



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

“Heterorresistencia a fosfomicina en *Escherichia coli*: bases moleculares y efecto en su potencial terapéutico”

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por  
Dña. Inés Portillo Calderón.

Sevilla, diciembre de 2021



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y el Dr. D. Fernando Docobo Pérez, Profesor Contratado Doctor de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Heterorresistencia a fosfomicina en *Escherichia coli*: bases moleculares y efecto en su potencial terapéutico” ha sido realizada por Dña. Inés Portillo Calderón bajo nuestra supervisión, reuniendo todos los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 3 de diciembre de 2021.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Dr. D. Fernando Docobo Pérez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Heterorresistencia a fosfomicina en *Escherichia coli*: bases moleculares y efecto en su potencial terapéutico” ha sido realizada por Dña. Inés Portillo Calderón bajo mi tutela y es apta para ser presentada.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a 3 de diciembre de 2021.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

## AGRADECIMIENTOS

El camino para desarrollar este trabajo ha sido largo y complicado, a la par que muy enriquecedor, tanto a nivel profesional como personal. Sin embargo, gracias a las personas que me han acompañado en este camino, estas dificultades han sido mucho más fáciles de afrontar.

En primer lugar, agradecerles a mis directores de tesis, Álvaro y Fernando, la oportunidad de poder realizar este reto junto a ellos y por confiar en mí para afrontarlo. Gracias Álvaro por darme la oportunidad de conocer la investigación de cerca, y por ofrecerme la posibilidad de desarrollar este bonito proyecto en un equipo formado por grandes profesionales y personas excepcionales con los que he podido contar siempre que lo he necesitado. Gracias por apostar por mí en este proyecto. Gracias Fernando por todo...por tu apoyo y ayuda incondicional, has sido mi pilar y mi guía durante todo el camino. He aprendido mucho gracias a ti. Haces de los retos y las dificultades, algo fácil y divertido. Gracias por ser tan buen profesional y, sobre todo, por ser tan maravillosa persona. Gracias por esa paciencia incommensurable que has tenido conmigo y por apoyarme en los malos y buenos momentos. Este trabajo no lo hubiera conseguido si no hubiera sido por ti.

Gracias a todos mis compañeros y compañeras, en especial a Ana, Mercedes, Esther, Mónica, Miriam y Patricia. Gracias por estar en todo momento y ser un apoyo imprescindible en mí día a día. No sois sólo compañeras, sois mis referentes y mis AMIGAS. Me habéis hecho fáciles los momentos difíciles. He aprendido mucho con vosotras. Mil gracias por estar en este camino.

Muchas gracias a todos los facultativos del servicio, por su comprensión sobre la enorme carga de trabajo que conlleva realizar una Tesis doctoral. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y, sobre todo, gracias a aquellos que se han convertido en una mano amiga y un hombro en el que apoyarme para afrontar este reto. Gracias por vuestros consejos. Gracias al personal investigador y técnicos; en especial a Belén, por su profesionalidad, orden y metódica excelentes que han hecho posible el desarrollo de gran parte de este proyecto; sin ellos, tampoco hubiera sido posible.

Por último, agradecer a mi familia y amigos, en especial a mis padres y a mi pareja, Pedro, por haber estado SIEMPRE a mi lado a cada paso. Sin vosotros tampoco hubiera llegado a culminar este proyecto. Por entender mis ausencias y mis largas jornadas de trabajo. Por ser mí apoyo incondicional ante las adversidades y, sobre todo, por soportarme en los malos momentos de manera estoica. Gracias por vuestros sabios consejos. Gracias por hacerme ser feliz (imprescindible para afrontar este reto).

En resumen, gracias a todas las personas que de una forma u otra han contribuido a realizar este proyecto. Me siento muy afortunada por haber contado con vosotros.

# ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	5
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1. Resistencia bacteriana .....	11
2. La resistencia bacteriana como un problema de salud pública.....	13
3. Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana .....	18
3.1. Sistemas de vigilancia y trazabilidad de resistencias bacterianas .....	18
3.2. Prevención de las infecciones .....	18
3.3. Uso racional y optimizado de los antimicrobianos .....	19
3.4. Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos .....	21
3.5. Desarrollo de nuevos antimicrobianos .....	23
3.6. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.....	25
3.7. Rescate de antimicrobianos en desuso.....	27
4. Fosfomicina .....	29
4.1. Historia.....	29
4.2. Características moleculares .....	30
4.3. Mecanismo de acción .....	31
4.4. Espectro de acción. Epidemiología de la resistencia frente a bacterias Gram negativas..	32
4.5. Mecanismos de resistencia .....	36
4.6. Estudios de sensibilidad. Técnicas y limitaciones .....	45
4.7. Puntos de corte de sensibilidad/resistencia .....	50
5. Amikacina .....	61
5.1. Historia.....	61
5.2. Características moleculares .....	62
5.3. Mecanismo de acción .....	63
5.4. Efectos secundarios .....	65
5.5. Espectro de acción y epidemiología de la resistencia.....	67
5.6. Mecanismos de resistencia .....	69
5.7. Estudios de sensibilidad: técnicas, puntos de corte de sensibilidad/resistencia .....	72
6. Fenómeno de heterorresistencia antibiótica.....	74
6.1. Definición de heterorresistencia y su frecuencia en la clínica.....	74
6.2. Mecanismos de heterorresistencia bacteriana .....	78
6.3. Técnicas de estudio de la heterorresistencia.....	83
6.4. Implicaciones en el éxito o fracaso terapéutico .....	87

6.5. Heterorresistencia y el posible papel de la hipermutación .....	90
<b>7. Tratamiento antibiótico combinado como estrategia terapéutica frente a subpoblaciones bacterianas.....</b>	<b>106</b>
7.1. Fundamentos .....	106
7.2. Papel de los aminoglucósidos en la terapia combinada.....	110
<b>8. Estudios <i>in vitro</i> de combinaciones terapéuticas. Técnicas y limitaciones .....</b>	<b>114</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>135</b>
<b>1. Hipótesis .....</b>	<b>135</b>
<b>2. Objetivos del estudio .....</b>	<b>135</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>137</b>
<b>1. Material .....</b>	<b>137</b>
1.1. Soluciones y reactivos.....	137
1.2. Medios de cultivo.....	138
1.3. Antimicrobianos.....	140
1.4. Cepas de trabajo .....	140
<b>2. Métodos.....</b>	<b>144</b>
2.1. Métodos moleculares .....	144
2.2. Métodos de Microbiología .....	157
<b>IV. RESUMEN DE LOS RESULTADOS .....</b>	<b>168</b>
<b>1. Cepas de trabajo. Construcción de cepas mutantes de delección doble.....</b>	<b>168</b>
<b>2. Sensibilidad de las cepas bacterianas a los antimicrobianos de estudio .....</b>	<b>168</b>
<b>3. Frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina, fosfomicina y amikacina. ....</b>	<b>178</b>
<b>4. Análisis de secuenciación masiva de genes de reparación del ADN y genes asociados con resistencia a fosfomicina. ....</b>	<b>183</b>
<b>5. Curvas de crecimiento bacteriano .....</b>	<b>188</b>
<b>6. Estudio <i>in vitro</i> de interacción de antimicrobianos. Técnica del tablero de ajedrez .....</b>	<b>191</b>
<b>7. Curvas de letalidad con fosfomicina y amikacina a diferentes concentraciones.....</b>	<b>195</b>
<b>8. Modelo de infección <i>in vitro</i> en cartuchos de fibra hueca (<i>Hollow-fiber Infection Model / HFIM</i>) .</b>	<b>202</b>
<b>V. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>206</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>217</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>218</b>



## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

### LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AAC: Acetiltransferasa

AEE: Área Económica Europea

AEMPS: Agencia española del medicamento y productos sanitarios

AMPc: AMP cíclico

ANT: Nucleotidiltransferasa

APH: Fosfotransferasas

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN de transferencia

AUC: *Area under the curve* (área bajo la curva)

BLEE: betalactamasas de espectro extendido

CAESAR: *Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*

CARB-X: *Combatting Antibiotic-Resistant Bacteria-X*

CEPA: Compañía Española de Penicilina y Antibióticos

C<sub>máx</sub>: Concentración máxima

CoA: coenzima A

COESANT: Comité Español del Antibiograma

CCR: represión catabólica del carbono

CDC: *Center for diseases control and prevention*

CIF: concentración inhibitoria fraccionaria

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

COMBACTE-MAGNET: *Combatting Bacterial Resistance in Europe-Molecules against Gram-Negative Infections*

CMI: concentración mínima inhibitoria

CRP: complejo receptor de AMPc

Dam: deoxiadenina metil-transferasa

DIN: *Deutsches Institut für Normung*

EAR: *Emerging Antimicrobial Resistance Reporting*

EARS-Net: *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECOFF: *epidemiological cut-off values*

EC50/IC50: Concentración que produce el 50% del efecto máximo

## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

EMA: *European Medicines Agency*

Emáx: Efecto máximo

Emín: Efecto mínimo del fármaco

ENABLE: *European Gram-Negative Antibacterial Engine*

ESCMID: *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease*

ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, P. aeruginosa y Enterobacter spp*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FC: farmacocinética

FD: farmacodinamia

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

GARDP: *Global Antibiotic Research and Development Partnership*

GLASS: *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*

GST: glutatión-S-transferasa

G3P: glicerol 3-fosfato

G6P: por glucosa 6-fosfato

HFIM: *hollow-fiber infection model*

Hpt: hipoxantina fosforibosiltransferasa

HPr: proteína de histidina

HSA: *Highest single agent*

IACG: *Interagency Coordination Group*

IDSA: *Infectious Diseases Society of America*

IMI: Iniciativa de Medicamentos Innovadores

IRAs: infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria

I+D: Investigación y Desarrollo

JPIAMR: *Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance*

LOD: *Limit of detection*

MDMMR: *methyl-directed mismatch repair system*

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

ND4BB: *New Drugs for Bad Bugs*

NER: *Nucleotide excision repair*

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OIE: Organización Mundial de Salud Animal

OMS: Organización Mundial de la Salud

## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

OR: *odds ratio*

PAP: *population analysis profile*

PEP: fosfoenolpiruvato

PIRASOA: Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos

PRAN: Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos

PROA: Programas de optimización de tratamientos antimicrobianos

PTA: *probability of target attainment*

PTS: azúcar fosfotransferasa

ReLAVRA: Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana

REPAIR: *Replenishing and Enabling the Pipeline for Anti-Infective Resistance*

SAIVh: *Staphylococcus aureus* heterorresistente a vancomicina

SARM: *S aureus* resistente a metilina

SFM: *Société Française Microbiologie*

SigW: factor sigma extracitoplasmático

UE: Unión Europea

UDP: difosfato de uridina

UFC: unidades formadoras de colonias

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

ZIP: *Zero Interaction Potency Model*



## RESUMEN

### RESUMEN

En las últimas décadas, el aumento progresivo de la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema mundial de salud pública. Consecuencia de ello y de la escasez de nuevas moléculas efectivas para el tratamiento de bacterias multirresistentes, surge como estrategia el rescate de antiguos antimicrobianos aún activos como la fosfomicina.

La resistencia cromosómica a fosfomicina se trata de un fenómeno que ocurre de forma escalonada, complejo de estudiar e interpretar, que se complica sobre todo por la presencia de factores como la heterorresistencia, la cual se corresponde con un fenotipo cuya definición es heterogénea y controvertida. En general, se considera como la presencia de subpoblaciones que muestran diferentes niveles de sensibilidad a un antimicrobiano. Nicoloff y colaboradores demostraron la asociación entre la heterorresistencia a diversos antimicrobianos (sin tener en cuenta la fosfomicina) con la presencia de amplificaciones espontáneas en tándem de genes de resistencia conocidos. En relación con esto, otro mecanismo que permite un incremento en la tasa de mutación tiene como origen defectos en los sistemas de reparación del ADN en bacterias, mostrando estas bacterias hipermutadoras una prevalencia entre aislados clínicos que oscila entre un 1% y un 60%, dependiendo de los estudios.

Por otro lado, ensayos *in vitro* no farmacocinéticos/farmacodinámicos han demostrado que los aislados heterorresistentes a fosfomicina pueden sobrevivir a altas concentraciones de fosfomicina, dependiendo de la CMI de las subpoblaciones, la tasa de mutación y el inóculo bacteriano; sin embargo, se desconoce el impacto clínico de estos aislados. Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la eficacia de la combinación de fosfomicina/amikacina frente a bacterias multirresistentes; sin embargo, no se ha explorado la eficacia de esta combinación frente a aislados heterorresistentes a fosfomicina.

Los objetivos de este trabajo fueron conocer el efecto de la combinación de mutaciones por delección en los genes del sistema de reparación del ADN y en los relacionados con los mecanismos de resistencia a fosfomicina para explicar los posibles mecanismos subyacentes de los diferentes fenotipos de heterorresistencia a fosfomicina en *Escherichia coli*, así como estudiar la eficacia de dosis humanizadas de fosfomicina y amikacina intravenosas en monoterapia y en combinación frente a aislados de *E. coli* heterorresistentes a fosfomicina en un modelo de infección con fibra hueca (HFIM).

Para ello se utilizaron 11 aislados clínicos de *E. coli* junto con mutantes isogénicos de delección simple y doble en genes del sistema de reparación del ADN de *E. coli* y genes relacionados con resistencia a fosfomicina. La CMI a fosfomicina se estableció mediante tira de gradiente y microdilución en caldo. Se determinó la frecuencia de mutantes para rifampicina

## RESUMEN

(100 mg/L) y fosfomicina (50 y 200 mg/L). Utilizando dos inóculos diferentes de partida, se evaluó la actividad *in vitro* a fosfomicina durante 24 horas mediante curvas de crecimiento (0,5-512 mg/L) y curvas de letalidad (64 y 307 mg/L). Posteriormente, se seleccionaron 6 de los 11 aislados clínicos previos con fenotipo hipermutador y heterorresistente a fosfomicina y se determinó la frecuencia de aparición de mutantes para rifampicina (100mg/L), fosfomicina (50 y 200mg/L) y amikacina (32 mg/L). Los valores de CMI para fosfomicina y amikacina se evaluaron mediante dilución en agar, tira de gradiente y microdilución en caldo. El estudio de sinergia para fosfomicina y amikacina se realizó mediante ensayos de tablero de ajedrez y curvas de letalidad, utilizando distintas concentraciones. Finalmente, la eficacia de fosfomicina (8g/Q8h) y amikacina (15mg/kg/Q24h) en monoterapia y en combinación se evaluó mediante el modelo de infección *in vitro* de HFIM.

De los resultados de este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. El origen del fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina pueden explicarse parcialmente por una elevada frecuencia de aparición de mutantes en combinación con la presencia de mecanismos de resistencia de bajo nivel a este antimicrobiano.
2. El grado de la frecuencia de aparición de mutantes se correlaciona con la variabilidad en la proporción y CMI de las subpoblaciones heterorresistentes a fosfomicina en aislados de *E. coli*, teniendo un mayor impacto en aquellos aislados con alteraciones en genes relacionados con resistencia a fosfomicina.
3. El estudio de sensibilidad a fosfomicina mediante tiras de gradiente es un método eficaz para observar la variabilidad y el gradiente de heterorresistencia a este antimicrobiano, siendo el ensayo mediante microdilución más representativo de la sensibilidad de la población bacteriana general.
4. Los resultados de los ensayos realizados en los modelos de infección *in vitro* en HFIM con aislados de *E. coli* heterorresistente a fosfomicina demuestran que puede existir un riesgo de fracaso terapéutico con el uso de amikacina (15 mg/kg/24h) o fosfomicina (8g/8h) en monoterapia.
5. El estudio *in vitro* en HFIM demuestra que la terapia combinada de fosfomicina (8g/8h) y amikacina 15 mg/kg/24h, es eficaz frente a aislados de *E. coli* heterorresistente a fosfomicina, tanto frente a cepas normomutadoras como hipermutadoras, disminuyendo rápidamente la carga bacteriana y previniendo la aparición de subpoblaciones resistentes.

### I. INTRODUCCIÓN

#### 1. Resistencia bacteriana

Los antimicrobianos están entre las drogas más exitosas que se han desarrollado a lo largo de la historia, contribuyendo de forma significativa al progreso de la medicina donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes (pacientes prematuros, inmunodeprimidos, quirúrgicos...) ejerciendo un impacto importante en salud pública. En los inicios, parecía que la batalla contra las bacterias jugaba a favor de la ciencia, en lo que se conoce como la “época dorada” de los antimicrobianos.<sup>2</sup> Sin embargo, este equilibrio en la carrera armamentista entre humanos y patógenos demostró ser frágil. Al poco tiempo, se hizo evidente que las bacterias podían hacerse resistentes a su acción. Durante algunas décadas, este problema fue soliviantado por la introducción de nuevos antimicrobianos, pero al poco tiempo de comenzar su utilización, se producía una disminución en su eficacia.<sup>3</sup>

Aunque el estudio de la resistencia bacteriana comienza a raíz del fracaso terapéutico de estos compuestos en la era moderna de los antimicrobianos, la existencia de estos mecanismos precede a esta época por miles de años según han demostrado diversos estudios.<sup>2,4,5</sup> La preexistencia de estos factores se justifica por el origen natural de estas moléculas. Durante millones de años de evolución, el mundo microscópico ha acumulado una enorme diversidad de mecanismos metabólicos y protectores con capacidad de movilización, fruto de la coincidencia en el mismo hábitat natural con estructuras orgánicas (antimicrobianos) que de una forma u otra han influido sobre su información genética y metabolismo.<sup>6-8</sup> Consecuencia de esta relación natural ancestral, surge lo que se conoce con el nombre de “resistoma antimicrobiano” o conjunto de genes involucrados en la resistencia antimicrobiana, cuyas características principales son el poseer una gran variedad genética<sup>9</sup> junto con una amplia distribución en la ecología global;<sup>10-12</sup> consecuencia de años de evolución.

