteriemias con altos índices de mortalidad y difíciles de tratar ya que los antibióticos antipseudomonas son limitados (algunos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y polimixinas como último recurso)<sup>1</sup>. Además *P. aeruginosa* presenta una marcada capacidad para adquirir nuevas formas de resistencia, bien por mutaciones, bien por adquisición de nuevos genes<sup>2</sup>. Con frecuencia estos mecanismos aparecen simultáneamente, dando lugar a fenotipos multirresistentes, de lo que se deduce la importancia de los estudios de sensibilidad en la práctica clínica<sup>3</sup>.

El número de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes se ha incrementado notablemente en los últimos años y la actividad de los antibióticos de amplio espectro frente a ellas es cada vez menor, por lo que cada vez con más frecuencia se hace necesario rescatar antibióticos del arsenal terapéutico, como colistina, rifampicina o doxiciclina. Las combinaciones de estos antibióticos, especialmente con colistina, parecen una buena alternativa frente a los aislados multirresistentes<sup>4</sup>.

La antibioterapia combinada es la utilización de más de un agente antimicrobiano en el tratamiento de una infección con el fin de prevenir la emergencia de mutantes resistentes o buscando el efecto sinérgico.

El objetivo de este estudio fue establecer la relación clonal entre distintos aislados de *P. aeruginosa* multirresistentes obtenidos de muestras respiratorias consecutivas de la UCI del Hospital Clínico San Carlos y determinar la actividad microbiológica *in vitro* de varias combinaciones de antibióticos frente a este microorganismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de cepas y estudios de sensibilidad

Se seleccionaron 12 aislados de *P. aeruginosa* de muestras respiratorias recogidas entre septiembre y octubre de 2006 procedentes de pacientes ingresados en la UCI del Hospital Clínico de Madrid. Las cepas se consideraron multirresistentes cuando mostraban resistencia a tres o más de los siguientes grupos de antimicrobianos de amplio espectro: ureidopenicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, quinolonas y aminoglucósidos<sup>5</sup>.

Mediante el método automatizado de microdilución Winder<sup>®</sup> (F. Soria Melguizo, Madrid) se identificaron los aislados y se determinó su concentración mínima inhibitoria (CMI) a los antibióticos más utilizados en el tratamiento de *P. aeruginosa*; estos valores se confirmaron (como sensibles o resistentes) mediante el método de difusión en discos (Oxoid,

Basingstoke, UK). La sensibilidad a colistina, rifampicina, doxiciclina y azitromicina se llevó a cabo con E-test<sup>®</sup> (A. B. Biodisk, Solna, Suecia) y microdilución en caldo siguiendo en todos los casos los criterios establecidos por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (anteriormente Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos, NCCLS)<sup>6</sup>.

### Caracterización genotípica

La relación clonal entre los aislados se llevó a cabo mediante amplificación de secuencia basada en la reacción en cadena de la polimerasa (*repetitive sequence-based polymerase chain reaction*, rep-PCR) en las condiciones descritas por Syrmis et al.<sup>7</sup>. ERIC-PCR y BOX-PCR se realizaron por separado con el fin de detectar diferencias en el número y la distribución de estas secuencias en el genoma bacteriano.

Para minimizar errores se utilizó el sistema de extracción de ADN con sílice magnética EasyMag (Biomerieux) siguiendo las instrucciones del fabricante y los ensayos de PCR se realizaron en tubos Ready-To-Go (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) utilizando en todos los casos 50 ng de ADN purificado como molde.

El producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1,5% (w/v) y se fotografió bajo luz ultravioleta<sup>8</sup>.

Los patrones obtenidos se analizaron visualmente y se siguieron los criterios establecidos por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica<sup>9</sup> para establecer la relación entre los distintos aislados.

