

Original

Actividad *in vitro* de linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamicina y rifampicina, solos o en combinación, frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*

A. Soriano¹, A. Jurado², F. Marco², M. Almela², M. Ortega¹ y J. Mensa¹

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas y ²Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona, España

RESUMEN

La información sobre la actividad *in vitro* de las asociaciones de agentes antiestafilocócicos es escasa. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad *in vitro* de linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamicina y rifampicina, solos o asociados, frente a *Staphylococcus* spp. Se analizaron mediante curvas de letalidad dos cepas de *Staphylococcus aureus* y dos de *Staphylococcus epidermidis* aisladas en hemocultivos. Las asociaciones estudiadas fueron linezolid+moxifloxacin, linezolid+levofloxacin, linezolid+clindamicina, linezolid+rifampicina, moxifloxacin+rifampicina, moxifloxacin+clindamicina, levofloxacin+rifampicina y levofloxacin+clindamicina. Las concentraciones (mg/l) empleadas fueron 8 y 16 para linezolid, 2 para moxifloxacin, 3 para levofloxacin, 2 para clindamicina, y 2 y 5 para rifampicina. La actividad se consideró sinérgica cuando se produjo una reducción del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación comparada con el antibiótico solo más activo, antagónica cuando se produjo un incremento del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación respecto del antibiótico solo más activo, e indiferente si la variación era menor de $1 \log_{10}$. Linezolid y clindamicina fueron siempre bacteriostáticos, mientras que moxifloxacin y levofloxacin fueron bactericidas. Rifampicina fue bacteriostática frente a *S. aureus* y bactericida frente a *S. epidermidis*. Linezolid y clindamicina redujeron la actividad bactericida de levofloxacin y moxifloxacin, aunque el efecto fue antagónico sólo frente a *S. aureus*. Otras combinaciones de linezolid, rifampicina, clindamicina, levofloxacin o moxifloxacin fueron indiferentes. Linezolid y clindamicina antagonizan la actividad bactericida de las fluoroquinolonas frente a *Staphylococcus* spp. La indiferencia fue la regla para el resto de combinaciones frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Palabras clave: Fluoroquinolonas - Oxazolidinonas - Combinaciones de antibióticos - *Staphylococcus aureus* - *Staphylococcus epidermidis*

In vitro activity of linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin and rifampin, alone and in combination, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

SUMMARY

Information about the *in vitro* effect of combinations of anti-staphylococcal agents on staphylococci is scarce. The aim of the study was to evaluate the *in vitro* activity of linezolid, moxifloxacin, levofloxacin, clindamycin and rifampin, alone or in combination, against *Staphylococcus* spp. Two *Staphylococcus aureus* and two *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from blood cultures were studied using the killing curve method. The combinations analyzed were linezolid+moxifloxacin, linezolid+levofloxacin, linezolid+clindamycin, linezolid+rifampin, moxifloxacin+rifampin, moxifloxacin+clindamycin, levofloxacin+rifampin and levofloxacin+clindamycin. The following concentrations (mg/l) were used: 8 and 16 for linezolid, 2 for moxifloxacin, 3 for levofloxacin, 2 for clindamycin and 2 and 5 for rifampin. The activity was considered synergistic when a reduction in growth of at least $2 \log_{10}$ was produced with the combination in comparison to the most active antibiotic alone; antagonistic when a growth of at least $2 \log_{10}$ was produced with the combination in comparison to the most active antibiotic alone; and indifferent if the variation was less than $1 \log_{10}$. Linezolid and clindamycin were bacteriostatic, while moxifloxacin and levofloxacin were bactericidal. Rifampin was bacteriostatic against *S. aureus* and bactericidal against *S. epidermidis*. Linezolid and clindamycin reduced the bactericidal activity of levofloxacin and moxifloxacin, however an antagonistic effect was only observed against *S. aureus*. Other combinations of linezolid, rifampin, clindamycin, levofloxacin or moxifloxacin were indifferent. Linezolid and clindamycin antagonize the bactericidal activity of fluorquinolones against staphylococci. There was no difference between any other combinations against either *S. aureus* or *S. epidermidis*.