Dentro de la característica variedad del resistoma, los mecanismos principales de resistencia a los antimicrobianos pueden resumirse de forma general como: (i) genes de resistencia captados mediante movilización y transferencia génica horizontal (transformación, transducción y conjugación);<sup>13</sup> (ii) mutaciones cromosómicas de resistencia antibiótica adquiridas junto con mutaciones compensatorias que neutralizan el coste biológico o *fitness*<sup>14</sup> y (iii) sobreexpresión de los mecanismos intrínsecos de resistencia (bombas de expulsión<sup>15,16</sup> o enzimas que inactivan a los antimicrobianos).<sup>17</sup>

Debido a la relación sin límites de las bacterias en los diferentes compartimentos ecológicos, se produce un flujo de comunicación entre el ecosistema natural, y el ecosistema

## INTRODUCCIÓN

humano/animal de estos factores mediante la transferencia genética horizontal<sup>18,19</sup> que posteriormente se diseminan a través de determinados plásmidos y clones exitosos en los patógenos humanos.<sup>20</sup>

El amplio uso de los antimicrobianos por el ser humano, principalmente en entornos clínicos,<sup>21</sup> ha favorecido la evolución, difusión y liberación de estos determinantes de resistencia en el ámbito clínico; así como a través de desechos de origen humano e industrial que finalmente acaban penetrando en los ecosistemas naturales, contribuyendo al aumento en la diversidad y expansión global del resistoma bacteriano en un ciclo ecológico, mediante los principales mecanismos previamente citados.<sup>22,23</sup>

Para una correcta recopilación y comparación de datos en los estudios de vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana se ha propuesto una nomenclatura común en base al grado de resistencia de las bacterias que las clasifica en: bacterias multirresistentes (resistentes al menos a un antimicrobiano de tres o más familias), bacterias extremadamente resistentes (resistentes al menos a un antimicrobiano en todas las familias, excepto en una o dos) y bacterias panresistentes (resistentes a todos los antimicrobianos de cualquier familia).<sup>24</sup> Surge recientemente un nuevo concepto específico para bacteriemias por bacilos Gram negativos que poseen resistencia a todos los antimicrobianos betalactámicos de primera línea, además de carbapenémicos y fluoroquinolonas, denominándolas como “infecciones difíciles de tratar”.<sup>25</sup>

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema que, aunque su origen es natural y ancestral, se ha visto antropológicamente agravado y acelerado, provocando repercusiones preocupantes para la salud y economía global en la actualidad.<sup>26</sup>

### **2. La resistencia bacteriana como un problema de salud pública**

El fenómeno de la globalización con el aumento en el número de viajes y el comercio internacional junto con el uso extenso, de forma adecuada o no, de antimicrobianos en el campo de la salud y la industria (principalmente agroalimentaria, ganadera y farmacéutica) ha provocado que el problema de la resistencia a antimicrobianos se multiplique convirtiéndose en un problema de salud pública con afectación mundial que de forma paralela conlleva repercusiones en la economía mundial.

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que las infecciones por estos microorganismos se asocian a una mayor morbi-mortalidad y coste económico.<sup>27,28</sup> En 2014 se publica la primera revisión sobre las consecuencias que la resistencia bacteriana ejerce sobre la sanidad y macroeconomía mundial por el economista Jim O'Neill, en la cual estima que un total de 700.000 personas fallecen cada año a causa de infecciones (bacterianas, VIH y malaria) producidas por microorganismos resistentes a los tratamientos y calcula que, si la resistencia continúa con su trayectoria actual, para el año 2050, se producirían 10 millones de muertes en todo el mundo por esta causa (superando a la muerte por cáncer); es decir, "una persona fallecería cada 3 segundos" por infecciones por microorganismos resistentes, suponiendo un coste económico de unos 100 billones de dólares.<sup>26,29</sup> En Estados Unidos, según el informe del CDC (*Center of Disease Control and Prevention*) de 2019, se producen al año más de 2,8 millones de infecciones resistentes a los antimicrobianos que provocan más de 35.000 muertes.<sup>3</sup> En Europa, se estiman 25.000 muertes al año atribuidas a este problema, con costes directos e indirectos de aproximadamente 1.500 millones de euros.<sup>30</sup> En la India, casi 60.000 recién nacidos mueren cada año por infecciones resistentes a los tratamientos antimicrobianos.<sup>31</sup>

El consumo de antimicrobianos se trata de una de las principales causas del incremento de la resistencia a los antimicrobianos.<sup>32</sup> Éste sufrió un aumento de forma global de hasta un 65% entre los años 2000 y 2015, y se estima que aumente por encima de un 200% en los próximos 10 años, si no se asumen políticas correctoras. Además, debido al incremento en el consumo de antimicrobianos de último recurso como son los carbapenémicos y la colistina, se ha producido el consecuente aumento de infecciones por bacterias resistentes a estos antimicrobianos.<sup>33,34</sup> Este incremento de la resistencia a nivel mundial no se distribuye de forma homogénea entre los distintos países, existiendo a su vez una relación con el nivel de desarrollo socio-sanitario y económico del país, observándose un aumento en aquellos países que poseen menos recursos.<sup>33</sup>

La resistencia a los antimicrobianos ha alcanzado tal importancia y magnitud que se trata de uno de los puntos relevantes en la cumbre de la agenda internacional. Diversas

## INTRODUCCIÓN

instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han elaborado documentos para proponer soluciones a este problema. El informe elaborado por Jim O'Neill en 2014 alertó a la OMS. En 2015, la 68ª Asamblea de la OMS aprobó el documento *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*, que representa el reconocimiento entre los Estados Miembros de la amenaza que supone la resistencia bacteriana para la medicina actual y la sostenibilidad de la salud pública mundial, proponiendo una serie de objetivos y medidas específicas para poner solución al problema. Para ello, involucra a todos los sectores implicados: medicina, veterinaria, agricultura, medio ambiente, mundo financiero y a los consumidores. Estos objetivos y estrategias son concretamente: (1) mejorar la conciencia y la comprensión de la resistencia a los antimicrobianos mediante una comunicación, educación y capacitación eficaces; (2) fortalecer la base de conocimientos y pruebas mediante la vigilancia y la investigación; (3) reducir la incidencia de la infección mediante medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de la infección; (4) optimizar el uso de fármacos antimicrobianos en salud humana y animal; (5) desarrollar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos y métodos diagnósticos.<sup>35</sup>

Mediante el documento titulado *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System* (GLASS) se trata el abordaje del segundo objetivo del plan de acción global de la OMS, centrándose en la necesidad de fortalecer la evidencia de la resistencia en patógenos humanos mediante la vigilancia epidemiológica y la investigación, considerándolas como la piedra angular para poder adoptar medidas estratégicas adecuadas.<sup>36</sup> Ofrece un enfoque normalizado para la recopilación, análisis e intercambio de datos sobre la resistencia antimicrobiana por parte de los distintos países, supervisando la situación de los sistemas nacionales de vigilancia. GLASS funciona gracias al compromiso de los países participantes y una estrecha colaboración con las redes regionales de vigilancia de la resistencia antimicrobiana como son la EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*)<sup>37</sup> que se administra y coordina por el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), CAESAR (*Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*)<sup>38</sup>, y ReLAVRA (Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana).<sup>39</sup> En la fase inicial de aplicación del GLASS (2015-2019), los objetivos principales son evaluar la situación de los sistemas de vigilancia de los países inscritos junto con los datos sobre resistencia a antimicrobianos de una serie de “patógenos prioritarios” para el ser humano; además del GLASS-EAR (*Emerging Antimicrobial Resistance Reporting*)<sup>40</sup> para el control y registro de la aparición de nuevas resistencias. GLASS cuenta con dos informes publicados con los resultados de la fase inicial, así como con una serie de medidas adicionales en desarrollo como son la supervisión del consumo de antimicrobianos por los seres

## INTRODUCCIÓN

humanos y la integración con otros programas de vigilancia de los sectores de la salud pública, animales y el medio ambiente.<sup>41,42</sup> Colaboran para ello con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), formando junto con la OMS, el grupo de coordinación especial IACG (*Interagency Coordination Group*) para mejorar la comprensión global de la resistencia en todos los sectores y promover el “Enfoque Sanitario Único” para el control de la resistencia.<sup>43</sup>

Si nos centramos en los datos de resistencia en la región europea, la EARS-Net se encarga de recopilar y analizar la resistencia antimicrobiana en los 28 Estados miembros de la Unión Europea (UE) y dos países del Área Económica Europea (AEE) de siete patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp*) que causan frecuentemente infecciones en los seres humanos.<sup>44</sup> En el informe publicado por la EARS-Net en 2018, se notifican los datos de resistencias por microorganismos de la UE/AEE calculando el porcentaje medio ponderado por la población, analizando los resultados correspondientes al año 2018, así como la evolución de los mismos desde el 2015.<sup>45</sup>

Si observamos los datos del informe del año 2018, de los aislados de *E. coli*, más de la mitad (58,3%) fueron resistentes al menos a uno de los grupos antimicrobianos estudiados, con predominio a aminopenicilinas (57,4%), seguido de fluoroquinolonas (25,3%) y cefalosporinas de tercera generación (15,1%). La resistencia a carbapenémicos en esta especie es menor al 1%, y los países con tasas más elevadas como Chipre o Bulgaria, presentan tasas inferiores al 2%. El porcentaje de resistencia a más de un grupo de antimicrobianos fue de un 6,2% (fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos), sin objetivarse cambios significativos desde el año 2015. La resistencia a aminopenicilinas en combinación con otros grupos fue la más frecuente. De los aislados de *K. pneumoniae*, más de un tercio de los aislados (37,2%), fueron resistentes al menos a uno de los grupos antimicrobianos estudiados, registrándose los porcentajes más elevados a cefalosporinas de tercera generación (31,7%), seguido de fluoroquinolonas (31,6%), aminoglucósidos (22,7%) y carbapenémicos (7,5%). La resistencia a carbapenémicos en este microorganismo se encuentra por debajo del 5% en la mayoría de los países europeos, destacando países como Bulgaria, Chipre, Italia, Rumanía y Grecia, cuyos porcentajes sobrepasan el 20%. Cabe destacar, que la resistencia a un solo grupo de antimicrobianos fue menos frecuente que la resistencia combinada (7.2% vs 30%), con la participación de fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y/o aminoglucósidos. En el análisis de tendencias de la resistencia durante el periodo 2015-2018, se observa un aumento significativo de la resistencia a fluoroquinolonas tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, a cefalosporinas de tercera generación en *E. coli*, y a

## INTRODUCCIÓN

carbapenémicos en *K. pneumoniae*. La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* ha aumentado desde 2015 de forma particular y significativa en países cuyas tasas permanecen en 2018 por debajo del 5% como son Dinamarca, Países Bajos, Finlandia, Reino Unido, Eslovaquia o España, observándose un aumento llamativo en este periodo en países como Polonia (0.5-8.1%), Portugal (3,4-11,7%), Malta (4,5-15,4%) y Bulgaria (3.2-21.2%). Italia sigue siendo uno de los países con mayor tasa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos; sin embargo, se ha producido un descenso significativo durante este periodo (33.5-6.8%).

Por otro lado, con respecto a la resistencia a otros bacilos Gram negativos, como *P. aeruginosa*; el 32,1% de aislados fueron resistentes al menos a uno de los grupos antimicrobianos estudiados, observándose la mayor tasa de resistencia a fluoroquinolonas (19,7%), seguidas de piperacilina/tazobactam (18,3%) y carbapenémicos (17,2%). Se ha producido un descenso significativo de la resistencia a piperacilina/tazobactam, ceftazidima, aminoglucósidos y carbapenémicos en este microorganismo desde 2015 de forma general. Hay que destacar un descenso significativo y global en la resistencia a carbapenémicos, y de forma particular en países como Alemania, Portugal, Italia, España o Croacia. En el análisis de la resistencia en *Acinetobacter* spp, más de la mitad de los aislados (56,4%) fueron resistentes al menos a uno de los antimicrobianos estudiados, registrándose las resistencias más altas a fluoroquinolonas (36,2%), seguido de aminoglucósidos (31,9%) y carbapenémicos (31,9%). Además, el 28% de aislados, poseían a su vez varios mecanismos de resistencia a más de un grupo de antimicrobianos. Aunque se ha producido un descenso significativo de la resistencia a fluoroquinolonas desde 2015, el resto de resistencias a los demás grupos se ha mantenido sin cambios significativos.<sup>46</sup>

Estos datos en general reflejan patrones de resistencias poco uniformes en los países recogidos en la EARS-Net, pero de forma generalizada se observa un aumento más acusado de las tasas de resistencia globales en países que se encuentran geográficamente situados más al sur y al este de la UE/AEE. Independientemente de esta tendencia y heterogeneidad, la globalización y flujo constante entre países, hace de especial importancia conocer estos datos y estar alerta de posibles nuevas resistencias.

La mayoría de estos microorganismos siguen siendo una causa muy importante de infección en relación con la atención sanitaria en Europa, y en concreto también en España, lo que aún hace más importante, si cabe, su vigilancia y control.<sup>47,48</sup> Asimismo, España para el abordaje de este problema, aprueba en el año 2014 el PRAN (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos) en el que participan en su desarrollo actualmente todas las comunidades autónomas, los ministerios de Sanidad, Agricultura, Economía, Educación, Ciencia, Interior, Defensa y Transición Ecológica; así como diversas sociedades científicas, organizaciones

## INTRODUCCIÓN

colegiales, asociaciones profesionales y universidades; y cientos de colaboradores expertos. Su objetivo principal es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antimicrobianos así como su impacto sobre la salud, preservando de manera sostenible la eficacia de los antimicrobianos existentes.<sup>49</sup>

Toman especial relevancia en la distribución y dispersión mundial de los mecanismos de resistencia los denominados clones bacterianos “de alto riesgo” debido a su capacidad de persistencia, así como para acumular diferentes mecanismos que dan lugar a bacterias multirresistentes, capaces de intercambiar de manera muy eficaz genes de resistencia y virulencia con capacidad para producir infecciones graves e invasivas y colonizar de forma eficiente durante largos periodos y alta transmisibilidad entre individuos. Actúan como una fuente de propagación de componentes genéticos resistentes a antimicrobianos mediante elementos genéticos móviles como integrones, transposones o plásmidos.<sup>50</sup>

A nivel mundial y en estrecha relación con los clones de alto riesgo, son de especial interés epidemiológico las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas, especialmente entre las especies bacterianas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, ya que suponen un problema importante de salud en algunas zonas del mundo.<sup>3,51</sup> Estos microorganismos son especialmente importantes debido a que son causa frecuente de infecciones asociadas a la atención sanitaria, así como de infecciones comunitarias.<sup>47,52</sup> Las betalactamasas son enzimas bacterianas que inactivan betalactámicos y son el factor más importante de resistencia entre las bacterias Gram negativas a estos antibióticos, de las cuales existen diversos tipos y clasificaciones.<sup>53</sup> Las infecciones por estas bacterias presentan enormes desafíos para la salud, debido a la restricción que suponen en el tratamiento, dando lugar al aumento del uso de antibióticos carbapenémicos que como consecuencia ha dado lugar a la propagación mundial de las bacterias productoras de carbapenemasas. Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan los antibióticos carbapenémicos y en general al resto de betalactámicos.<sup>53</sup> Los plásmidos con los determinantes genéticos que codifican para estas enzimas suelen contener genes de resistencia a otras familias de antimicrobianos, jugando un papel importante en la limitación terapéutica y en la multirresistencia bacteriana.<sup>54</sup> Concretamente, los clones de alto riesgo de distribución mundial de la familia de las enterobacterias con mayor vinculación con estos determinantes de resistencia son el ST131 para *E. coli*, en relación con enzimas BLEE, principalmente CTX-M-15, y el ST258 para *K. pneumoniae*, asociado a enzimas carbapenemasas, tipo KPC.<sup>55</sup> Pero existen clones de alto riesgo en relación con otras familias de bacilos Gram negativos (principalmente *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*), así como en bacterias Gram positivas, que aunque son menos frecuentes en

## INTRODUCCIÓN

general, contribuyen a la dispersión de determinantes de resistencia diversos y en definitiva, suponen un impacto en la efectividad de los tratamientos antimicrobianos.<sup>54,56</sup>

En todo este contexto del aumento de infecciones por microorganismos multirresistentes surge el concepto acuñado por la IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) del grupo de microorganismos “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp*), centrando la atención en la falta de tratamientos efectivos y de previsión de desarrollo de nuevas moléculas frente a estos patógenos concretos con especial relevancia a nivel nosocomial y cuya resistencia a los antimicrobianos se ha incrementado en los últimos años.<sup>57</sup>

En conclusión, la resistencia bacteriana es un problema que atañe a la ecología global e impacta en la salud del ser humano, existiendo una vigente preocupación por los organismos internacionales los cuales ponen de manifiesto la necesidad de tomar una serie de medidas o estrategias por parte de todos los sectores implicados en el desarrollo y dispersión de la resistencia bacteriana.

### **3. Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana**

Desde el punto de vista multidimensional del problema de la resistencia bacteriana, se hace necesario aplicar una serie de medidas desde un enfoque *One Health* (Enfoque Sanitario Único), el cual defiende la colaboración de múltiples disciplinas (medicina, veterinaria, farmacéuticas, etc.) que trabajen de forma conjunta y coordinada a nivel local, nacional y, sobre todo, con políticas reguladoras a nivel internacional; para intentar solucionar el problema y lograr una salud humana, animal y ambiental óptimas.<sup>58</sup> En esta la lucha contra la resistencia, los diferentes organismos nacionales e internacionales coinciden en una serie de medidas principales esenciales para el abordaje del problema que se detallan a continuación.<sup>59</sup>

#### **3.1. Sistemas de vigilancia y trazabilidad de resistencias bacterianas**

La vigilancia, rastreo y comunicación de los datos de resistencias a nivel nacional, internacional y global son el pilar fundamental para el control de la resistencia. Ejemplo de ello son los programas de vigilancia citados previamente; como el PRAN a nivel nacional, la EARS-Net a nivel europeo, o el GLASS a nivel global. Aprovechando la tecnología informática podemos utilizar estos datos para detectar y rastrear la resistencia a través de las redes de laboratorios nacionales y entender su distribución en distintas áreas geográficas, detectando aquellas zonas en las que sea necesario intervenir.<sup>59</sup>

#### **3.2. Prevención de las infecciones**

## INTRODUCCIÓN

Las medidas de prevención y control de infecciones tienen como objetivo reducir la propagación de microorganismos, dentro de los centros sanitarios, entre distintos centros y en la propia comunidad, intentando evitar o disminuir la emergencia de nuevas infecciones y la propagación de la resistencia. En 2017 se publica un documento guía basado en la evidencia, en el que participa la OMS, que informa acerca de los puntos necesarios para el desarrollo de programas de Prevención y Control de Infecciones a nivel nacional y hospitalario.<sup>60</sup> Las medidas de prevención que han demostrado tener un verdadero impacto en la disminución de la transmisión de bacterias resistentes en el ámbito hospitalario incluyen: la higiene de manos, el cribado de pacientes portadores de microorganismos resistentes, el aislamiento de pacientes portadores y las medidas de precaución de contacto, los sistemas de alerta de readmisión de pacientes colonizados, la descolonización, la educación del personal sanitario y la limpieza de superficies y descontaminación.<sup>61</sup> Por otro lado, la vacunación forma parte de una de las estrategias importantes en salud para prevención de infecciones. Se ha visto, que de forma directa o indirecta, la vacunación puede reducir el consumo de antibióticos y la circulación de cepas resistentes en la población, ayudando así a reducir el problema de la resistencia bacteriana.<sup>62</sup>

Además, un punto importante para tener en cuenta es el control y gestión de residuos, así como la limpieza ambiental que se debe asumir en el contexto *One Water/One Health* (Agua Única/Salud Única). Las plantas de tratamiento de aguas residuales son un factor clave, especialmente aquellas que contienen residuos sanitarios, ya que en ellas se combina la presencia de bacterias con agentes selectivos (antimicrobianos, metales pesados, etc.) que puede dar lugar al desarrollo y dispersión de determinantes de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes. Por ello, el saneamiento del agua es un punto esencial en la protección de la salud pública.<sup>63</sup>

### **3.3. Uso racional y optimizado de los antimicrobianos**

De forma frecuente se hace un uso inadecuado y excesivo de los antimicrobianos, estimándose que más de la mitad de los tratamientos antimicrobianos en el ser humano no son adecuados.<sup>64</sup> La necesidad de conocer la epidemiología microbiológica local, junto con una formación específica y actualizada para seleccionar de forma óptima los antimicrobianos y su posología con el fin de evitar tratamientos inapropiados, redundantes o desproporcionados, han hecho necesaria la creación de programas institucionales y hospitalarios de optimización de tratamientos

## INTRODUCCIÓN

antimicrobianos (PROA).<sup>65</sup> En ese sentido, estos programas se han llevado a cabo en los hospitales mediante los equipos PROA y de control de IRAs (infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria). Estos equipos deben caracterizarse por ser multidisciplinares y contar con médicos expertos en enfermedades infecciosas, microbiólogos, farmacéuticos, epidemiólogos, enfermeros y otros especialistas de áreas afectadas.<sup>66</sup>

Estos programas han demostrado mejorar la respuesta clínica de los pacientes, reducir la resistencia a los antimicrobianos, así como las infecciones asociadas a la atención sanitaria, además de un ahorro de los costes sanitarios.<sup>67,68</sup> La OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), de la que actualmente forman parte diversos países de América, Europa y Asia, ha elaborado un informe en colaboración con el CDC en el que estima que la aplicación de los PROA junto con otras políticas para reducir el uso excesivo de antibióticos y la promoción de la higiene hospitalaria, podrían ahorrar 4.800 millones de dólares al año y hasta 1,6 millones de vidas para el año 2050.<sup>69</sup>

Para una mejor gestión y optimización de los antimicrobianos, la OMS facilita la clasificación AWaRe,<sup>70</sup> listado de medicamentos esenciales en la que se valora el posible impacto sobre la resistencia de cada uno de los antibióticos, elemento a tener en cuenta de forma general por cualquier médico prescriptor y en concreto por los equipos PROA.