### Estudios de sinergia

La actividad de las combinaciones de antibióticos que se deseaba estudiar se realizó mediante el método del tablero de ajedrez, que es la técnica empleada con más frecuencia para este tipo de ensayos. Se utiliza una placa microtiter en la que se efectúan múltiples diluciones de los antibióticos que hay que testar en concentraciones superiores, iguales e inferiores a la CMI para cada microorganismo testado. Se utilizó caldo Müller-Hinton (Oxoid) suplementado según los criterios del CLSI<sup>6</sup> y un inóculo de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

El índice fraccional de concentración inhibitoria (FICI) se calculó a partir de la suma de las fracciones de las concentraciones inhibitorias de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$FICI = \frac{CMI \text{ antibiótico A combinado}}{CMI \text{ antibiótico A solo}} + \frac{CMI \text{ antibiótico B combinado}}{CMI \text{ antibiótico B solo}}$$

Los resultados obtenidos fueron categorizados de la siguiente forma: FICI  $\leq 0,5$ , sinérgico;  $0,5 < FICI < 1$ , parcial-

**Tabla 1** Sensibilidad de los 12 aislados de *P. aeruginosa* incluidos en el estudio mediante sistema automatizado de microdilución en caldo

Aislado	Gentamicina	Tobramicina	Amikacina	Imipenem	Meropenem	Piperazina-tazobactam	Ciprofloxacino	Ceftazidima	Fosfomicina	Colistina
1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
2	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
3	R	R	S	R	I	R	R	R	S	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
5	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
9	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

mente sinérgico; FICI=1, aditivo;  $1 < \text{FICI} \leq 4$ , indiferente;  $\text{FICI} > 4$ , antagonista<sup>10</sup>.

## RESULTADOS

### Estudios de sensibilidad

Los estudios de sensibilidad utilizando el sistema comercial de microdilución en caldo WIDER (F. Soria Melguizo, Madrid) mostraron que, de las 12 cepas seleccionadas, 2 (16,6%) fueron sensibles a todos los aminoglucósidos y colistina, 2 (16,6%) a fosfomicina y colistina, 7 (58,3%) sólo a colistina y 1 a amikacina, fosfomicina y colistina, con una sensibilidad intermedia a meropenem (tabla 1).

Los valores de CMI por microdilución en caldo para colistina, rifampicina, doxiciclina y azitromicina (tabla 2) se comprobaron con E-test, obteniéndose pequeñas discrepancias con ambos métodos resultaron los valores obtenidos mediante E-test; ligeramente superiores en todos los casos.

### Caracterización genotípica

Mediante rep-PCR se pudo comprobar la existencia de varios clones entre nuestros aislados. Utilizando ERIC-PCR se distinguieron tres grupos: los aislados 1, 3, 9 y 11 estarían en el mismo grupo, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 12 integrarían otro; y el aislado 6 no se podría incluir en ninguno de los anteriores.

Mediante BOX-PCR encontramos cuatro grupos diferentes: los aislados 1, 3, 9 y 11 serían genotípicamente iguales, el 4, 6, 8, 10 y 12 iguales entre sí, el 5 y 7 forma-

rían otro grupo y el aislado 2 sería diferente a todos los anteriores.

Integrando los datos obtenidos con los dos cebadores tenemos cinco clones: los aislados 1, 3, 9, 11 pertenecerían al mismo clon; 4, 8, 10, 12 serían otro clon diferente; 5 y 7 se agruparían en otro clon distinto de los anteriores; el aislado 2 sería diferente a los anteriores; y el aislado 6 correspondería a un clon diferente a los 4 anteriores.

**Tabla 2** Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas mediante microdilución en caldo para los 12 aislados de *P. aeruginosa* incluidos en el estudio

Aislado	Concentración mínima inhibitoria			
	Colistina	Rifampicina	Doxiciclina	Azitromicina
1	1,5	16	16	4
2	1,5	16	32	64
3	1	16	16	4
4	1	16	32	>256
5	1	16	32	64
6	1	16	128	32
7	1	32	32	64
8	1	16	64	32
9	1	16	64	16
10	1	16	64	128
11	0,75	16	16	128
12	1	8	32	>256