Key words: Fluoroquinolones - Oxazolidinones - Antibiotic combinations - *Staphylococcus aureus* - *Staphylococcus epidermidis*

INTRODUCCIÓN

Los betalactámicos, los glucopéptidos y las quinolonas se incluyen entre los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas graves, como la osteomielitis y la infección de material protésico o de osteosíntesis. Sin embargo, cuando se tratan con un solo antibiótico el porcentaje de fracasos es alto (1). La experiencia clínica generada en los últimos años indica que las mayores tasas de éxito terapéutico se obtienen con las asociaciones que incluyen rifampicina, utilizadas durante al menos dos o tres meses o incluso por periodos más prolongados (2, 3). *Staphylococcus epidermidis* con frecuencia es resistente a los betalactámicos y las fluoroquinolonas, por lo que a menudo las alternativas de tratamiento por vía oral son escasas o nulas. Linezolid es activo frente a *Staphylococcus* spp. resistentes a los betalactámicos (4, 5), tiene una biodisponibilidad oral próxima al 100% y experiencias limitadas *in vitro* sugieren que puede ser más activo que los glucopéptidos sobre microorganismos que crecen en biopelículas (6).

A pesar de la eficacia clínica de las asociaciones que contienen rifampicina, la actividad bactericida *in vitro* de la cloxacilina y de los glucopéptidos puede disminuir de forma significativa cuando se asocian con rifampicina (7). La información sobre la actividad *in vitro* de la asociación de rifampicina con los nuevos agentes antiestafilocócicos es escasa (8-11). Hemos estudiado la actividad *in vitro* de linezolid, clindamicina, rifampicina, levofloxacino y moxifloxacino, solos y en asociación, frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, mediante la práctica de curvas de letalidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacterias

Para el estudio se emplearon dos cepas de *S. aureus* y dos de *S. epidermidis* sensibles a la oxacilina, aisladas en hemocultivos.

Antibióticos

Se utilizaron polvos estándar de actividad conocida de linezolid (Farmacia Upjohn, Kalamazoo, MI, USA), moxifloxacino (Bayer, Leverkusen, Germany), levofloxacino (Aventis, Romainville, France), rifampicina y clindamicina (Sigma, Madrid, Spain).

Estudios de sensibilidad

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo de Mueller-Hinton

siguiendo las normas del NCCLS en su documento M7-A5 (12). Después de una incubación de 20 horas a 35 °C se definió la CMI como la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento del microorganismo estudiado.

Curvas de letalidad

Las curvas de letalidad se realizaron por triplicado, utilizando caldo de Mueller-Hinton y un inóculo de 10^6 UFC/ml. Se tomaron muestras (100 µl) a las 0, 4 y 24 horas, y se sembraron en placas de agar Columbia. Tras una incubación de 20 horas a 35 °C se realizó el recuento bacteriano y se expresó en \log_{10} UFC/ml para trazar la curva de letalidad, todo ello siguiendo la normativa del NCCLS (13). Las concentraciones estudiadas fueron 4, 8 y 16 mg/l para linezolid, 2 mg/l para clindamicina, 2 y 5 mg/l para rifampicina, 3 mg/l para levofloxacino y 2 mg/l para moxifloxacino. Las concentraciones de clindamicina, rifampicina, levofloxacino y moxifloxacino se consideraron representativas de las concentraciones de antibiótico libre (no unido a proteínas) que se alcanzan en plasma cuando el antibiótico se administra a las dosis habituales por vía oral. Las asociaciones estudiadas fueron linezolid+rifampicina, linezolid +levofloxacino, linezolid+moxifloxacino, linezolid+clindamicina, levofloxacino+rifampicina, moxifloxacino+rifampicina, clindamicina+rifampicina, clindamicina+levofloxacino y clindamicina+moxifloxacino. Las asociaciones con linezolid se realizaron sólo con las concentraciones de 8 y 16 mg/l.

La actividad se definió como bactericida cuando la reducción del inóculo inicial fue $\geq 3 \log_{10}$ UFC/ml a las 24 horas, y como bacteriostática cuando el inóculo inicial se redujo $< 3 \log_{10}$ UFC/ml a las 24 horas. La actividad de la asociación se consideró sinérgica cuando se produjo una reducción del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación comparada con el antibiótico solo más activo, antagónica cuando se produjo un incremento del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación respecto del antibiótico solo más activo, e indiferente si la variación era menor de $1 \log_{10}$.