En España se crea un documento consenso nacional por grupos de expertos de diferentes sociedades científicas con las recomendaciones de implantación de los PROA a nivel hospitalario.<sup>65</sup> Posteriormente, formando parte de uno de los objetivos del PRAN, se crea un grupo de trabajo para lograr implementar estos programas en el mayor número de centros sanitarios (hospitales y centros de atención primaria) de nuestro país. Se establecen diferentes niveles como estrategia de implantación y gestión de los mismos: nacional (Ministerio de Sanidad/AEMPS), comunidades autónomas (Gerencias de los Sistemas Autonómicos de Salud) y centros sanitarios (Gerencias de Áreas de Salud / Gerencias hospitalarias / Estructuras de Calidad de los centros sanitarios).<sup>71</sup> En este sentido, a nivel autonómico y concretamente en Andalucía desde el año 2013 se encuentra aprobado el programa PIRASOA (Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos).<sup>72</sup>

Por último, para abordar el problema de la resistencia antimicrobiana es importante contar con pruebas diagnósticas que nos ayuden a discernir cuándo los antibióticos son absolutamente necesarios para el tratamiento del paciente y existen iniciativas como VALUE-Dx. Esta iniciativa forma parte de la asociación europea “Iniciativa

## INTRODUCCIÓN

de Medicamentos Innovadores” (IMI), cuyo objetivo es generar evidencia sobre el valor médico, económico y de salud pública del diagnóstico en el tratamiento de la resistencia bacteriana.<sup>73</sup>

### **3.4. Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos**

Al poco tiempo de la introducción de los antimicrobianos como agentes terapéuticos, se hicieron los primeros descubrimientos de su efecto como promotores del crecimiento en animales.<sup>74</sup> Desde entonces, esta propiedad ha provocado un uso extenso de los antimicrobianos en la industria alimentaria con la introducción de un gran número de este tipo de sustancias en producción agrícola y animal. En el último informe de la OIE, que publica datos del 2018, participaron un total de 153 países. De estos países, el 77% referían no utilizar ningún agente antimicrobiano como estimulante del crecimiento en animales, tuvieran o no legislación reguladora. El 23% restante, confirmó el uso de antimicrobianos con este fin, de los cuales, el 57% contaban con un marco reglamentario de aquellos medicamentos destinados para este propósito.<sup>75</sup>

Hoy en día, numerosos estudios reconocen la vinculación del uso de productos antimicrobianos en producción alimentaria con el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos para uso en el tratamiento de infecciones en el ser humano, así como el impacto ecológico que supone.<sup>76,77</sup> Se sugiere un sentido bidireccional en esta transmisión de la resistencia en la que el reservorio humano y el animal influyen de manera recíproca el uno sobre el otro y probablemente el papel que ejercen los reservorios animales en la transferencia horizontal de genes sea mayor de lo que se piensa. Esta transmisión de la resistencia al ser humano puede ocurrir a través de los alimentos, por contacto directo con los animales o a través de fuentes ambientales comunes, como el agua.<sup>78</sup>

Según un metaanálisis reciente llevado a cabo por la OMS, se revela que distintas intervenciones realizadas para disminuir el uso de antimicrobianos en animales de producción alimentaria tienen un impacto en la disminución de la resistencia bacteriana tanto en los propios animales como en las personas en contacto directo con los mismos, con una disminución de la prevalencia absoluta de resistencias bacterianas, reduciéndose del 19% y el 40% a un 6% y un 20%, respectivamente. Con este estudio, la organización se reafirma en la necesidad de poner fin a estos fármacos como promotores del crecimiento en la industria alimentaria y limita el uso en veterinaria de una serie de antimicrobianos clasificados como de “importancia crítica para la salud humana”.<sup>79,80</sup>

## INTRODUCCIÓN

Parece que se está produciendo un aumento en la prevalencia de bacterias resistentes en animales de producción alimentaria, sobre todo en países con menos recursos socioeconómicos y sanitarios. En un estudio en el que valoran la variación de la resistencia antimicrobiana entre patógenos comunes de origen alimentario (*E coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. no tifoidea y *S. aureus*) en los países en vías de desarrollo en el periodo de 2000 a 2018, observan un incremento en la proporción de la resistencia de forma global en las bacterias aisladas del pollo y del cerdo, detectándose las tasas más elevadas en países como India o China.<sup>81</sup>

La legislación del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la industria alimentaria animal difiere entre los diferentes países. En la Unión Europea, el uso de estas sustancias como aditivos promotores del crecimiento en producción animal está prohibido desde el año 2006,<sup>82</sup> observándose una disminución de la venta de antimicrobianos para uso veterinario en esta región de un 32,5% en el periodo de 2010 al 2017.<sup>83</sup> El nuevo reglamento del Parlamento Europeo que entrará en vigor en 2022 sobre regulación de medicación de uso veterinario introduce una serie de cambios entre los que destaca la restricción del uso preventivo de los antimicrobianos en grupos de animales y piensos medicamentosos,<sup>84</sup> lo cual supondrá una mejora para el uso responsable de este tipo de medicamentos. En Estados Unidos, sin embargo, en 2017, la FDA (*Food and Drug Administration*) cesa la aprobación de medicamentos antimicrobianos como promotores del crecimiento animal y publica una serie de guías dirigidas a la industria farmacéutica para que, de forma voluntaria y paulatina, aquellos medicamentos previamente aprobados para venta libre sean revisados para uso único bajo supervisión veterinaria y requisito indispensable de receta.<sup>85</sup> Se ha observado una reducción en este país del 43% entre 2015 y 2017 en las ventas y la distribución de antibióticos de importancia médica aprobados para uso en animales de producción alimentaria que se atribuye a las medidas impuestas por la FDA, aunque en 2018 sufrió un ligero aumento del 8%.<sup>85,86</sup> China, uno de los países con un mayor consumo de antibióticos destinado a animales de producción, ha prohibido el uso concreto de la colistina en este sector y propone eliminar todos los antibióticos de los alimentos para el año 2050.<sup>87,88</sup>

En 2013, el consumo global de antimicrobianos en animales de producción alimentaria se estimó en 131.109 toneladas [IC95% (100.812 a 190.492 toneladas)] y se prevé que alcance las 200.235 toneladas [IC95% (150.848 a 297.034 toneladas)] en el año 2030. Para paliar este consumo excesivo se proponen medidas globales para regular el consumo máximo de antibióticos al año por países para este fin, así como límites comerciales o la introducción de un impuesto específico para antibióticos destinados al

## INTRODUCCIÓN

uso veterinario.<sup>89</sup> La OMS, con el fin de reducir el impacto que ejerce el uso de los antimicrobianos en veterinaria sobre la resistencia bacteriana, actualiza la lista de antimicrobianos de “importancia crítica para la salud humana” cada dos años y proporciona una guía sobre el uso de estos medicamentos en animales destinados a la producción de alimentos.<sup>80,90</sup> Asimismo, existen programas de optimización del uso de antimicrobianos en el ámbito de la agricultura y la ganadería dirigidos por la FAO dependiente de las Naciones Unidas, como parte del plan de acción global frente a la resistencia antimicrobiana.<sup>91</sup>

### 3.5. Desarrollo de nuevos antimicrobianos

El desarrollo de una gama más amplia de antibióticos es primordial a medida que aumenten las infecciones por bacterias multirresistentes. La investigación y desarrollo de antibióticos se centra hoy en día en derivados de antiguas clases de antibióticos y en el descubrimiento de nuevos compuestos, tanto sintéticos como naturales, utilizando plataformas de desarrollo innovadoras.<sup>92</sup>

En 2019, el IACG sobre Resistencia a los Antimicrobianos recalca la clara necesidad de aumentar la inversión en investigación y desarrollo de antibióticos y en ese mismo año,<sup>93</sup> el G20 renueva su compromiso para colaborar con la investigación y el desarrollo de antibióticos.

Para dar apoyo a esta necesidad, existen varias iniciativas internacionales que cuentan con fuentes de financiación diversas y que invierten en I+D (Investigación y Desarrollo) de antimicrobianos. Cabe destacar la ND4BB (*New Drugs for Bad Bugs*), que forma parte de la IMI, la cual cuenta con proyectos como COMBACTE-MAGNET (*Combating Bacterial Resistance in Europe-Molecules against Gram-Negative Infections*) o ENABLE (*European Gram-Negative Antibacterial Engine*), o los proyectos JPIAMR (*Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance*); ambas iniciativas sujetas a financiación de la Unión Europea. Organizaciones como GARDP (*Global Antibiotic Research and Development Partnership*) o Global AMR R&D Hub, o iniciativas como CARB-X (*Combating Antibiotic-Resistant Bacteria-X*) o REPAIR (*Replenishing and Enabling the Pipeline for Anti-Infective Resistance*), destacan entre otras que se llevan a cabo a nivel internacional y nacional con este fin.<sup>94</sup> Otra estrategia diferente para incentivar el desarrollo de estos fármacos es la propuesta por el Servicio Nacional de Salud del Reino Unido, el cual establece proporcionar apoyo económico a aquellas compañías farmacéuticas que aporten nuevos antimicrobianos, teniendo en cuenta su utilidad.<sup>95</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los Estados Miembros solicitaron a la OMS la elaboración de un listado con los “patógenos prioritarios” a nivel mundial para los cuales se deben priorizar y dirigir las distintas estrategias de I+D.<sup>96</sup> En el análisis publicado por la organización en 2019 sobre el desarrollo de nuevos antimicrobianos desde el año 2017, en el que analiza de forma particular aquellos dirigidos frente a los “patógenos prioritarios”, determinan que en este periodo se han aprobado 8 nuevos tratamientos antimicrobianos, de los cuales solo 2 cumplen al menos uno de los criterios establecidos de innovación, siendo el resto derivados de clases de antibióticos ya conocidas. El 50% de estos nuevos tratamientos se dirigen frente a enterobacterias resistentes a carbapenémicos, y ninguno de ellos frente a *A. baumannii* o *P. aeruginosa* resistentes a estos antibióticos.

El problema fundamental radica en que estos tratamientos ofrecen pocas ventajas respecto a los antimicrobianos preexistentes, sus precios son más elevados y por ahora no se encuentran incluidos en las guías clínicas. Además, 6 de estos 8 fármacos pertenecen a clases de antimicrobianos ya conocidas con mecanismos de resistencia múltiples y bien establecidos, por lo que se prevé la posibilidad de una rápida aparición de resistencias a estos nuevos agentes.<sup>97</sup>

Para complementar este análisis, la OMS analiza los antimicrobianos en desarrollo que se encuentra en fase preclínica para así identificar los posibles proyectos más prometedores frente a los “patógenos prioritarios”, *Mycobacterium tuberculosis* y *Clostridium difficile*; publicando sus datos en la plataforma de libre acceso *WHO Global Observatory on Health R&D* (Observatorio Mundial de la OMS en I+D en Salud). En la última revisión, se encuentran en desarrollo 252 agentes antimicrobianos dirigidos frente a estos microorganismos en las que participan diferentes instituciones de distintas zonas geográficas, principalmente del continente europeo (45,5%) y americano (35,2%). De estos 252 fármacos antimicrobianos en desarrollo preclínico, el 42,9% son moléculas pequeñas de acción directa y el 35,7% son productos denominados como “no tradicionales” (fagos, agentes frente a factores de virulencia, inmunomoduladores, etc.). Un total de 38 de estos agentes se dirigen al tratamiento de los “patógenos prioritarios” Gram negativos.<sup>98</sup>

Numerosas fuentes han proporcionado información para realizar esta revisión, como programas e iniciativas de I+D internacionales u otras bases de datos de vigilancia de antimicrobianos en desarrollo como *Pew Charitable Trusts*. Esta base de datos evalúa los antibióticos sistémicos en desarrollo con especial interés en aquellos dirigidos frente a los “patógenos prioritarios” y a los microorganismos “ESKAPE”. En su revisión de abril del 2020, de los 41 antibióticos en desarrollo, 15 se encuentran en fase 1 de ensayos

## INTRODUCCIÓN

clínicos, 12 en fase 2, 13 en fase 3 y 1 se ha solicitado como nuevo medicamento. Desde el año 2014 al 2019, se han aprobado 14 medicamentos por las diferentes agencias reguladoras, 4 en el último año, de los cuales 9 se dirigen frente a microorganismos “ESKAPE” y 5 de esos a su vez frente a los considerados “patógenos prioritarios”. De los que se encuentran en fase de desarrollo clínico, al menos 18 de los 41 antibióticos, tienen el potencial para tratar infecciones causadas por patógenos Gram negativos del grupo “ESKAPE”, y de éstos, al menos 13 tienen actividad potencial frente a enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* productores de BLEE o resistentes a carbapenémicos, pero ninguno de ellos pertenece a una nueva clase o mecanismo de acción antimicrobiana.<sup>99</sup>

A pesar de todas estas iniciativas el desarrollo de nuevos antimicrobianos y los esfuerzos llevados a cabo por la industria farmacéutica, sigue siendo un propósito difícil debido a diversos motivos, entre los que destacan principalmente los argumentos económicos (altos costes con bajas remuneraciones), pero también la propia dificultad de desarrollar de forma adecuada los ensayos clínicos. Por otro lado, gracias a los avances recientes en técnicas que cuentan con mayor rendimiento diagnóstico junto con el importante desarrollo de la secuenciación genética, puede que el proceso de búsqueda de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas se agilice y se vea favorecido en los próximos años.<sup>100</sup>

Por último, es importante tener en cuenta que no solo el desarrollo de los nuevos antimicrobianos es prioritario, sino que su distribución y el acceso global a los mismos, así como a los ya existentes en el mercado, es crucial. La falta de acceso a los antimicrobianos genera más mortalidad a nivel mundial que la causada por el problema en sí de la resistencia bacteriana.<sup>101</sup>

### 3.6. Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

Del incremento de la resistencia bacteriana en los últimos años junto con el escaso desarrollo de nuevos antimicrobianos frente a los cuales se originarán probablemente nuevos mecanismos de resistencia, surge la motivación de búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas innovadoras como estrategias en la lucha frente a estos microorganismos, ya sean enfocadas a su uso en monoterapia o como adyuvantes a tratamientos antimicrobianos ya conocidos, dependiendo del mecanismo y espectro de acción de la molécula.<sup>102</sup>

Los antimicrobianos actúan mediante la unión a dianas específicas e inhiben funciones esenciales para la supervivencia o desarrollo de la célula bacteriana,

## INTRODUCCIÓN

provocando un efecto bactericida (inducción de la muerte celular) o bacteriostático (inhibición del crecimiento celular). Su acción se ejerce principalmente mediante la unión a dianas celulares que inducen diferentes procesos de muerte activa a través de dos vías: (1) dañando procesos celulares esenciales (a través de la inhibición de la síntesis del ADN, del ARN, de las proteínas o de la pared celular) y (2) induciendo la respuesta de estrés celular bacteriano que aumentan la actividad metabólica, generando metabólicos tóxicos que dañan los componentes celulares.<sup>103,104</sup> En este sentido, se han desarrollado numerosas sustancias alternativas a los antimicrobianos, dirigiéndose a dianas celulares bacterianas diferentes a los de los antimicrobianos, actuando a diferentes niveles: sobre mecanismos propios de la bacteria<sup>105,106</sup>, sobre el entorno bacteriano<sup>104</sup> o mediante sustancias moduladoras del sistema inmune del propio huésped.<sup>107</sup>

En primer lugar, las diferentes estrategias alternativas a los antimicrobianos dirigidas a mecanismos propios de la bacteria van a actuar principalmente inhibiendo mecanismos de resistencia, mecanismos de virulencia<sup>106</sup> o actuando sobre procesos fisiometabólicos bacterianos, permitiendo o potenciando la acción del antimicrobiano.

Entre las estrategias dirigidas a desactivar los mecanismos de resistencia, juegan especial importancia los inhibidores de enzimas de resistencia antimicrobiana, como los inhibidores de enzimas betalactamasas, los cuales llevan décadas bajo uso clínico y aún hoy en día permanecen bajo búsqueda activa de nuevos compuestos.<sup>105</sup> Pero también existen otros más novedosos en fases preclínicas, como los inhibidores del enzima FosA (enzima que inhibe la acción del antibiótico fosfomicina) con uso potencial para el tratamiento de infecciones por microorganismos multirresistentes,<sup>108</sup> o los dirigidos a otros mecanismos de resistencia, como a la inhibición de bombas de expulsión<sup>109</sup> o al aumento de la permeabilidad celular;<sup>110</sup> los cuales hasta ahora no cuentan con un uso distribuido en la clínica. Estudios recientes utilizan nuevas aproximaciones tecnológicas para búsqueda de nuevas moléculas que modulan la actividad de las bombas de expulsión de antimicrobianos evitando aquellas que produzcan efectos tóxicos en la propia célula eucariota.<sup>111</sup>

Por otro lado, existen una gran variedad de fármacos que actúan como inhibidores de los mecanismos de virulencia. Algunos de ellos cuentan con aprobación para su uso clínico y otros muchos que se encuentran actualmente en desarrollo, dirigidos de forma general a inhibir sistemas de comunicación celular que estimulan la producción de factores de virulencia o supervivencia bacteriana, como es el caso del *quorum sensing*,<sup>112</sup> o que de forma directa actúan sobre los propios factores o proteínas de secreción de factores de virulencia.<sup>106</sup> En relación con el mecanismo de acción de los

## INTRODUCCIÓN

propios antimicrobianos, los cambios fisiometabólicos en la bacteria pueden dar lugar al aumento de la sensibilidad bacteriana a un antimicrobiano mediante la potenciación del estrés celular y la subsecuente producción de la muerte celular. Numerosos estudios se han realizado en este sentido sobre cómo influye en la sensibilidad a los antimicrobianos el propio metabolismo bacteriano y la traducción de proteínas,<sup>113,114</sup> la presencia de especies reactivas de oxígeno<sup>115</sup> o el funcionamiento deficiente de los sistemas de reparación del ADN,<sup>116-118</sup> que finalmente confluyen en el proceso final de aumento del estrés celular bacteriano.