Tabla 3		Resultados de los ensayos de sinergia para las diferentes combinaciones de antimicrobianos estudiadas frente a los 12 aislados seleccionados	
Aislado	Combinación antibiótica de colistina +	FICI	Interpretación
1	Azitromicina	2	Indiferente
	Rifampicina	1,1	Indiferente
2	Doxiciclina	0,88	Parcialmente sinérgica
	Azitromicina	1,3	Indiferente
3	Rifampicina	1,7	Indiferente
	Doxiciclina	0,9	Parcialmente sinérgica
4	Azitromicina	1,5	Indiferente
	Rifampicina	1,2	Indiferente
	Doxiciclina	1,1	Indiferente
5	Azitromicina	1,5	Indiferente
	Rifampicina	1,8	Indiferente
	Doxiciclina	1,1	Indiferente
6	Azitromicina	0,9	Parcialmente sinérgica
	Rifampicina	1,2	Indiferente
	Doxiciclina	0,8	Parcialmente sinérgica
7	Azitromicina	1,6	Indiferente
	Rifampicina	0,9	Parcialmente sinérgica
	Doxiciclina	0,8	Parcialmente sinérgica
8	Azitromicina	1,9	Indiferente
	Rifampicina	1,0	Aditiva
	Doxiciclina	0,6	Parcialmente sinérgica
9	Azitromicina	1,2	Indiferente
	Rifampicina	1,4	Indiferente
	Doxiciclina	0,8	Parcialmente sinérgica
10	Azitromicina	1,7	Indiferente
	Rifampicina	0,9	Parcialmente sinérgica
	Doxiciclina	0,4	Sinérgica
11	Azitromicina	0,4	Sinérgica
	Rifampicina	1,1	Indiferente
	Doxiciclina	0,9	Parcialmente sinérgica
12	Azitromicina	0,9	Parcialmente sinérgica
	Rifampicina	1,1	Indiferente
	Doxiciclina	0,7	Parcialmente sinérgica
12	Azitromicina	1,6	Indiferente
	Rifampicina	1,6	Indiferente
	Doxiciclina	1,0	Aditiva

FICI: índice fraccional de concentración inhibitoria.

## Estudios de sinergia

Las combinaciones de antibióticos ensayadas no mostraron la actividad deseada; tan sólo dos cepas presentaron actividad sinérgica: una para la asociación de colistina con

Tabla 4		Resumen de los estudios de sinergia				
Combinación	Número de aislados (%)					
	Sinérgico	Parcialmente sinérgico	Aditivo	Indiferente	Antagónico	
Colistina + azitromicina	1 (8,3%)	2 (16,6%)	0 (0%)	9 (75%)	0 (0%)	
Colistina + rifampicina	0 (0%)	2 (16,6%)	1 (8,3%)	9 (75%)	0 (0%)	
Colistina + doxiciclina	1 (8,3%)	8 (66,6%)	1 (8,3%)	2 (16,6%)	0 (0%)	

azitromicina (aislado 9) y otra para colistina con doxiciclina (aislado 10) (tabla 3).

El mayor éxito se obtuvo al asociar colistina con doxiciclina: 8 de los 12 aislados ensayados (66,6%) presentaron un efecto parcialmente sinérgico, otro presentó sinergia y otro efecto aditivo; sólo el 16,6% fue indiferente a esta combinación (tabla 4). Los aislados 3 y 4 fueron los únicos para los que la combinación de colistina con doxiciclina resultó indiferente.

La combinación *in vitro* de colistina con rifampicina fue indiferente en el 75% de los casos (9 cepas) y no se presentó sinergia en ninguno de los aislados (tabla 4).

La asociación de colistina con azitromicina resultó sinérgica para 1 de los aislados (cepa 10) y parcialmente sinérgica en otros 2 casos (cepas 5 y 11).

## DISCUSIÓN

Las bacterias gramnegativas multirresistentes son un importante problema emergente a nivel mundial. Resulta necesaria la presencia de nuevos antimicrobianos para tratar las infecciones causadas por estas bacterias, pero la investigación actual no anticipa la presencia de ningún antibiótico prometedor en un futuro cercano. Por esta razón antimicrobianos que habían caído en desuso han sido rescatados para tratar bacterias multirresistentes como medida de contención mientras se desarrollan nuevos antibióticos<sup>11</sup>.