RESULTADOS

Las CMI de los diferentes antibióticos para las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 1. Linezolid (4, 8 y 16 mg/l) y clindamicina (2 mg/l) mostraron actividad bacteriostática frente a todas las cepas estudiadas. La actividad de linezolid frente a *S. aureus* no se modificó con concentraciones crecientes. En cambio, frente a *S. epidermidis*, 16 mg/l de linezolid redujeron de 1 a 1,5 log más la densidad

Tabla 1. Actividad *in vitro* de los antibióticos estudiados.

Cepas	CMI (mg/l)				
	Linezolid	Rifampicina	Clindamicina	Levofloxacino	Moxifloxacino
<i>S. aureus</i> 1	1	0,008	0,06	0,25	0,03
<i>S. aureus</i> 2	0,5	0,008	0,06	0,12	0,015
<i>S. epidermidis</i> 1	0,5	0,008	0,03	0,12	0,03
<i>S. epidermidis</i> 2	0,5	0,008	0,03	0,12	0,03

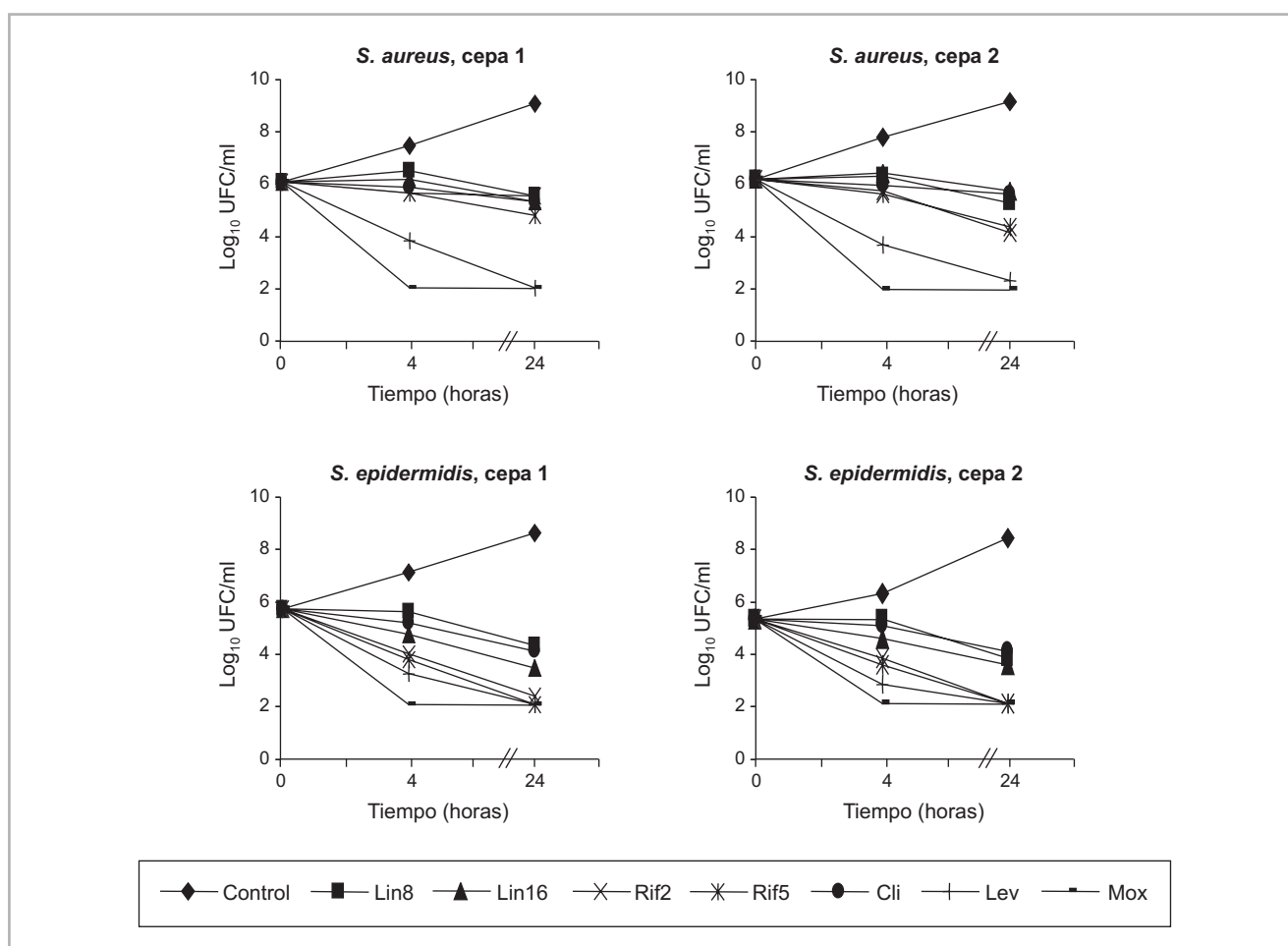


Figura 1. Curvas de letalidad de las cepas estudiadas cuando se exponen a cada uno de los antibióticos evaluados.

de población que 4 mg/l. Levofloxacino y moxifloxacino fueron siempre bactericidas. Rifampicina (2 y 5 mg/l) resultó bacteriostática frente a las dos cepas de *S. aureus* y bactericida frente a las dos de *S. epidermidis* (Fig. 1).

Linezolid y clindamicina antagonizaron el efecto bactericida de levofloxacino y moxifloxacino frente a *S. aureus* y se mostraron indiferentes frente a *S. epidermidis*. El resto de asociaciones estudiadas (linezolid con clindamicina o

rifampicina, y rifampicina con clindamicina o fluoroquinolonas) fueron indiferentes.

DISCUSIÓN

La información sobre la actividad de linezolid en asociación con otros antibióticos es todavía escasa. Estudios previos han analizado su actividad en asociación con beta-

lactámicos, quinolonas, ácido fusídico, gentamicina, vancomicina y rifampicina, frente a cepas de estafilococos. Todas las asociaciones mostraron un efecto indiferente (8-11). Nuestro estudio incluye las nuevas fluoroquinolonas (levofloxacin y moxifloxacin, no incluidas en estudios previos), clindamicina y rifampicina, antibióticos potencialmente útiles en el tratamiento por vía oral de las infecciones estafilocócicas e incluidos en las pautas terapéuticas de elección de la osteomielitis y la infección sobre material protésico.