En definitiva, la letalidad de los antibióticos es un proceso complejo y todos aquellos factores ambientales que de alguna forma produzcan cambios fisiometabólicos en la bacteria, ya sea por la presencia de determinados nutrientes, moléculas señal (*quorum sensing*) o las concentraciones de oxígeno ambientales son de especial interés como posibles dianas para potenciar el efecto antimicrobiano.<sup>104</sup>

Además, existen otras líneas de tratamiento alternativas que consisten en la utilización de otro tipo de microorganismos para producir la muerte de la bacteria patógena o su desplazamiento por competencia en el medio, ya sea mediante fagos<sup>119</sup> o por el uso discutido de probióticos.<sup>120</sup>

Por último, existe una tendencia actual en la búsqueda de nuevos tratamientos antimicrobianos mediante la revisión de fármacos que se han desarrollado con fines no antimicrobianos (antihistamínicos, anticancerígenos, etc.) como posibles estrategias terapéuticas frente a las bacterias.<sup>121</sup>

### **3.7. Rescate de antimicrobianos en desuso**

Otra de las estrategias que se pueden llevar a cabo para superar el problema global de la resistencia bacteriana y el escaso desarrollo de nuevos tratamientos antimicrobianos es el uso o rescate de antiguos antimicrobianos que en la actualidad siguen siendo activos frente a bacterias multirresistentes. Entre estas viejas moléculas que, en concreto, siguen siendo activas frente a los bacilos Gram negativos multirresistentes, se encuentran antimicrobianos como la colistina, el cloranfenicol, la nitrofurantoína, la minociclina, la temocilina, la tigeciclina, los aminoglucósidos (tobramicina, amikacina o gentamicina) o la fosfomicina. Estos se desarrollaron durante las primeras décadas de desarrollo de los antimicrobianos, pero muchos de ellos se dejaron de usar debido a la disponibilidad de nuevas moléculas con mejor actividad, menor toxicidad y/o vías de administración menos complejas.<sup>122</sup>

## INTRODUCCIÓN

La expansión mundial de los patógenos multirresistentes y, en particular, la de las enterobacterias productoras de carbapenemasas, ha puesto de manifiesto que antibióticos como los aminoglucósidos o la fosfomicina, pueden mantener su actividad incluso en aislados extremadamente resistentes.<sup>123-125</sup>

Sin embargo, la sensibilidad a los aminoglucósidos varía en función de la distribución y diseminación de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, mecanismo de resistencia a estos antimicrobianos que frecuentemente se transportan junto con otros genes de resistencia en elementos genéticos móviles. Esto es de especial motivo de preocupación cuando la resistencia a los aminoglucósidos acompaña a otros determinantes de resistencia que afectan a antimicrobianos de último recurso como son las enzimas carbapenemasas.<sup>123</sup>

Por otro lado, tras su descubrimiento en los años 60, el uso clínico de la fosfomicina intravenosa se ha mantenido en niveles relativamente constantes pero bajos. El interés por la fosfomicina intravenosa se ha renovado en el siglo XXI con un nuevo papel en la lucha actual contra las bacterias Gram negativas multirresistentes y panresistentes, presentando buena actividad frente a microorganismos clínicamente relevantes como *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli* productor de BLEE o *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos.<sup>125</sup>

Aunque la mayoría de estos fármacos muestran buena sensibilidad *in vitro*, lo que ocurre con los antiguos antimicrobianos que se aprobaron hace décadas es que, en la mayoría de los casos, la información sobre los datos de farmacocinética o dosificaciones no se han revisado desde su origen, pudiendo ser erróneos o simplemente estar incompletos. Por ello, se hace necesaria la revisión de estos parámetros en estos antiguos fármacos; sobre todo, teniendo en cuenta el uso cada vez más frecuente de los mismos como último recurso en el tratamiento de infecciones por microorganismos multirresistentes.<sup>126</sup> En consecuencia, es muy importante tener en cuenta el uso óptimo de estos fármacos e integrarlos en el manejo clínico de estas infecciones junto con los nuevos fármacos que mantienen aún su actividad conservada con bajos niveles de resistencia. Se debe hacer una valoración de las opciones terapéuticas que existen para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes, tanto antiguas como novedosas, teniendo en cuenta las limitaciones terapéuticas de cada fármaco con el objetivo de conseguir un tratamiento eficaz y el menor impacto ecológico posible.<sup>127,128</sup>

### 4. Fosfomicina

#### 4.1. Historia

La fosfomicina es un antibiótico derivado del ácido fosfónico que se encontró por primera vez en caldos de fermentación de la bacteria *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096) en España. Gracias a la colaboración de Merck y la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA) se publica su descubrimiento en el año 1969.<sup>129</sup> Este antibiótico se produce además por otros microorganismos como otras especies de *Streptomyces*, entre ellos *S. viridochromogenes* (ATCC 21240) y *S. wedmorensis* (ATCC 21239), así como por *Pseudomonas syringae*<sup>130</sup>, *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas fluorescens*.<sup>131</sup> Posteriormente se consiguió la elaboración sintética y es la que se lleva a cabo para su producción en la actualidad.<sup>132</sup>

Su mecanismo de acción se describe por primera vez en 1974<sup>133</sup> y hasta 1983, catorce años más tarde de su purificación, no se estandarizó el método de estudio de sensibilidad *in vitro* a este antibiótico.<sup>134</sup> Descubrieron que era necesario añadir glucosa-6-fosfato (G6P) para que la fosfomicina pudiera actuar y los resultados obtenidos *in vitro* fuesen más concordantes con los observados en clínica. Además, estudios realizados a finales de los años 70 sugirieron que durante las infecciones pueden producirse concentraciones mínimas de G6P y que la adición de esta sustancia al tratamiento con fosfomicina podía aumentar la actividad del antibiótico en modelos experimentales.<sup>133,135</sup> En un principio se desarrollaron dos formulaciones químicas diferentes, una en forma de sal disódica hidrosoluble para la forma intravenosa y otra en forma de sal cálcica para la oral. Con posterioridad se desarrolló la fórmula oral de fosfomicina-trometamol, la cual se ha convertido en el tratamiento de elección por presentar una mejor biodisponibilidad que la sal cálcica.<sup>136</sup>

En Europa y Estados Unidos, su uso oral se recomienda principalmente para el tratamiento de infecciones no complicadas del tracto urinario o como profilaxis previa a procedimientos quirúrgicos del tracto urinario en algunos países.<sup>137,138</sup> Sin embargo, el uso de fosfomicina por vía parenteral, debido al aumento en las últimas décadas de infecciones por bacterias multirresistentes frente a las que este antibiótico sigue siendo activo, no se ha visto reservado al tratamiento exclusivo de infecciones del tracto urinario, sino que se ha utilizado en el tratamiento de infecciones de distintos focos causadas por diferentes microorganismos.<sup>139</sup>

Este incremento en el uso de este antiguo fármaco ha suscitado que diferentes organismos reguladores de fármacos, como la EMA (*European Medicines Agency*) o la FDA, despierten su interés en realizar una revisión y regulación de las

## INTRODUCCIÓN

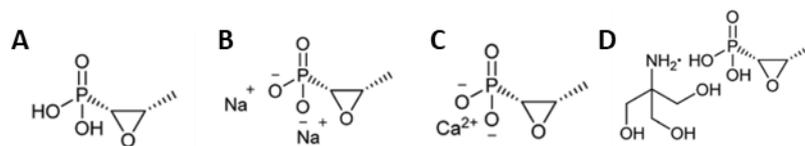
indicaciones y formas de administración apropiadas. La última revisión realizada por la EMA con las recomendaciones para el uso de este fármaco en sus diferentes formulaciones se ha publicado en marzo de 2020 y se encuentran pendientes de remisión a la Comisión Europea, para su aprobación final, la cual será vinculante a todos los Estados miembros de la Unión Europea. En este documento se recomienda el uso de fosfomicina intravenosa como tratamiento de segunda línea para infecciones complicadas del tracto urinario, endocarditis, neumonía o meningitis bacteriana, entre otras.<sup>138</sup> Sin embargo, el fármaco CONTEPO, nombre comercial de la fosfomicina intravenosa en Estados Unidos, se encuentra aún pendiente de aprobación por la FDA, y estaría dirigido exclusivamente al tratamiento de infecciones complicadas de origen urinario tras haber realizado un estudio previo de no inferioridad frente al tratamiento de estas infecciones con piperacilina/tazobactam.<sup>140</sup>

### 4.2. Características moleculares

La fosfomicina es un compuesto organofosforado derivado del ácido fosfónico, altamente polar (ácido cis-1,2-epoxipropil fosfónico) y de bajo peso molecular (138 Da) que representa su propia clase de antibióticos. Es una molécula simple con solo tres átomos de carbono, soluble en agua y similar al fosfoenolpiruvato (PEP), cuyas propiedades farmacológicas se mantienen inalteradas en condiciones normales de almacenamiento durante 2-3 años.<sup>141</sup> Contiene varias características químicas que, de forma habitual, no se observan en los compuestos organofosforados: (1) se forma por un grupo epoxídico al que se une un grupo fosfórico cargado negativamente, el cual se encarga de la acción bactericida; y (2) presenta un enlace directo entre el carbono y el fósforo, sin puente intermedio de oxígeno, como es habitual en estos compuestos.<sup>142</sup>

La molécula es estable en un intervalo de pH que oscila de 4 a 11, pero su acción óptima es a pH de 6,2. La forma parenteral disódica se obtienen mediante la sustitución de los dos átomos de hidrógeno del radical fosfórico por átomos de sodio, y la oral cálcica por un átomo de calcio. En el caso de la formulación oral de fosfomicina-trometamol, se consigue mediante la incorporación de una base orgánica tris-hidroximetil-aminometano (trometamol o trometamina) (Figura 1).<sup>143</sup>

## INTRODUCCIÓN

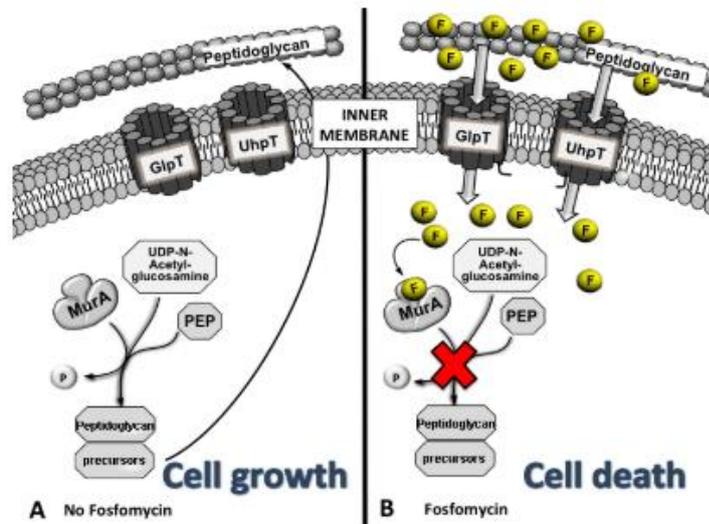


**Figura 1.** Estructura molecular de fosfomicina (A), disódica (B) cálcica (C) y fosfomicina-trometamol (D).<sup>132</sup>

### 4.3. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción y estructura química única, son la base de las propiedades clínicas de este fármaco. La fosfomicina es un antibiótico bactericida que inhibe la síntesis de la pared celular en uno de los primeros pasos, actuando sobre la fase de crecimiento bacteriano.<sup>143</sup> Interfiere con el enzima difosfato de uridina (UDP)-N-acetilglucosamina-3- enolpiruviltransferasa (MurA) en el primer paso citoplasmático de la biosíntesis de la pared celular bacteriana.<sup>133</sup>

La fosfomicina penetra en el citoplasma celular utilizando dos proteínas transportadoras de membrana del tipo *major facilitator superfamily* denominados UhpT y GlpT, las cuales se encargan principalmente del transporte de G6P y glicerol-3-fosfato (G3P), respectivamente, en *E.coli*.<sup>144,145</sup> Este fármaco es un análogo del PEP y actúa mediante la inactivación específica de la biogénesis de la pared celular bacteriana mediante la inhibición irreversible del enzima MurA, sin interferir en las reacciones que requieren de PEP en las células eucariotas.<sup>143</sup> Este enzima se encarga de catalizar la unión del PEP a UDP-N-acetilglucosamina en el primer paso de la biosíntesis del peptidoglicano.<sup>146</sup> Para ello, la fosfomicina se une de forma covalente mediante un enlace de tioéter con el aminoácido Cys115 del sitio activo del enzima.<sup>147-149</sup> Esta interacción de la molécula de fosfomicina se produce a través del grupo fosfonato, el cual se une a la Cys115 e interacciona electrostáticamente con los residuos conservados de Lys22, Arg120 y Arg397 de la proteína MurA (Figura 2).<sup>149,150</sup>



**Figura 2. A)** Representación del mecanismo de acción de MurA en la formación del peptidoglicano de la membrana bacteriana. **B)** La fosfomicina (F) penetra en la bacteria a través de cualquiera de los transportadores (GlpT y/o UhpT) y se une a MurA, bloqueando su actividad.<sup>146</sup>

Un complejo sistema de regulación con un papel importante de la presencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) así como su complejo receptor (CRP), entran en juego en la expresión de estos transportadores.<sup>146</sup>

#### 4.4. Espectro de acción. Epidemiología de la resistencia frente a bacterias Gram negativas.

La fosfomicina se considera un antimicrobiano de amplio espectro debido a su actividad frente a diferentes especies bacterianas, tanto Gram negativas como Gram positivas. Al mismo tiempo, se trata de una molécula cuya eficacia se mantiene frente a los microorganismos multirresistentes.<sup>125</sup>

#### Espectro de acción frente a bacterias Gram negativas. Distribución entre especies y epidemiología de la resistencia.

De forma general, este antibiótico presenta una excelente actividad frente a los microorganismos Gram negativos, principalmente frente a enterobacterias de origen urinario. Los estudios demuestran porcentajes de sensibilidad elevados para la especie bacteriana de *E. coli*, que varían de un 100% a un 81%. Sin embargo, para *K. pneumoniae* suelen observarse porcentajes más bajos, con valores de resistencia que varían entre un 85% y un 100% de los aislados, dependiendo de las zonas geográficas.<sup>125,151</sup>

## INTRODUCCIÓN

Si analizamos la sensibilidad de otras enterobacterias a fosfomicina, *Proteus* spp y *Enterobacter* spp presentan porcentajes de resistencia más altos que *E. coli*, llegando en algunos estudios a valores del 50% y del 25%, respectivamente.<sup>125,151,152</sup> Sin embargo, *Citrobacter* spp es una especie que mantiene porcentajes altos de sensibilidad a este antibiótico, con estudios que demuestran porcentajes de resistencia por debajo del 1%.<sup>153</sup>

Por otro lado, entre los bacilos Gram negativos no fermentadores, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* presentan sensibilidad disminuida a la fosfomicina, con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 16 mg/L y 64 mg/L.<sup>154</sup> Fosfomicina presenta buena actividad frente a *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*, aunque frente a otras especies de los géneros *Bordetella*, *Legionella*, *Pasteurella*, y *Vibrio*, su actividad es moderada.<sup>155,156</sup>

Además, diversos estudios demuestran la actividad de fosfomicina frente a los bacilos Gram negativos, que presentan múltiples mecanismos de resistencia, especialmente en enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasa; sin embargo, existen indicios de que la resistencia a este antibiótico está aumentando en este tipo de microorganismos. Concretamente, en un estudio realizado en España en más de 16.000 cepas de *E. coli* productor de BLEE, entre los años 2005 a 2011, se muestra una reducción significativa de la sensibilidad. En este estudio, realmente la actividad de la fosfomicina durante los últimos años se mantuvo por encima del 80%, mientras que la resistencia a otros antimicrobianos como ciprofloxacino o cotrimoxazol, fueron del 78,2% y del 62,3%, respectivamente; dando la impresión de que el fenómeno de la corresponsión en enterobacterias productoras de BLEE se relaciona más con otros antibióticos que con fosfomicina.<sup>157</sup> En cuanto a las enterobacterias productoras de carbapenemasa, la mayoría de los datos provienen de estudios realizados con aislados productores de carbapenemasa de tipo KPC, con porcentajes de sensibilidad que varían desde un 39% hasta un 100%.<sup>125,158,159</sup> Destacar, que este antibiótico mantiene su actividad frente a aislados de enterobacterias que presentan resistencia a otros antimicrobianos del grupo de reserva AWaRe<sup>70</sup> como es la colistina por mecanismos de resistencia plásmido *mcr-1*.<sup>160</sup>

Respecto a la actividad de la fosfomicina frente a bacilos Gram negativos no fermentadores considerados multirresistentes, como *P. aeruginosa*, su sensibilidad es muy variable según los diferentes estudios y en base a la localización geográfica.<sup>125,161</sup> Algunas especies de *Acinetobacter*, como *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis* se consideran intrínsecamente resistentes a fosfomicina según EUCAST, así como otros

## INTRODUCCIÓN

microorganismos Gram negativos como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* o *Leclercia adecarboxylata*.<sup>162</sup>

Recientemente se ha comprobado que genes homólogos a *fosA* plasmídicos están presentes en la mayoría de los cromosomas de especies como *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa*; lo que explicaría la sensibilidad disminuida de estos microorganismos a la fosfomicina. Por el contrario, no se han encontrado en el cromosoma de *E. coli*, ni tampoco en el de *A. baumannii* ni *B. cepacia*, ya que la resistencia intrínseca de estas dos últimas especies se produce por otros mecanismos.<sup>163</sup>