*P. aeruginosa* es un importante patógeno nosocomial causante de elevadas tasas de morbimortalidad e infecciones difíciles de tratar debido a que las opciones terapéuticas son escasas y con frecuencia tóxicas. En el caso que nos ocupa tanto los estudios realizados mediante PCR (*primers* ERIC y BOX) como los perfiles de sensibilidad encontrados

nos indican la presencia de varios clones distintos. Los resultados de las PCR muestran cinco clones diferentes entre las muestras seleccionadas; por tanto no hay una única cepa de *P. aeruginosa* multirresistente responsable de las infecciones detectadas en la UCI durante el período de estudio.

La colistina es un antimicrobiano perteneciente al grupo de las polimixinas descubierto hace más de 50 años<sup>11</sup>. Actúa fundamentalmente sobre la pared celular de las bacterias gramnegativas causando cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y finalmente la muerte celular. Se utiliza en terapia parenteral, pero su uso es limitado a causa de su nefrotoxicidad<sup>12,13</sup>. En la bibliografía aparecen referencias frecuentes a la potente actividad de este antibiótico frente a *P. aeruginosa*, así como a *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii*<sup>3</sup>. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el que el 100% de los aislados fue sensible a colistina, seguido por amikacina, tan sólo con un 25% de cepas sensibles.

En muchas ocasiones, y basándose en los resultados de sensibilidad, la monoterapia antibacteriana es la opción escogida; aparecen en algunos casos fallos en el tratamiento. El sinergismo entre dos o más antibióticos es una interacción positiva que supone que la combinación de los dos antimicrobianos da lugar a un efecto significativamente mayor al esperado teniendo en cuenta el efecto individual; por esta razón azitromicina, rifampicina o doxiciclina, que por sí solas no serían activas frente a *P. aeruginosa*, se han ensayado en terapia combinada con colistina para evidenciar una posible actividad sinérgica.

Los estudios de sinergia realizados previamente por otros autores<sup>4,5,12</sup> han mostrado que la combinación de colistina más rifampicina era la más efectiva de todas las ensayadas, pero sólo frente a un bajo porcentaje de aislados.

En nuestro estudio ninguna de las asociaciones ensayadas presentó un resultado claramente satisfactorio. Las diferentes asociaciones de antibióticos presentaron un resultado indiferente frente a la mayoría de los aislados seleccionados; tan sólo en algún caso al combinar colistina con doxiciclina y con azitromicina se observó actividad sinérgica.

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta los trabajos previos sobre el tema, concluimos que no existe una combinación antibiótica óptima para el tratamiento de *P. aeruginosa* multirresistente, por lo que deberá considerarse cada caso aisladamente.

#### AGRADECIMIENTOS

Parte de este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria FIS «PI050344».

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2005;11(Suppl. 4):17-32.
2. Sánchez A, Salso S, Culebras E, Picazo JJ. Carbapenem resistance determined by metalloenzymes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioter 2004;17:336-40.
3. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007;13:560-78.
4. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. *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.
5. Tascini C, Gemignani G, Ferranti S, Tagliaferri E, Leonildi A, Lucarini A, et al. Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Chemother 2004;16:282-7.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. En: Wayne PA, editor. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically standard M7-A6. NCCLS, 2003; p. 1.
7. Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. J Med Microbiol 2004;53:1089-96.
8. Dawson SL, Fry JC, Dancer BN. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonas. J Microbiol Methods 2002;50:9-22.
9. Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología, 2005.
10. Marqués MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:881-5.
11. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis 2006;6:589-601.
12. Giamarellos-Bourboulis EJ, Sambatakou H, Galani I, Giamarelou H. *In vitro* interaction of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Chemother 2003;15:235-8.
13. Kasiakou SK, Michalopoulos A, Soteriades ES, Samonis G, Sermaides GJ, Falagas ME. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3136-46.