Estudios anteriores han demostrado que la rifampicina antagoniza la actividad bactericida del ciprofloxacino y el pefloxacino frente a *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmico (14). Sin embargo, los modelos de infección en el animal y la experiencia en humanos han demostrado que esta asociación obtiene tasas de curación muy elevadas en la endocarditis derecha causada por *S. aureus* (15) y en las infecciones sobre material extraño (1). Una posible explicación para esta aparente paradoja podría ser que en este tipo de infecciones los microorganismos crecen en biopelículas. En estas estructuras, una parte de la población bacteriana se encuentra en fase no duplicativa (16, 17), y bajo estas condiciones la actividad de la asociación de ciprofloxacino con rifampicina es aditiva (18).

La actividad de linezolid no se modificó al asociarlo con rifampicina, lo que sugiere que esta asociación podría ser útil en el tratamiento de las infecciones causadas por estafilococos resistentes a la oxacilina, especialmente en aquellos casos de infección sobre material protésico (prótesis articular, derivaciones de líquido ceforraquídeo, etc.), en los cuales la rifampicina ha demostrado ser muy eficaz gracias a su actividad sobre biopelículas (19).

La asociación de levofloxacin o moxifloxacin con linezolid o clindamicina fue antagónica frente a las cepas de *S. aureus* analizadas, por lo que estas asociaciones no parecen recomendables para el tratamiento de la infección aguda, en la cual previsiblemente las bacterias se hallan en fase de crecimiento logarítmico (condiciones utilizadas en este estudio).

Por último, cabe destacar que la actividad de linezolid frente a *S. aureus* no se modificó con las variaciones de concentración del fármaco, datos que corroboran la información publicada por Andes y cols. (20), que demuestran que la actividad de linezolid es dependiente del tiempo y que los parámetros farmacodinámicos que mejor predicen su eficacia son el área bajo la curva de concentración/tiempo por encima de la CMI durante 24 horas y el porcentaje de tiempo entre dosis sucesivas que la concentración de linezolid se mantiene por encima de la CMI.