### Epidemiología de la resistencia en Gram negativos

En Europa, un estudio multicéntrico reciente, refleja tasas de resistencia a fosfomicina en aislados de *E. coli* inferiores al 1,2%.<sup>164</sup> Se han reportado valores más elevados en otros países europeos como Alemania (4,5%),<sup>165</sup> aunque se observa buena actividad de este fármaco frente a otras enterobacterias como *Proteus mirabilis* o *Enterobacter spp.*, además de frente a enterobacterias productoras de carbapenemasas o *E. coli* productor de BLEE.<sup>165,166</sup> En un estudio realizado en Francia en el que analizan 51.643 aislados de *E. coli* de origen urinario, de los que un 3,3% eran productores de BLEE, y 3.495 aislados de *K. pneumoniae*; se mostraron valores de sensibilidad a fosfomicina superiores al 95%. En otro realizado en Suiza en aislados de *E. coli* de infección urinaria comunitaria y nosocomial se encontraron tasas de resistencia a fosfomicina del 0% entre aquellos aislados productores de BLEE que por el contrario presentaban tasas de resistencia superiores al 69% a otros antibióticos, como amoxicilina-clavulánico, quinolonas o cotrimoxazol.<sup>167,168</sup>

En España, la resistencia a la fosfomicina en *E. coli* ha variado a lo largo del tiempo. Dos estudios multicéntricos describen un aumento de la resistencia desde el año 2003, tanto en aislados productores de BLEE como en los no productores,<sup>169,170</sup> pero sigue siendo muy baja variando entre las diferentes comunidades autónomas. A modo de ejemplo, en la comunidad autónoma de Aragón, los estudios realizados muestran valores de resistencia a fosfomicina inferiores al 4% en aislados de infección urinaria de origen comunitario entre los años 2011 y 2013.<sup>171</sup> En Galicia los porcentajes de sensibilidad a fosfomicina en aislados de *E. coli* procedentes de muestras urinarias de diferentes hospitales entre los años 2011 y 2012, son superiores al 95%, observándose las tasas más elevadas en los pacientes mayores de 75 años de sexo masculino, y las más

## INTRODUCCIÓN

bajas en población pediátrica.<sup>172</sup> Sin embargo, los estudios muestran valores de sensibilidad a fosfomicina menores en *K. pneumoniae*, y sobre todo en aquellos aislados que presentan otros mecanismos de resistencia de forma concomitante. En un estudio retrospectivo realizado en Valladolid sobre el perfil de sensibilidad de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras de orina se mostraron valores de resistencia de un 11,3% y un 54%, respectivamente.<sup>173</sup>

A nivel global, los estudios demuestran que la resistencia general a la fosfomicina en China es mayor que en otras partes del mundo, tanto en aislados de muestras de origen humano como de animales, lo que podría atribuirse a la presencia del mecanismo de resistencia plasmídico *fosA3*, el cual es muy prevalente en esa zona geográfica.<sup>174,175</sup> En un estudio realizado en Taiwán se han observado tasas de resistencia a fosfomicina en *K. pneumoniae* productora de BLEE de un 27,8%, de los cuales ninguno se atribuía a mecanismos de resistencia a fosfomicina de tipo plasmídico. Sin embargo, otros estudios realizados en Hong Kong indican que entre los aislados resistentes a fosfomicina de muestras de infección urinaria y bacteriemia, el 44% se debía a la presencia del gen *fosA3*.<sup>176</sup> Además, en este país se describen tasas de resistencia a fosfomicina de hasta el 60,8% en aislados de *K. pneumoniae* productor de KPC y del 12,5% de los portadores de BLEE. Del total de estos aislados portadores de *bla<sub>KPC</sub>*, un 34% portaban a su vez el gen *fosA3* presente en el mismo elemento plasmídico.<sup>159</sup> Aunque la tasa general de resistencia a fosfomicina es menor que la de otros agentes antimicrobianos, el aumento de la resistencia a esta molécula es motivo de preocupación, y sobre todo la posible diseminación del gen *fosA3* a diferentes localizaciones geográficas. De hecho, este gen se ha descrito posteriormente en otros países como Japón, Estados Unidos o en el continente europeo.<sup>177-179</sup>

En Estados Unidos se muestran de nuevo tasas de sensibilidad en aislados clínicos de *E. coli* que oscilan entre valores del 96-99%,<sup>180,181</sup> pero realmente si analizamos aquellos productores de BLEE de esta especie o de *K. pneumoniae*, los porcentajes de sensibilidad disminuyen hasta un 68% y un 53,6%, respectivamente.<sup>181,182</sup> En los países africanos los estudios son más escasos, pero los pocos que se realizan reflejan que fosfomicina sigue manteniendo su actividad en este continente. En países como Sudáfrica o Madagascar, se han realizado estudios que reflejan valores de resistencia en aislados de *E. coli* de entre un 0% y un 3%. Al igual que en el resto del mundo, los estudios muestran que la fosfomicina sigue siendo uno de los antibióticos más activos frente a aislados de *E. coli* de infecciones urinarias.<sup>183-185</sup>

### **Espectro de acción frente a Gram positivos**

En este grupo de microorganismos se consideran intrínsecamente resistentes a fosfomicina las especies bacterianas de *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus capitis* y *Corynebacterium spp.*<sup>162</sup>

*S. aureus* es junto con *E. coli* de los microorganismos más sensibles a fosfomicina, presentando los valores de CMI más bajos frente a este antibiótico. Existe una variabilidad entre los estudios con respecto a los porcentajes de sensibilidad a fosfomicina de este microorganismo, con valores que oscilan entre un 33.2% y un 100% de los aislados. Sin embargo, los porcentajes de sensibilidad son superiores al 90% en más del 75% de los estudios.<sup>125</sup> Así mismo, en *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) se mantienen porcentajes de sensibilidad similares a fosfomicina; sin embargo, varios estudios han observado porcentajes inferiores al 50%,<sup>186</sup> encontrándose una asociación con el linaje clonal, como es el caso del SARM ST5.<sup>187</sup>

Las diferentes especies de *Enterococcus spp* presentan también buena respuesta a este fármaco, aunque de nuevo los resultados varían según los distintos estudios. La fosfomicina es activa frente a la mayoría de *Enterococcus faecalis*, así como frente a *E. faecium* incluso resistente a vancomicina.<sup>125</sup> Existen estudios que presentan valores variables de sensibilidad a fosfomicina en *E. faecium* resistente a vancomicina encontrándose entre 30 y el 80%.<sup>188,189</sup>

En un estudio realizado en un total de 1.847 aislados Gram positivos de foco distinto al urinario, se observó un porcentaje de resistencia a fosfomicina general de un 69,1%. Al analizar estos datos por las diferentes especies bacterianas, el 99,3% de aislados de *S. aureus*, incluyendo SARM, fueron sensibles a fosfomicina; sin embargo, se encontraron porcentajes de sensibilidad más bajos en estafilococos coagulasa negativos (77,5%), *Streptococcus pneumoniae* (61,9%), *Streptococcus pyogenes* (40,6%) y otros Gram positivos (48,4%).<sup>190</sup>

### **4.5. Mecanismos de resistencia**

Como se observa en los datos expuestos en el apartado anterior, fosfomicina presenta una excelente actividad frente a una variedad muy amplia de bacterias, incluyendo bacterias multirresistentes. Sin embargo, se describen varios mecanismos de resistencia a este antibiótico que se pueden clasificar de forma general como: mecanismos de resistencia intrínsecos (o inherentes a la bacteria) o adquiridos. También se han descrito poblaciones bacterianas que presentan una forma especial de respuesta al antibiótico que se denomina como heterorresistencia, la cual se describirá en mayor detalle en el punto 6 de este apartado.

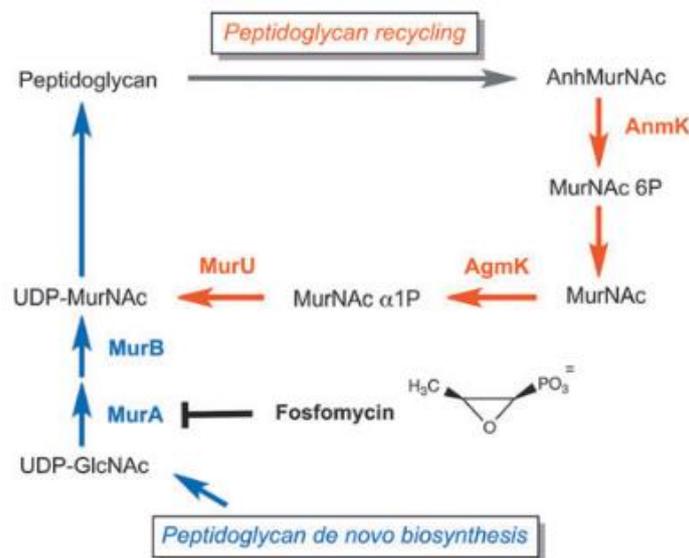
**Resistencia intrínseca a fosfomicina**

Mutaciones en el gen *murA*

Las mutaciones en el gen *murA* confieren resistencia a fosfomicina debido a la sustitución en el sitio activo de la proteína MurA de una cisteína por aspartato en la posición 115, impidiendo la unión del fármaco a la diana enzimática, pero preservando su funcionalidad. Se han descrito en las especies bacterianas de *Chlamydia spp.*,<sup>191</sup> *Mycobacterium tuberculosis*<sup>192</sup> y *Vibrio fischeri*.<sup>193</sup>

Vías de reciclaje para la síntesis de peptidoglicano

Las vías de reciclaje para la síntesis de peptidoglicano que forma la pared celular de la bacteria es una vía adicional a la síntesis *de novo* que se ha descrito en *Pseudomonas putida* y *P. aeruginosa*.<sup>194,195</sup> Se trata de una vía metabólica alternativa a MurA para la síntesis de peptidoglicano mediada principalmente por tres enzimas, una fosfatasa MurNAc 6-fosfato (AnmK) aún no identificada, una aminokinasa de la pared celular anomérica (AgmK) y una uridililtransferasa (MurU) que transforman los ácidos N-acetilMurámicos (MurNAc) en UDP-MurNAc, utilizando el MurNAc α-1-fosfato (Figura 3).<sup>195</sup>



**Figura 3:** Esquema simplificado de la vía de reciclaje del peptidoglicano en *P. aeruginosa*.<sup>195</sup>

Otros mecanismos intrínsecos asociados a la resistencia a fosfomicina

Un interesante fenómeno es la necesidad de co-expresión de mecanismos de virulencia para que el antibiótico sea activo frente a la bacteria. Esto se ha descrito en *Listeria monocytogenes*, la cual es resistente a fosfomicina *in vitro* debido a que la bacteria no es capaz de absorber el antibiótico; pero, sin embargo, *in vivo* es sensible. Esto se debe a que *in vivo* se

## INTRODUCCIÓN

induce la expresión de un factor de virulencia en la bacteria denominado Hpt (hipoxantina fosforibosiltransferasa), un transportador en relación con el transportador de G6P, UhpT, provocando la entrada de fosfomicina y haciendo a la bacteria sensible al antibiótico.<sup>196</sup>

Por último, la disminución constitutiva de la permeabilidad de membrana celular es otro mecanismo descrito en la resistencia a este antibiótico. En estudios recientes se ha descrito el gen cromosómico *abrP* en *A. baumannii*, el cual disminuye la sensibilidad a fosfomicina, tetraciclina, tigeciclina y cloranfenicol, ejerciendo un detrimento general en la permeabilidad de esta bacteria.<sup>197</sup>

### **Resistencia adquirida a fosfomicina**

#### Disminución del transporte de fosfomicina

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a fosfomicina mediante mutaciones cromosómicas en los genes estructurales que codifican los transportadores de membrana de fosfomicina, *glpT* y *uhpT*, provocando un bloqueo de la entrada del antibiótico en la célula bacteriana. Como hemos explicado con anterioridad en el punto 4.3 sobre los mecanismos de acción de la fosfomicina, en la regulación de los genes codificantes de los transportadores de fosfomicina entra en juego un complejo sistema de proteínas muchas de las cuales se implican en diferentes procesos metabólicos.

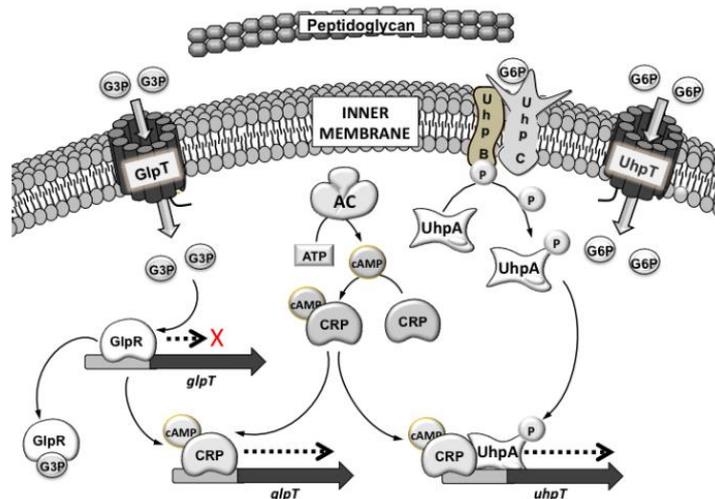
Ambos transportadores de membrana, a la vez que incorporan sus sustratos (G6P y G3P), expulsan un fosfato inorgánico fuera de la bacteria.<sup>145,198</sup> La expresión de ambos transportadores es inducida por sus propios sustratos y precisa además de la presencia del complejo AMPc-CRP. Existen estudios que demuestran que cepas con sensibilidad disminuida a fosfomicina no son capaces de crecer en medios con una sola fuente de carbono; es decir, las cepas que carecen de transportador GlpT no son capaces de crecer en presencia de G3P como única fuente de carbono, y las deficientes en UhpT, en medio con fuente de carbono G6P.<sup>199</sup> Además, se ha observado que mediante la adición de G6P al medio utilizado para testar la sensibilidad a fosfomicina se induce un incremento en la transcripción del transportador UhpT que da lugar a la sensibilización de las cepas deficientes en GlpT que en ausencia de este nutriente aparecen resistentes a fosfomicina.<sup>200</sup>

En el caso de *E. coli* ambas permeasas están presentes de manera natural participando en el transporte de fosfomicina al citoplasma celular; sin embargo, en otras especies, como *P. aeruginosa* únicamente está presente el transportador GlpT. Por lo tanto, en esta especie bacteriana, en caso de inactivarse el transportador GlpT, el microorganismo aumenta extraordinariamente su resistencia a fosfomicina.<sup>201</sup>

*Regulación del sistema de transporte UhpT*

UhpT es un monómero con doce hélices alfa en su dominio transmembrana que se encarga del transporte de hexosas fosfato como la G6P al interior celular mediante el intercambio por fosfato inorgánico.<sup>202</sup> Las cepas incapaces de crecer en medios con G6P como única fuente de carbono presentan mutaciones de pérdida de función en los genes que activan al transportador o en el propio transportador UhpT lo que conlleva a una resistencia a fosfomicina.<sup>203,204</sup>

En la regulación de la expresión de este transportador interviene un sistema de dos componentes (UhpB y UhpC) y una quinasa (UhpA). La inactivación de cualquiera de estos genes produce que el transportador no se exprese, dando lugar a la disminución de la entrada de fosfomicina al interior celular produciendo resistencia al antibiótico.<sup>203</sup> UhpC es una proteína transmembrana que funciona como un “sensor” de G6P en el medio. Al detectarse G6P por UhpC, ésta activa a la proteína histidina-quinasa UhpB, la cual forma parte del sistema transmembrana de dos componentes junto con UhpC. UhpB, una vez activada, fosforila a UhpA mediante un sistema His-a-Asp fosforil-transferasa. Una vez se encuentra fosforilada la proteína UhpA, está capacitada para unirse al promotor del gen *uhpT*, induciendo la transcripción de la proteína UhpT.<sup>146,205,206</sup> Además, niveles altos de AMPc inducen la transcripción de UhpT, a través de la unión con su proteína receptora, CRP formando el complejo CRP-AMPc (Figura 4).<sup>207,208</sup>



**Figura 4.** Representación esquemática del funcionamiento y la regulación del sistema de dos componentes para el transporte de fosfomicina (GlpT y UhpT).<sup>146</sup>

## INTRODUCCIÓN

### *Regulación del sistema GlpT*

Se ha descrito la estructura de GlpT en *E. coli* como una proteína que presenta dos dominios conectados por un bucle central en el que se encuentra una abertura para la entrada del sustrato y su posterior translocación al interior celular.<sup>209,210</sup> La zona transmembrana del transportador se forma por 12  $\alpha$ -hélices con una estructura muy conservada entre todas las permeasas de G3P. Existe un estudio que caracteriza el transporte de la fosfomicina a través de esta proteína mostrando como la fosfomicina compite por el sitio de unión de su sustrato natural, G3P, así como su posterior transporte al interior de la membrana bacteriana.<sup>211</sup> En cuanto a la regulación del transporte de G3P en las células procariotas y concretamente en *E. coli*, se conoce que se encuentra fuertemente regulado por mecanismos múltiples debido a la importancia de esta molécula en el metabolismo bacteriano.<sup>212</sup>

El gen *glpT* está situado dentro de uno de los cinco operones que forman parte del regulón *glpT* (*glpCBATQ*), encargado de controlar la proporción glicerol/G3P en el interior celular. La transcripción de *glpT* está inhibida por la proteína represora GlpR (codificado en el operón *glpEGR*). GlpR se une al ADN bacteriano, cerca del promotor de *glpT*, bloqueando su transcripción. Consecuencia de ello, las mutaciones en este gen van a producir un incremento en la transcripción de *glpT*,<sup>210,212</sup> y por ende, aumentarán la entrada de fosfomicina en la célula. Por el contrario, la expresión de este transportador se induce por su propio sustrato (G3P) además de por la presencia del complejo CRP-AMPC, como se ha comentado previamente. Sin embargo, aun en presencia de este sustrato, en condiciones de anaerobiosis se inhibe la expresión del transportador por la presencia de nitratos o glucosa, así como por la ausencia del gen *fnr*, el cual regula la expresión de varias enzimas respiratorias inducidas en anaerobiosis.<sup>213,214</sup> Otros inhibidores de la transcripción de este gen son los productos finales del metabolismo de la síntesis de lípidos y de la glucólisis, así como la presencia de fosfato inorgánico en el medio, que dificultaría el intercambio molecular.<sup>215,216</sup>

### *Regulación de los transportadores UhpT y GlpT mediante AMPc.*

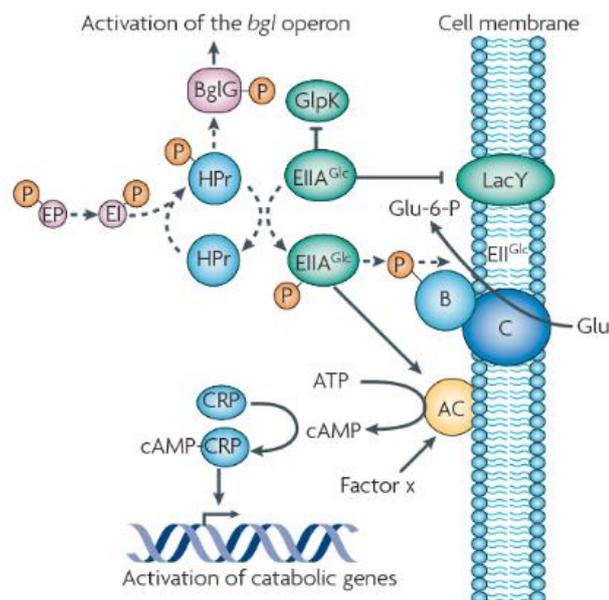
Como se describe anteriormente, el AMPc juega un papel importante en la regulación de ambos transportadores, UhpT y GlpT. Cambios en los niveles de AMPc en el interior celular se relacionan con variaciones de la sensibilidad al antibiótico fosfomicina. La enzima adenilato ciclasa (AC), codificada por el gen *cyaA*, es la encargada de producir AMPc a partir de moléculas de adenosín trifosfato (ATP) (Figura 4). Es por ello, que mutaciones en este gen se relacionan con disminuciones en los niveles del AMPc intracelular.<sup>217</sup> De manera general, los niveles de AMPc son controlados a través del sistema de represión catabólica del carbono (CCR). Este sistema de control permite a las bacterias la asimilación de fuentes de carbono

## INTRODUCCIÓN

rápidamente metabolizables cuando están expuestas a más de un carbohidrato.<sup>199,218</sup> Para ello, son muy importantes los sistemas de transporte de azúcares mediante los transportadores PEP: azúcar fosfotransferasa (PTS). Los azúcares como la glucosa son fosforilados durante su transporte a través de la membrana citoplásmica. Esto conduce a que la exposición a la glucosa provoque una disminución en los niveles de AMPc celular; explicando este fenómeno de represión catabólica.

Este sistema PTS se compone de varias subunidades, que se detallan a continuación. La primera subunidad es codificada por el gen *ptsI* produce la proteína EI. Esta subunidad está encargada de captar un grupo fosfato desde el PEP y fosforilar a la proteína HPr (proteína de histidina), que a su vez fosforila a la proteína EIIAGlc. Este grupo fosfato finalmente acaba en la molécula de glucosa que se encuentra siendo transportada.

EIIAGlc es la proteína principal encargada de regular la ruta CCR en *E. coli*. Cuando el dominio EIIA se encuentra fosforilado debido a la ausencia de glucosa en el exterior, se produce la activación de la transcripción del enzima AC promoviendo así la síntesis de AMPc (Figura 5).<sup>208</sup>



**Figura 5.** Representación del sistema metabólico de represión catabólica del carbono en *E. coli*.<sup>208</sup>

De forma general, el incremento en los niveles de AMPc en el interior de la bacteria van a producir la formación de complejos CRP-AMPc que consecuentemente van a aumentar la transcripción de los genes de los transportadores *glpT* y *uhpT* mediante la unión a sus promotores, incrementando el transporte de sus sustratos, así como la entrada de fosfomicina.<sup>146</sup> La presencia de mutaciones de pérdida de función de las proteínas CyaA o PtsI

## INTRODUCCIÓN

es escasa o nula en aislados clínicos debido al coste biológico que presenta la pérdida de estas proteínas en el desarrollo de la célula bacteriana.<sup>219</sup>

### Mutaciones en la diana *murA*

Se ha comprobado en mutantes de laboratorio de *E. coli* que la sustitución de la Cys115 por aspartato en el sitio activo de MurA da lugar a mutantes altamente resistentes a fosfomicina.<sup>220</sup> Otras mutaciones en esta proteína (Asp369Asn y Leu370Ile) se sugieren como posibles orígenes de una sensibilidad disminuida a fosfomicina, ya que pueden interferir en la unión del PEP a MurA al tratarse de residuos muy conservados, e influir también en la unión al antibiótico.<sup>199</sup> Además, se ha descrito que el incremento de la transcripción de *murA* en presencia de sustancias específicas que mejoran el crecimiento bacteriano produce resistencia a fosfomicina, teniendo un menor impacto en el *fitness* bacteriano en comparación con las cepas que presentaban mutaciones en los genes codificantes de los transportadores *glpT* y *uhpT*.<sup>221</sup> Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito ninguna de estas mutaciones en aislados clínicos de *E. coli*; pero sí de *S. aureus*, donde se han observado mutaciones en *murA* que producen resistencia a fosfomicina debido a la presencia de un codón de parada prematura.<sup>222</sup>

### Enzimas modificadoras del antibiótico

Por último, la resistencia a fosfomicina se puede producir mediante enzimas que modifican la estructura del fármaco inactivándolo de manera permanente. Los genes que transcriben para estas enzimas se encuentran presentes en el cromosoma de algunas especies, así como en transposones y plásmidos. Estos se describieron por primera vez en aislados de enterobacterias en China, dando lugar a una rápida diseminación posterior, pudiendo ir acompañados de mecanismos de resistencia a otros antibióticos en las mismas plataformas genéticas.<sup>175,176</sup>

Las enzimas modificadoras de fosfomicina se clasifican principalmente en dos grandes grupos: (1) metaloenzimas (FosA, FosB y FosX) y (2) enzimas tipo quinasa (FomA y FomB).

Las metaloenzimas actúan abriendo el anillo epóxido del antibiótico fosfomicina utilizando la ayuda de un cofactor metálico (ion manganeso, magnesio o potasio) con la adición posterior de moléculas diferentes como el glutatión, bacilitiol o agua.<sup>223</sup> Las metaloenzimas Fos presentan secuencias de aminoácidos muy similares entre ellas. Cambios mínimos en los residuos aminoacídicos, confieren a estas enzimas diferencias catalíticas y su clasificación en diferentes subclases.<sup>146</sup>

## INTRODUCCIÓN

### *FosA*

La primera enzima descrita del tipo Fos fue el enzima FosA en el año 1980 en España, presente en *S. marcescens* en un plásmido Tn2921. El gen *fosA* codifica para una glutatión-S-transferasa (GST) dependiente de manganeso cuya secuencia y características se describieron una década más tarde de su descubrimiento.<sup>224,225</sup> Estudios recientes han comprobado que secuencias homólogas a *fosA* se encuentran ampliamente distribuidas en el cromosoma de algunas bacterias Gram negativas (*Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *S. marcescens* y *P. aeruginosa*) favoreciendo la disminución de sensibilidad a este antibiótico y su dispersión.<sup>163</sup> FosA necesita  $Mn^{2+}$  como cofactor para realizar la inactivación de la fosfomicina mediante la adición de glutatión al anillo epóxido del antibiótico, además de  $K^+$ .<sup>226</sup> Tanto el  $Mn^{2+}$  como el  $K^+$  son esenciales para la función del enzima FosA.<sup>227,228</sup> Se han descrito diferentes subtipos del enzima FosA como son: FosA2, FosA3, FosA4, FosA5, FosA6 y FosC2.

- FosA2: Xu y colaboradores identificaron aislados de *Enterobacter cloacae* que presentaban el gen *fosA2* en muestras de agua dulce de Canadá. En este caso, la localización del gen era de tipo cromosómico.
- FosA3: En la última década, el subtipo FosA3 es el que se ha encontrado con mayor frecuencia en diferentes estudios y siempre asociado a la transmisión de tipo plasmídico. Recientemente, se ha confirmado que el origen de *fosA3* se encuentra en el cromosoma de *Kluyvera georgiana*.<sup>229</sup> Estudios realizados sobre muestras de animales de compañía y de producción alimentaria en China han detectado este gen en el 9% y 1,1% de los aislados de *E. coli*, respectivamente; así como diferentes tipos de *bla*CTX-M en los mismos plásmidos.<sup>230,231</sup> Este hecho sugiere una amplia distribución de este gen de resistencia, presente incluso en los animales domésticos y de consumo, los cuales pueden contribuir en su expansión. Además, ha sido detectado en multitud de estudios en aislados de muestras clínicas. Ejemplo de ello es un estudio multicéntrico realizado con muestras de 12 hospitales de China en el que encuentran que 94 de 278 aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC (33,8%) y 7 de 80 productores de BLEE (8,8%) contenían el gen *fosA3*. Además, en este estudio se demostró que los aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC y FosA3 estaban relacionados con clones concretos que pueden favorecer la diseminación de ambos mecanismos de resistencia al mismo tiempo.<sup>159</sup>
- FosA4: Este subtipo se ha descrito en aislados de *E. coli* en Japón. Comparte el 94% de la identidad con la secuencia de aminoácidos de FosA3 y para su

## INTRODUCCIÓN

detección se usó un sencillo método de cribado mediante difusión de dos discos basado en una combinación de fosfomicina y fosfonoformato sódico.<sup>232</sup>

- FosA5: Se ha encontrado en un plásmido de un aislado de *E. coli* productor de BLEE en China. Éste comparte el 69% y el 80% de las secuencias de aminoácidos con FosA y FosA3, respectivamente.<sup>233</sup>
- FosA6: Se describe recientemente en un aislado de *E. coli* productor de CTX-M-2 de origen urinario de un hospital de los Estados Unidos. Este gen se codifica en un plásmido tipo IncFII de 69 kb situándose entre las secuencias de inserción IS10R e IS26 confiriendo altos niveles de resistencia a fosfomicina. Además, los autores describen que este gen hallado en *E. coli*, comparte el 99% de identidad con el gen *FosAPMK1* cromosómicamente codificado en la especie *K. pneumoniae*. Estos datos indican que el gen puede movilizarse desde los cromosomas *K. pneumoniae* a los plásmidos de otras especies como *E. coli* mediante elementos móviles IS10.<sup>234</sup>
- FosC2: Se describe en un plásmido y comparte un 72% y un 56% de homología con las secuencias de aminoácidos de FosG y FosA, respectivamente. Se ha encontrado en integrones de clase 1 junto con diferentes genes de resistencia a otros antibióticos asociados.<sup>235,236</sup>

### *FosB*

Aunque la secuencia de aminoácidos de FosB comparte un 38% de homología con la de FosA, se diferencia de esta última en que es un enzima dependiente de  $Mg^{2+}$  y utiliza a la L-cisteína (L-Cys) como donante fisiológico del grupo –tiol. Cataliza la adición de L-Cys o bacilitiol (BSH) a la fosfomicina, dando como resultado un compuesto modificado sin propiedades bactericidas. La expresión del gen que codifica para FosB requiere del factor sigma extracitoplasmático (SigW), el cual se relaciona como factor de inducción de resistencia a otros antimicrobianos.<sup>237,238</sup> Actualmente este gen se ha descrito principalmente en bacterias Gram positivas, como en plásmidos de *Staphylococcus spp* y *Enterococcus spp* y en el cromosoma de *Bacillus subtilis*.<sup>237,239,240</sup>

### *FosX*

Se trata de un enzima con actividad hidrolasa que comparte una identidad con las secuencias de FosA y FosB de un 30% y un 35%, respectivamente.<sup>241</sup> Enzimas homólogas a FosX han sido identificados en el cromosoma de varios microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Mesorhizobium loti*, *Clostridium botulinum* y *Brucella melitensis*. Es

## INTRODUCCIÓN

dependiente de  $Mn^{2+}$  e inactiva a la fosfomicina mediante la adición de una molécula de agua en la posición C1 de la molécula de fosfomicina y abriendo su anillo epóxido, utilizando el ácido glutámico como catalizador de la reacción.<sup>241,242</sup>

Por último, se encuentran en las bacterias productoras de fosfomicina, tales como *Streptomyces wedmorensis* y *Streptomyces fradiae*, enzimas con actividad quinasa cuya acción protectora frente a la actividad bactericida de este antibiótico ha sido demostrada. Estas enzimas se codifican por los genes *fomA* y *fomB* y actúan inactivando a la fosfomicina mediante una fosforilación. FomA cataliza la fosforilación de la fosfomicina a fosfomicina-monofosfato y FomB convierte a la fosfomicina-monofosfato en fosfomicina-difosfato, siendo necesario en ambas reacciones tanto el ATP como el  $Mg^{2+}$ . Curiosamente, *fomA* muestra una homología del 25,8% con el gen *fosC* producido por *P. syringae*. FomC muestra una actividad similar al convertir la fosfomicina en fosfomicina-monofosfato.<sup>243,244</sup>

### 4.6. Estudios de sensibilidad. Técnicas y limitaciones

Para conocer la respuesta de un microorganismo frente a un antimicrobiano es necesario realizar estudios de sensibilidad, para lo que se pueden utilizar diferentes técnicas de antibiograma. El antibiograma define la actividad de uno o varios antimicrobianos frente a un microorganismo concreto, utilizando técnicas *in vitro*, y su resultado se utiliza como factor predictor de eficacia clínica. Durante la década de los 40, tras el descubrimiento de los primeros antibióticos, se produjo un gran desarrollo en las diferentes técnicas para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Fruto de ello, surge la necesidad de estandarizar estas novedosas técnicas, y en 1961 se publica la metodología oficial de la OMS sobre los estudios de sensibilidad.<sup>245</sup> En la actualidad, el *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) son los organismos que se encargan de aportar las recomendaciones más aceptadas por la comunidad científica. Establecen diferentes técnicas normalizadas del antibiograma para obtener resultados fiables y reproducibles; las cuales se han adaptado a lo largo del tiempo para poder realizarlas de una forma más sencilla y rápida para el laboratorio de microbiología mediante técnicas comerciales, automatizadas o semiautomatizadas, intentando proporcionar resultados equivalentes a los métodos de referencia.

## INTRODUCCIÓN

A continuación, se desarrollan las técnicas de uso más frecuente en los laboratorios de microbiología para estudio del antibiograma.

### Método de disco-difusión

Esta técnica para estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos se basa en un trabajo publicado en el año 1966,<sup>246</sup> cuya metodología es la base del estándar de la difusión con disco empleada por los comités CLSI y EUCAST. Esta técnica consiste en depositar un disco de papel de filtro impregnado con una concentración de antibiótico conocida sobre una superficie de agar previamente inoculada con un microorganismo a una concentración determinada. Al contactar el antibiótico presente en el disco con la superficie de agar, éste difunde a través del medio radialmente formando un gradiente de concentración decreciente. La lectura de los resultados se realiza a las 18+/-2 horas de incubación y consisten en la medición del diámetro del halo que inhibe el crecimiento bacteriano alrededor del disco, expresándose en milímetros. El número de milímetros se traduce posteriormente en una categoría clínica determinada (sensible, intermedio o resistente) que predice la respuesta *in vivo* al antibiótico.

Este método cuenta con numerosas ventajas, ya que se trata de una técnica barata, rápida, fácil de realizar y reproducible; aunque presenta también limitaciones como el tiempo de incubación o el hecho de no aportar valores de CMI.

El material y el método necesarios para su realización, así como la lectura y la interpretación de los resultados se encuentran perfectamente estandarizados actualmente por los organismos oficiales CLSI y EUCAST, los cuales realizan actualizaciones y revisiones periódicas adaptándolas a los hallazgos de los últimos estudios (Figura 6).<sup>247-249</sup>

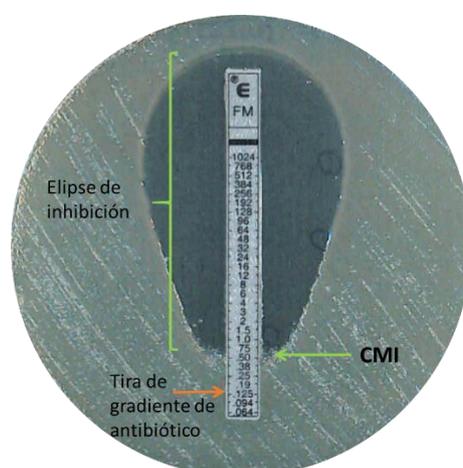


**Figura 6.** Antibiograma por disco-difusión y lectura del diámetro de halo de inhibición.<sup>249</sup>

### Método de difusión de tiras de gradiente

Este método es más reciente que la técnica de disco-difusión, ya que se describió por primera vez a finales de los años 80 y no se introdujo en el mercado hasta el año 1991 tras ser aprobado por la FDA.<sup>250,251</sup>

De nuevo esta técnica está basada en la difusión del antibiótico por la superficie de agar, pero en este caso en lugar de obtener los milímetros del halo de inhibición como resultado, se obtienen de forma directa los valores de CMI al antimicrobiano. En concreto, se trata de una tira de un material inerte impregnada en el antimicrobiano siguiendo un gradiente de concentración. La metodología es la misma que para el antibiograma de disco-difusión, ya que al contactar la tira de gradiente con la superficie del agar se produce la difusión inmediata del antibiótico por la superficie, produciendo un gradiente exponencial de concentraciones. Se incuba y la lectura se realiza al igual que en la técnica de difusión con disco, tras 18+/-2 horas. En este caso se observa una zona de inhibición con forma de elipse alrededor de la tira de gradiente, la cual intersecciona en su extremo inferior con la tira de gradiente en un punto, el cual determina el valor de la CMI. La CMI se expresa en valores de concentración del antimicrobiano, utilizándose de forma habitual las unidades de  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o  $\text{mg}/\text{L}$ . (Figura 7).



**Figura 7.** Antibiograma realizado por difusión con tira de gradiente.

Mediante esta técnica encontramos las mismas ventajas que con la técnica anterior, pero con la ventaja añadida de que además se considera una alternativa para el estudio

## INTRODUCCIÓN

cuantitativo de sensibilidad a los antimicrobianos, presentando buena correlación con los métodos de referencia.

### **Microdilución en caldo**

Se trata de un método con una mayor complejidad para su elaboración en comparación con las técnicas de difusión con disco o tiras de gradiente; sin embargo, actualmente se trata del método de referencia de la mayoría de antimicrobianos para determinar los valores de CMI.

La metodología se encuentra estandarizada con las recomendaciones basadas en la norma de la organización internacional ISO para que exista un control y normalización que permitan la reproducibilidad adecuada intra- e interlaboratorios, con su última actualización publicada en 2019.<sup>252</sup> En esta técnica, se prueba la capacidad de los microorganismos de crecer de forma visible en los pocillos de placas de microdilución. Estos pocillos contienen caldo de cultivo con diferentes concentraciones del antimicrobiano en forma de diluciones seriadas en las que se inocula una concentración de bacterias determinada ( $1-5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia por mililitro [UFC/mL]) y se incuba durante  $18 \pm 2$  horas. El resultado se expresa en un valor de CMI que corresponde a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que, en condiciones *in vitro* definidas, impide la aparición de crecimiento visible de un microorganismo antes de transcurrido un periodo de tiempo definido. La interpretación de los resultados, la cual puede resultar compleja en algunas ocasiones, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos de control positivo, los cuales deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 milímetros de diámetro. Se utiliza además un pocillo de control negativo para descartar posibles contaminaciones.

Existen adaptaciones comerciales de este método que intentan replicar la técnica pudiéndose realizar de forma automatizada o semiautomatizada permitiendo agilizar y simplificar la técnica. Éstos tienen que ser validados con respecto al método de referencia, aunque realmente no se rigen estrictamente por la metodología de la normativa ISO.