En conclusion, frente a *Staphylococcus* spp., las asociaciones de linezolid, levofloxacin o moxifloxacin con rifampicina *in vitro* son indiferentes, mientras que las asociaciones de levofloxacin o moxifloxacin con linezolid o clindamicina son antagónicas frente a *S. aureus* e indiferentes frente a *S. epidermidis*. El resultado de estas asociaciones debe tenerse especialmente en cuenta cuando se considera su empleo en infecciones estafilocócicas de evolución aguda.

Correspondencia: Alex Soriano, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínic Universitari-IDIBAPS, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona. Tel.: 93-227 57 08; Fax: 93- 451 44 78; e-mail: asoriano@clinic.ub.es.

BIBLIOGRAFÍA

- Zimmerli, W., Widmer, A.F., Blatter, M., Frei, R., Ochsner, P.E. *Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: A randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group.* JAMA 1998; 279: 1537-1541.
- Stein, A., Bataille, J.F., Drancourt, M. y cols. *Ambulatory treatment of multidrug-resistant Staphylococcus-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole).* Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 3086-3091.
- Segreti, J., Nelson, J.A., Trenholme, G.M. *Prolonged suppressive antibiotic therapy for infected orthopedic prostheses.* Clin Infect Dis 1998; 27: 711-713.
- Jones, M.E., Visser, M.R., Klootwijk, M., Heisig, P., Verhoef, J., Schmitz, F.J. *Comparative activities of clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin and nonquinolones linezolid, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, and vancomycin against clinical isolates of ciprofloxacin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus strains.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 421-423.
- Von Eiff, C., Peters, G. *Comparative in-vitro activities of moxifloxacin, trovafloxacin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against staphylococci.* J Antimicrob Chemother 1999; 43: 569-573.
- Gander, S., Hayward, K., Finch, R. *An investigation of the antimicrobial effects of linezolid on bacterial biofilms utilizing an in vitro pharmacokinetic model.* J Antimicrob Chemother 2002; 49: 301-308.
- Hackbarth, C.J., Chambers, H.F., Sande, M.A. *Serum bactericidal activity of rifampin in combination with other antimicrobial agents against Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 1986; 29: 611-613.
- Grohs, P., Kitzis, M.D., Gutmann, L. *In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 418-420.
- Jacqueline, C., Caillon, J., Le, M.V. y cols. *In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by time-kill curve methods.* J Antimicrob Chemother 2003; 51: 857-864.
- Mulazimoglu, L., Drenning, S.D., Yu, V.L. *In vitro activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone*

- lone (trovafloxacin), and dalbapristin-quinupristin against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2428-2430.*
11. Sweeney, M.T., Zurenko, G.E. *In vitro activities of linezolid combined with other antimicrobial agents against Staphylococci, enterococci, pneumococci, and selected gram-negative organisms. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1902-1906.*
 12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard. NCCLS, Wayne, PA, USA 2000; Fifth ed., M7-A5.*
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Document M26-A. NCCLS, Wayne, Pa 1999.*
 14. Fass, R.J., Helsel, V.L. *In vitro antistaphylococcal activity of pefloxacin alone and in combination with other antistaphylococcal drugs. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1457-1460.*
 15. Dworkin, R.J., Lee, B.L., Sande, M.A., Chambers, H.F. *Treatment of right-sided Staphylococcus aureus endocarditis in intravenous drug users with ciprofloxacin and rifampicin. Lancet 1989; ii: 1071-1073.*
 16. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. *Microbial biofilms. Ann Rev Microbiol 1995; 49: 711-745.*
 17. Stewart, P.S., Costerton, J.W. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001; 358: 135-138.*
 18. Bahl, D., Miller, D.A., Leviton, I. y cols. *In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1293-1297.*
 19. Widmer, A.F., Frei, R., Rajacic, Z., Zimmerli, W. *Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. J Infect Dis 1990; 162: 96-102.*
 20. Andes, D., van Ogtrop, M.L., Peng, J., Craig, W.A. *In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3484-3489.*