### **Dilución en agar**

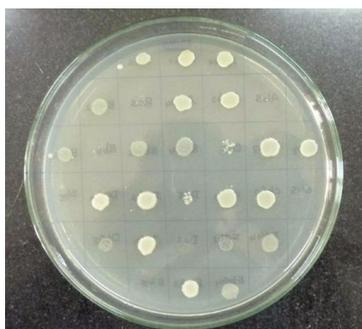
Esta técnica consiste en la incorporación del antimicrobiano en el mismo medio de cultivo con agar, produciendo un gradiente de concentraciones del antimicrobiano en diferentes placas de agar sobre las que se inoculará la bacteria. Suelen utilizarse concentraciones crecientes en base 2 del antibiótico.

## INTRODUCCIÓN

Siguiendo la normativa estandarizada para este método se necesita la preparación de un inóculo bacteriano concreto de  $10^4$  UFC/punto de inoculación sobre la superficie del agar. Se pueden realizar inóculos de múltiples microorganismos de forma simultánea sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Steers. Este dispositivo posee una serie de puntas que se sumergen en los pocillos que contienen el inóculo bacteriano y depositan un volumen concreto en el agar con antibiótico diluido. Los replicadores con puntas dispensadoras de 3 milímetros de diámetro van a depositar en la superficie del agar aproximadamente  $2 \mu\text{L}$  (rango:  $1-3 \mu\text{L}$ ), y los de 1 milímetro de diámetro depositan de  $0,1$  a  $0,2 \mu\text{L}$ . Estos volúmenes son importantes tenerlos en cuenta a la hora de realizar los cálculos para el inóculo final establecido según la normativa de referencia de  $10^4$  UFC/punto de inoculación.

Tras la inoculación en agar, se procede al secado en temperatura ambiente y posterior incubación durante 16-20 horas. La composición de los medios de cultivo utilizados, la adición de nutrientes o suplementos, así como la composición de la atmósfera de incubación van a diferir según los requerimientos de cada microorganismo y/o antimicrobiano.

La lectura e interpretación de esta técnica se realiza mediante visualización directa de los puntos inoculados en la superficie de las placas estableciendo el valor de la CMI en la concentración antimicrobiana más baja que inhibe el crecimiento bacteriano, descartándose aquellas concentraciones en las que aparece el crecimiento de una UFC aislada o un halo tenue (Figura 8).<sup>253</sup>



**Figura 8.** Placa de agar en la que se ha utilizado el método de dilución en agar para estudio de sensibilidad a un antimicrobiano.<sup>254</sup>

Esta técnica sigue siendo actualmente el único de método de referencia para determinar los valores de CMI a fosfomicina, con el requerimiento especial de suplementar el

## INTRODUCCIÓN

medio de cultivo con G6P a una concentración de 25 µg/mL.<sup>247,255</sup> Si bien, hay estudios que demuestran que para determinar la CMI a fosfomicina en *P. aeruginosa*, el añadir o no G6P al medio no interfiere en los resultados, ya que como se ha comentado en apartados previos, carece del transportador para estos azúcares, la proteína de membrana UhpT.<sup>256</sup>

Las limitaciones de esta técnica son claramente la laboriosidad que requiere para su preparación, así como la compleja interpretación posterior de los resultados, de ahí la dificultad para llevarse a cabo en la práctica diaria del laboratorio clínico de microbiología.

### 4.7. Puntos de corte de sensibilidad/resistencia

Los puntos de corte son utilizados para definir la sensibilidad o la resistencia de los microorganismos a los antibióticos y separar, en base a los métodos de estudio de sensibilidad utilizados, las bacterias en dos tipos de poblaciones, aquellas resistentes en las que el antimicrobiano tendrá una baja probabilidad de éxito terapéutico y aquellas sensibles donde el antimicrobiano presentará una elevada probabilidad de éxito terapéutico. En base al método de antibiograma utilizado, los puntos de corte se expresan según cada una de las diferentes unidades de medida para cada técnica, ya sea en unidades de concentración (µg/mL o mg/L) o unidades de longitud del diámetro del halo de inhibición (milímetros). Estos puntos de corte van a requerir de criterios de interpretación posteriores para poder extrapolar los resultados a las diferentes categorías clínicas (sensible, intermedio, sensible con exposición aumentada al antimicrobiano o resistente). Por lo tanto, la predicción de la sensibilidad o la resistencia de un microorganismo a un antimicrobiano es el objetivo principal de los puntos de corte.<sup>257</sup>

Sin embargo, es importante distinguir las diferentes definiciones de los conceptos de población resistente o sensible a un antimicrobiano; ya que, aunque los términos parecen claros, su significado difiere según el contexto. En este sentido, hay que diferenciar cuando estos conceptos se aplican a la respuesta de la interacción directa entre el agente antibacteriano y el microorganismo, o cuando se utiliza según la probabilidad de éxito o fracaso terapéutico en un paciente. El segundo concepto implica una mayor complejidad del término, ya que tiene en cuenta otros múltiples factores (farmacocinéticos, farmacodinámicos, inmunitarios, etc.) en comparación con el primero, el cual solo implica la respuesta exclusiva del microorganismo al antimicrobiano en condiciones *in vitro*.<sup>257</sup>

### **Puntos de corte epidemiológicos (*Epidemiologic Cut-Off*: ECOFF)**

Los puntos de corte epidemiológicos permiten detectar y vigilar el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, ya que los puntos de corte clínico, no siempre tienen la capacidad para discernir entre bacterias que no presentan mecanismos de resistencia adquiridos (*wild-type* o silvestre) de las que sí.<sup>258</sup> Éstos se establecieron por EUCAST a principios de los años 2000 con el acrónimo ECOFF (*Epidemiologic Cut-Off*).<sup>259</sup>

Los ECOFF se determinan para la combinación de un agente con una especie bacteriana concreta teniendo en cuenta la distribución de los valores de CMI frente al antimicrobiano de aquellas poblaciones bacterianas salvajes, sin mecanismos de resistencia adquiridos. En definitiva, el ECOFF va a corresponder al valor de CMI más elevado para aquellos aislados de una misma especie fenotípicamente carentes de mecanismos de resistencia frente a un agente antimicrobiano concreto. Este punto de corte epidemiológico va a dividir a la población bacteriana en dos categorías distintas en las que se diferencia la población bacteriana silvestre de la que no lo es.<sup>259</sup> Un microorganismo se define como silvestre cuando no presenta mecanismos de resistencia adquiridos a un agente en cuestión, y no silvestre o resistente epidemiológicamente cuando presenta mecanismos de resistencia adquiridos; sin embargo, la respuesta clínica al tratamiento antimicrobiano es independiente de la categoría según el punto de corte epidemiológico.<sup>260</sup>

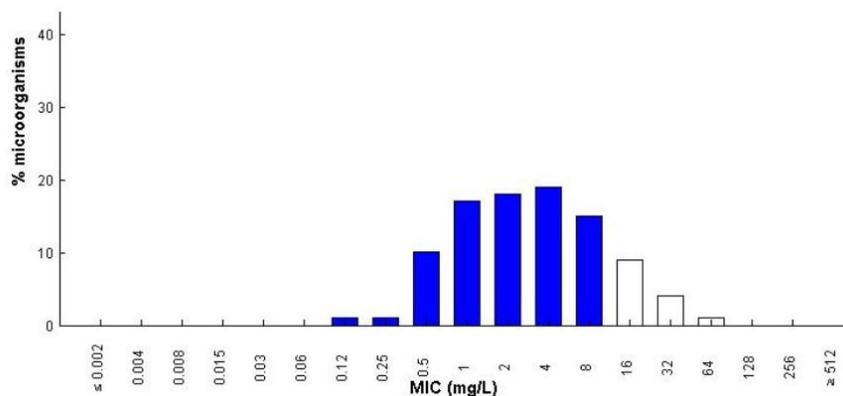
La importancia de los ECOFF radica en la capacidad para detectar la presencia de genes de resistencia cuando los microorganismos presentan valores de CMI inferiores al punto de corte clínico. Realmente se trata de un indicador del desarrollo de resistencia gradual que, aunque en un principio no posea relevancia clínica en sí, puede que con el tiempo se llegue a producir un cambio clínico significativo. Además, van a permitir comparar las tasas de resistencia adquiridas de una especie bacteriana en situaciones en las que se hayan utilizado puntos de corte clínicos diferentes, ya que éstos pueden diferir en algunos casos entre las diferentes organizaciones (por ejemplo, CLSI y EUCAST); pero también cuando los puntos de corte clínico han sido modificados o ni siquiera se han establecido. El estudio de los ECOFF es una pieza clave a nivel de vigilancia internacional de la resistencia bacteriana. Su relevancia en salud pública, así como la necesidad de establecer una definición y metodología internacionales para su determinación, han sido reconocidas por la OMS y la OIE.<sup>259</sup>

Para poder establecer los ECOFF es necesario valorar la CMI determinada mediante microdilución en caldo o un método equivalente según la normativa ISO de un gran número de aislados, los cuales se obtienen de diferentes estudios llevados a cabo por los propios comités

## INTRODUCCIÓN

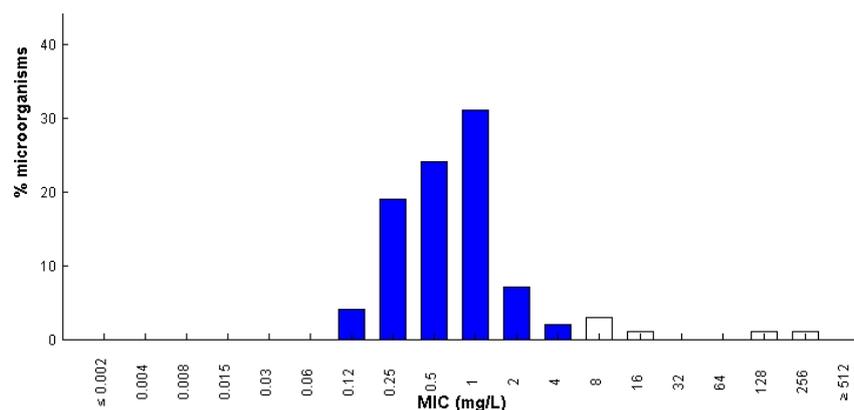
de puntos de corte, programas de vigilancia de resistencia a antimicrobianos o de investigadores individuales. Posteriormente, los aislados se agrupan según los valores de CMI obteniéndose una curva de distribución. El ECOFF será el valor de CMI en el que se distribuye el 99% de la población bacteriana salvaje. Desde un punto de vista microbiológico se consideran población resistente (no salvaje) a aquellos microorganismos con CMI superiores a este punto de corte, aunque se consideren como sensibles según el punto de corte clínico.<sup>259</sup> Esto se debe a que algunos mecanismos de resistencia no son capaces de incrementar los valores CMI a niveles relacionados con el fracaso terapéutico.

Al igual que sucede con los puntos de corte clínico, éstos requieren de revisiones periódicas para considerar las modificaciones pertinentes adaptadas a los últimos hallazgos científicos. Recientemente se han modificado varios ECOFF a varios antimicrobianos entre ellos, el ECOFF de fosfomicina para *E.coli*.<sup>261</sup> Tras haber realizado un proceso de depuración en el que se han conservado solo aquellos valores de CMI obtenidos mediante el método de referencia de dilución en agar, el número de aislados se ha reducido de un total de 5117 aislados a solo 1772 aislados, con un cambio del ECOFF previamente establecido en 8 mg/L (Figura 9) a 4 mg/L (Figura 10). Esta modificación se publicó en abril de 2020.



**Figura 9.** Distribuciones de CMI a fosfomicina en 5117 aislados *E. coli* previa a revisión de la base de datos en abril de 2020. ECOFF: 8 mg/L; microorganismos salvajes ≤8 mg/L.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 10.** Distribuciones de CMI a fosfomicina en 1772 aislados *E. coli* posterior a la revisión de la base de datos en abril de 2020. Se incluyen exclusivamente aquellos valores de CMI determinados mediante dilución en agar. ECOFF: 4 mg/L; microorganismos salvajes  $\leq 4$  mg/L.<sup>261</sup>

Actualmente solo existen valores establecidos de ECOFF a fosfomicina para las especies bacterianas de *E. coli*, *P. mirabilis* y *S. aureus*. La distribución de las CMI a fosfomicina en el resto de microorganismos no ha permitido establecer un punto de corte que separe a la población salvaje de la población que presenta mecanismos de resistencia adquiridos.

### Puntos de corte clínicos

Los puntos de corte clínicos intentan distinguir la probabilidad que existe de éxito o fracaso terapéutico en un paciente con una infección bacteriana concreta. Se basan en calcular la concentración de un antibiótico capaz de predecir la eficacia terapéutica a dosis estándar en el tratamiento de una infección causada por un microorganismo.<sup>257,262</sup> Como se ha comentado en el apartado previo, en esta categorización clínica, no se tiene en cuenta la presencia de mecanismos de resistencia de bajo nivel.

Las categorías que se establecen con estos puntos de corte se definen según combinaciones microorganismo-agente. Al igual que los puntos epidemiológicos se someten a revisiones y actualizaciones periódicas en las que influyen los nuevos hallazgos en farmacocinética, farmacodinamia y los estudios sobre correlación clínica.

Hasta finales del año 2018, EUCAST establecía las siguientes categorías en base a los puntos de corte clínicos, definiendo como:<sup>260</sup>

## INTRODUCCIÓN

Sensible (S): un microorganismo se define como sensible a un antimicrobiano cuando el nivel de actividad de dicho agente a una concentración determinada se asocia con una alta probabilidad de éxito terapéutico.

Intermedio (I): un microorganismo se define como intermedio a un antimicrobiano cuando el nivel de actividad de dicho agente a una concentración determinada se asocia con un efecto terapéutico incierto. Esta categoría implica que:

1. Las infecciones producidas por patógenos con sensibilidad intermedia pueden ser tratadas con éxito terapéutico en compartimentos del cuerpo humano en los que se produzca una mayor concentración fisiológica del antimicrobiano.
2. Las infecciones producidas por patógenos con sensibilidad intermedia pueden ser tratadas con éxito terapéutico debido a que el fármaco permita un incremento de la dosis.
3. Esta categoría se utiliza también como una “zona *buffer* o reguladora” con motivo de impedir pequeños, pero difícilmente controlables errores metodológicos, a fin de evitar discrepancias importantes en las interpretaciones clínicas.

Resistente (R): un microorganismo se define como resistente a un antimicrobiano cuando el nivel de actividad de dicho agente a una concentración determinada se asocia con una alta probabilidad de fracaso terapéutico.

Sin embargo, a principios del 2019, EUCAST cambia estas definiciones, aunque persisten las mismas abreviaturas, con motivo de reflejar la importancia de la dosificación y la exposición al antibiótico en el foco de infección.<sup>263</sup> Estas categorías se establecen en base al grado de exposición del microorganismo al antimicrobiano en el lugar de infección, lo cual va a depender de diversos factores como: el modo de administración, la dosis, el intervalo de dosificación, el tiempo de infusión; así como de la distribución, el metabolismo y la excreción del fármaco. Estas categorías se definen como:

Sensible a dosis estándar (S): un microorganismo se clasifica en esta categoría cuando existe una alta probabilidad de éxito terapéutico usando un régimen de dosificación estándar del agente antimicrobiano.

Sensible bajo exposición aumentada al antimicrobiano (I): un microorganismo se clasifica en esta categoría cuando existe alta probabilidad de éxito terapéutico debido a un aumento de la exposición al agente antimicrobiano debido a ajustes en

## INTRODUCCIÓN

la dosificación o a la concentración del agente en el foco de infección por motivos fisiológicos.

Resistente (R): un microorganismo se clasifica como resistente cuando existe una alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso en situación de exposición aumentada al antimicrobiano.

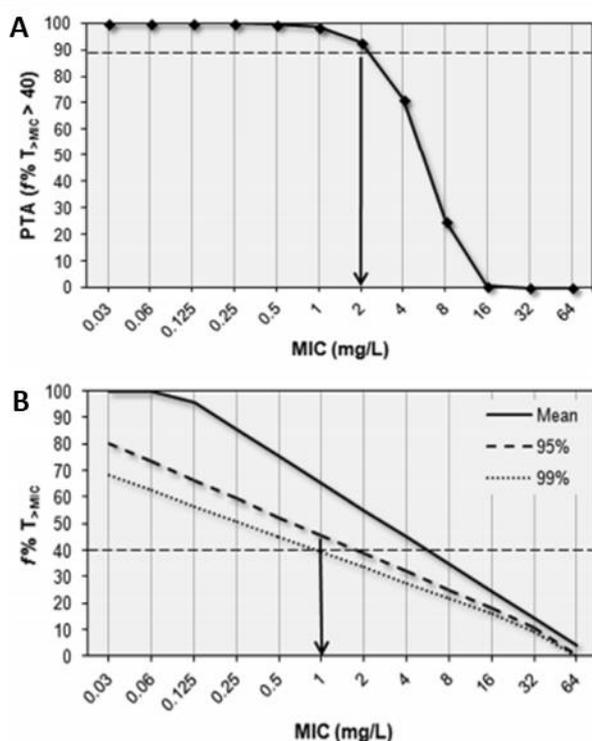
### **Puntos de corte farmacocinéticos/farmacodinámicos (FC/FD)**

Es importante tener en cuenta que la eficacia de un agente antimicrobiano depende de la relación entre la CMI para el microorganismo y la exposición del microorganismo al agente en el paciente. El resultado clínico depende de la relación triangular entre la CMI, la exposición y la eficacia. A su vez, la exposición del microorganismo al agente en el paciente depende de la dosis y de las propiedades farmacocinéticas del fármaco.

La relación cuantitativa entre un parámetro farmacocinético y un parámetro microbiológico, como es el valor de la CMI, se conoce como el índice FC/FD. Los tres principales índices FC/FD asociados con el efecto de los antibióticos son: el porcentaje del intervalo de dosificación en el que la concentración del fármaco permanece por encima de la CMI (%T>CMI); la concentración máxima dividida por la CMI ( $C_{m\acute{a}x}/CMI$ ) y el área bajo la curva de tiempo-concentración en un período de 24 horas dividida por la CMI ( $AUC_{24}/CMI$ ).

Los puntos de corte FC/FD dependen del régimen de dosificación del fármaco y, por lo tanto, se pueden obtener diferentes puntos de corte para un mismo fármaco. Se utilizan dos métodos diferentes para estimar estos puntos de corte. En primer lugar, puede estimarse como el valor más elevado de CMI para el que existe una probabilidad superior al 90% de alcanzar el objetivo terapéutico (PTA, *probability of target attainment* [PTA > 90%]) (Figura 11.A) y el segundo método es mediante la representación gráfica del índice FC/FD en función de la CMI (Figura 11.B).<sup>264</sup>

## INTRODUCCIÓN



**Figura 11.** Parámetros FC/FD para estimación de los puntos de corte de resistencia de los antimicrobianos. **A)** Probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico superior al 90% (PTA/probability of target attainment >90%): valor más alto de CMI para el que existe una probabilidad superior al 90% de alcanzar el objetivo terapéutico. **B)** Variación del índice FC/FD en función de la CMI.<sup>264</sup>

En el primer caso, para poder calcular el valor de PTA se realiza mediante simulaciones de Montecarlo. Este método tiene en cuenta la variabilidad de los parámetros FC y FD de forma individual, donde cada grupo de parámetros se describe como una distribución de valores para los cuales se asocia una probabilidad de inhibir al microorganismo implicado. De forma estocástica se puede estimar la proporción de una población determinada de personas en la que se podrá alcanzar el objetivo farmacodinámico requerido para una CMI determinada.

Existen numerosos estudios que analizan la correlación existente entre los puntos de corte FC/FD y los puntos de corte clínicos de los comités internacionales CLSI y EUCAST, encontrándose discrepancias en algunos casos. Las consecuencias de estas discrepancias tienen un efecto directo en la clínica, ya que, si los puntos de corte FC/FD son superiores a los puntos de corte clínico, puede provocar la sobredosificación y el consecuente incremento en la probabilidad de producir toxicidad en el paciente, o incluso puede inducir a desestimar el fármaco como opción terapéutica cuando realmente sería efectivo. Por otro lado, cuando los puntos de corte FC/FD son inferiores a los clínicos, se estará considerando al microorganismo

## INTRODUCCIÓN

como sensible al antimicrobiano cuando según los parámetros de FC/FD, éste no va a ser efectivo. Por lo tanto, existe una necesidad de aplicar los parámetros FC/FD en el estudio de los puntos de corte clínico.<sup>265,266</sup>

En el caso de la fosfomicina, el índice FC/FD que se relaciona con el PTA>90% en enterobacterias son: el %T>CMI superior al 70% y el AUC<sub>24</sub>/CMI superior a 23. Estudios que han realizado análisis FC/FD junto con simulaciones de Montecarlo, como el trabajo de Rodríguez-Gascón y colaboradores, intentan predecir el éxito terapéutico de este antibiótico y su relación con los puntos de corte actuales. En este trabajo estudian diferentes dosificaciones de fosfomicina en una población de pacientes críticos con función renal conservada, frente a enterobacterias y *P. aeruginosa*, utilizando como objetivo farmacodinámico el %T>CMI superior al 70% para todas las especies bacterianas, y AUC<sub>24</sub>/CMI superior a 24 y 15 para producir un efecto bacteriostático en enterobacterias y *P. aeruginosa*, respectivamente. En este estudio observaron que en el tratamiento de enterobacterias con dosis inferiores a 4g/8h (en infusión de 30 min) se alcanzaba un PTA >90% a una CMI ≤ 32 mg/L (punto de corte de EUCAST); sin embargo, con una CMI de 64 mg/L (punto de corte de CLSI) se lograba este PTA utilizando dosis de fosfomicina más elevadas de 6g/6h o 8g/8h (en infusión de 30 min). Ninguna de estas dosis logró alcanzar una PAT>90% para ninguno de los objetivos FC/FD marcados en el tratamiento de *P. aeruginosa* con una CMI de 256-512 mg/L.<sup>267</sup> En otro trabajo de Merino-Bohórquez analizaron los regímenes óptimos de dosificación en base a los objetivos FC/FD y se evaluó la idoneidad de los puntos de corte de sensibilidad a *E. coli* según CLSI y EUCAST. Se evaluó el PTA en un rango de CMI entre 0,125 mg/L y 1024 mg/L para alcanzar los índices farmacodinámicos en *E. coli* de AUC<sub>24</sub>/CMI de 19,3 (efecto bacteriostático), fAUC<sub>24</sub>/CMI de 87,5 (disminución de la carga bacteriana de 1 log) y fAUC<sub>24</sub>/CMI de 3136 (supresión de resistencia). Se alcanzó un PTA>90% para un efecto bacteriostático a dosis de 4g/6h y 8g/8h para una CMI de 128 mg/L; sin embargo, cuando se evaluó como objetivo la disminución de 1 log de la carga bacteriana, observaron que frente a una CMI de 32 mg/L el PTA disminuía a 89,3% y 96,1% a dosis de 4g/6h y 8g/8h, respectivamente, aunque para el punto de corte de CLSI (64 mg/L), el PTA disminuía hasta un 33% y un 54% para sendas dosis. Para conseguir la supresión de las subpoblaciones resistentes, el PTA de 83,2% y 93,4% a dosis de 4g/6h y 8g/8h, respectivamente, se alcanzó con valores de CMI ≤ 1mg/L, valor que se encuentra muy por debajo de los puntos de corte tanto de CLSI como EUCAST.<sup>266</sup>

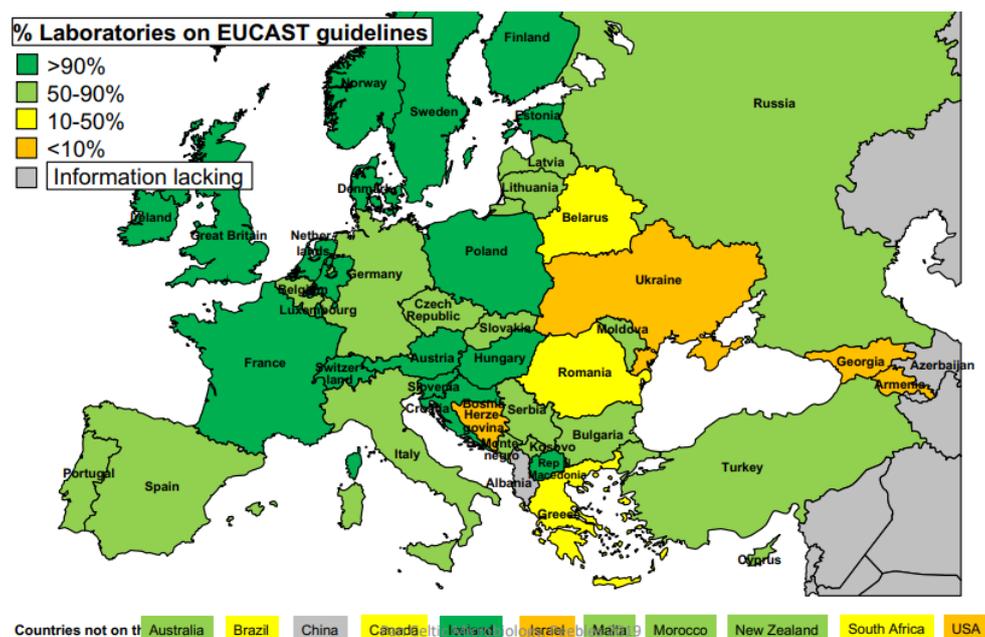
### Comités internacionales: EUCAST y CLSI

## INTRODUCCIÓN

Existen diferentes organizaciones y comités encargados de establecer los puntos de corte clínico a los antimicrobianos, así como de la estandarización de técnicas y metodología para el estudio de sensibilidad. Existen muchos otros organismos a nivel nacional como por ejemplo el Comité Español del Antibiograma (COESANT) en España, *Société Française Microbiologie* (SFM) en Francia o *Deutsches Institut für Normung* (DIN) en Alemania. Sin embargo, éstos han quedado en un segundo plano, ya que, en los últimos años, la mayoría de los países se han decantado por adoptar las normas de los dos principales comités, EUCAST y CLSI, siendo actualmente los más relevantes a nivel mundial. Este hecho ha logrado una metodología e interpretación de los resultados más homogénea y uniforme entre los diferentes laboratorios, favoreciendo la vigilancia, comunicación y análisis de datos de resistencias a nivel global.

### EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

En Europa durante muchos años no existía un comité que unificara la normativa acerca de puntos de corte de sensibilidad y metodología de estudio del antibiograma a nivel continental, por lo que los diferentes países seguían la normativa de los propios comités nacionales, y aquellos que no tenían organizaciones propias, seguían los puntos de corte de CLSI. Esta falta de consenso entre las normas de los diferentes comités daba lugar a confusión e imposibilitaba la comparación de los resultados entre los diferentes países de la comunidad europea. Sin embargo, en el año 1997, con el principal objetivo de lograr la armonización de los puntos de corte clínicos en todos los países europeos, la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) junto a varias agencias nacionales de Europa y ECDC se unieron para formar EUCAST.<sup>268</sup> A principios de los años 2000, EUCAST sufrió una reorganización para dar un mayor protagonismo a los comités nacionales y establecer relaciones más directas con motivo de consensuar y estandarizar criterios. Se formó un comité general con representantes de todos los países europeos, así como de la industria farmacéutica y de fabricantes de sistemas para estudio de sensibilidad. Finalmente, de forma progresiva, entre los años 2002 y 2010, los diferentes países fueron adoptando los puntos de corte de EUCAST, consiguiendo su completa distribución en todos los países del continente en el año 2010.<sup>269</sup> A partir de entonces, el número de laboratorios clínicos que han adoptado la normativa EUCAST ha ido en aumento. En la actualidad, no solo se emplean las guías de EUCAST en un gran número de laboratorios de países europeos, sino que incluso se ha extendido a otros continentes en países como Australia, Nueva Zelanda y Marruecos, entre otros (Figura 12).<sup>270</sup>



**Figura 12.** Mapa con representación del porcentaje de laboratorios que se rigen bajo la normativa de EUCAST. Mayo de 2019.<sup>270</sup>

EUCAST se compone actualmente por una red de expertos encargados de establecer los puntos de corte y la normativa metodológica para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos, promoviendo la educación y capacitación de expertos en este campo. Analiza y revisa los puntos de corte clínico y los ECOFF para vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en estrecha colaboración con la EMA y el ECDC. Adicionalmente, asesora al ECDC y a otros organismos sanitarios de la Unión Europea sobre cuestiones relacionadas con el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y detección de determinantes de resistencia con relevancia para la salud pública. En definitiva, esta organización trabaja para lograr un consenso a nivel internacional en los puntos de corte clínicos de los antimicrobianos y en las técnicas de estudio de sensibilidad.<sup>271</sup>

Esta organización pone toda su información, la cual se encuentra en continua revisión y actualización de sus datos, de manera gratuita a través de su página web ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

### CLSI (Clinical and Laboratory of Standards Institute)

CLSI es una organización sin ánimo de lucro que reúne a la comunidad mundial de laboratorios por la causa común de fomentar la excelencia en el laboratorio clínico mediante el desarrollo de normas para las pruebas clínicas de laboratorio. Para ello se basa en distintas aportaciones consensuadas entre la industria, el gobierno y los profesionales de la salud. A

## INTRODUCCIÓN

finales de la década de los 60, varios médicos y científicos representantes de diferentes organizaciones desarrollaron un documento consenso formal para la normalización de las intervenciones clínicas y fundaron NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Esta organización pudo documentar y avanzar en diversos procedimientos novedosos en el campo del laboratorio clínico publicando en 1986 su primera edición de M100-*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. En 2005, NCCLS cambió su nombre por el de CLSI. A diferencia de EUCAST, el acceso a sus protocolos no es totalmente gratuito, y algunos se pueden obtener a través de su página web ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)).

### Puntos de corte para fosfomicina de EUCAST y CLSI

Según CLSI y EUCAST, la dilución en agar suplementada con G6P a una concentración de 25 mg/L es el método de referencia para estudio de sensibilidad a fosfomicina y ambos recomiendan la adición de 50 µg de G6P en el estudio de sensibilidad con disco-difusión de 200 µg de fosfomicina. Sin embargo, difieren en la aplicación e interpretación de los puntos de corte de sensibilidad para este antimicrobiano frente a Enterobacterales. EUCAST establece que el estudio de sensibilidad a fosfomicina por el método de disco difusión y/o técnicas que aporten valores de CMI es aplicable a la especie bacteriana de *E. coli*, mientras que al resto de Enterobacterales solo podrán aplicarse los puntos de corte según CMI. Sin embargo, los puntos de corte de sensibilidad a fosfomicina, tanto obtenidos por disco-difusión como por CMI, según los criterios de CLSI, se aplican exclusivamente a *E. coli* de origen urinario.

Respecto a las discrepancias en los puntos de corte de sensibilidad clínica para Enterobacterales, EUCAST establece como sensible aquellos valores de CMI  $\leq 8$  mg/L y como resistente si  $> 8$  mg/L para el uso oral de fosfomicina en el tratamiento de la infección urinario no complicada causada por *E. coli*; sin embargo, establece como sensible aquellos valores de CMI  $\leq 32$  mg/L y como resistente si es  $> 32$  mg/L para el uso intravenoso de fosfomicina. Por otro lado, CLSI utiliza las categorías de sensible si la CMI es  $\leq 64$  mg/L, de intermedio si es de 128 mg/L y resistente cuando es  $\geq 256$  mg/L. Del mismo modo, los puntos de corte para las técnicas de disco-difusión difieren entre los comités. Según CLSI, se consideran sensibles aquellos halos de inhibición  $\geq 16$  mm, intermedios si se encuentra entre 13-15 mm y resistentes cuando son  $\leq 12$ . Para EUCAST se consideran sensibles aquellos aislados con un halo de inhibición  $\geq 24$  mm. EUCAST diferencia entre los puntos de corte aplicados para la formulación de fosfomicina intravenosa de los aplicados a fosfomicina oral para el tratamiento exclusivo en infecciones de orina no complicada.<sup>247,255</sup>

## INTRODUCCIÓN

Desde el año 2017, EUCAST publica en sus protocolos sobre los puntos de corte clínico un apartado dedicado en exclusiva a la interpretación de los halos de inhibición en el estudio de disco-difusión de fosfomicina (Figura 13).



**Figura 13.** Ejemplos para realizar una correcta lectura e interpretación de las zonas de inhibición para *E. coli* con discos de fosfomicina según EUCAST.<sup>255</sup>

Estas colonias que aparecen en el interior de los halos de inhibición pueden considerarse como subpoblaciones bacterianas con sensibilidad reducida respecto al resto de la población bacteriana, originando un fenotipo de heterorresistencia. El documento no realiza referencias acerca de la posible implicación o relevancia de este fenómeno en la clínica.

CLSI carece de este apartado para interpretar la lectura de los halos de inhibición ante un fenotipo heterorresistente en el estudio de sensibilidad a fosfomicina, y simplemente, de forma general, establece que ante la presencia heterorresistencia bacteriana a un antimicrobiano, “puede” que el estudio con técnicas moleculares sea más apropiado que el estudio de sensibilidad fenotípico.

## 5. Amikacina

### 5.1. Historia

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos que se utilizan para el tratamiento de una gran diversidad de infecciones bacterianas, aunque su uso se contempla en algunos estudios incluso como tratamiento para otro tipo de síndromes no infecciosos o como agentes con utilidad potencial como inhibidores de la replicación de algunos virus, como el VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana).<sup>272,273</sup>

En 1944 se descubrió el primer aminoglucósido, la estreptomina, al que de forma sucesiva le siguió el descubrimiento de otros antibióticos de este mismo grupo como la

## INTRODUCCIÓN

neomicina, la kanamicina, la gentamicina y la tobramicina. Estos aminoglucósidos naturales derivan de bacterias del suelo pertenecientes a los géneros *Micromonospora spp* (gentamicina) o *Streptomyces spp* (estreptomycin, neomicina, kanamicina y tobramicina).<sup>274</sup> La amikacina, sin embargo, se trata de un aminoglucósido semisintético que deriva de la kanamicina cuyo descubrimiento data del año 1972.<sup>275</sup> Los aminoglucósidos semisintéticos surgen con el fin de superar las resistencias que emergieron a los aminoglucósidos naturales, debidas principalmente a la acción de enzimas modificadoras de los antimicrobianos. Para superar esta barrera, se han incorporado diferentes grupos químicos a las moléculas de síntesis natural que no laceran la actividad antibiótica del fármaco. A pesar de ello, a lo largo de los años, han surgido enzimas capaces de inactivar a la amikacina, las cuales participan en el aumento de la multiresistencia bacteriana, y hacen a este antimicrobiano menos efectivo.<sup>276</sup> A finales de los años 80, principios de los 90, se fueron introduciendo sucesivamente nuevas moléculas semisintéticas en este grupo de antimicrobianos para vencer el problema de la resistencia; sin embargo, los avances más novedosos han tenido lugar con el desarrollo de los neoglucósidos o aminoglucósidos de nueva generación, como la plazomicina. Este nuevo agente semisintético de uso parenteral fue aprobado en 2018 por la FDA para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario complicadas, el cual fue específicamente diseñado para evadir el efecto de las enzimas que más frecuentemente causan resistencia a los aminoglucósidos.<sup>277</sup>

### 5.2. Características moleculares

La estructura química de los aminoglucósidos se basa en aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos amino que se denomina aminociclitol.

Los aminoglucósidos tienen un tamaño molecular que oscila entre 445 y 600 daltons. Su estructura molecular no se ve modificada por la congelación o por el calentamiento, ya que sea visto que permanecen estables incluso tras 4 horas a una temperatura de 100° C. Además, pueden soportar variaciones del pH en un rango de 3 a 12 durante varias horas sin verse modificados.

Los aminoglucósidos a pH fisiológico (pH: 7,35-7,45) son catiónicos, teniendo una carga positiva muy alta que contribuye tanto a la actividad antimicrobiana como a la propia toxicidad del fármaco, ya que les permite unirse a la molécula de ARN, a los lipopolisacáridos de la pared celular y a los fosfolípidos de la membrana celular, así como a otras moléculas aniónicas. Su actividad antibacteriana aumenta en medios con pH alcalino y se reduce en medios con un pH ácido.<sup>278</sup> Por lo tanto, la actividad de estos compuestos se va a ver limitada en un medio con cationes, es decir, en presencia de necrosis tisular con detritos orgánicos (abscesos, secreciones

## INTRODUCCIÓN

bronquiales, etc.). Además, se ha comprobado que los aminoglucósidos catiónicos interactúan químicamente con los antibióticos betalactámicos produciendo la apertura del anillo betalactámico y la acilación de un grupo amino del aminoglucósido dando lugar a la inactivación de ambos compuestos. Este efecto se observa sobre todo *in vitro*, ya que la reacción requiere tiempo, por lo que la relevancia clínica es limitada. De forma general, este fenómeno hace que las penicilinas y los aminoglucósidos no deban mezclarse en la misma solución previo a la infusión. Además, se ha observado una reducción del 10% al 20% en la concentración sérica de aminoglucósidos en pacientes con insuficiencia renal a los que se les administra de manera simultánea un aminoglucósido y un betalactámico en comparación con los niveles observados cuando se administra cada medicamento por separado.<sup>279</sup>

Amikacina ( $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$ ) se trata de un derivado semisintético de la kanamicina A obtenido mediante la adición de ácido 2-hidroxi-4-aminobutírico al grupo amino en la posición 1 del aminociclitol 2-deoxiestreptamina. Tiene un peso molecular de 585,6 Da, es hidrosoluble y su unión a las proteínas del suero es inferior al 11%.<sup>280</sup> Su farmacocinética es similar a la de la gentamicina y la tobramicina, lográndose un pico máximo de concentración sérica a los 30-60 min después de la administración intravenosa y produciéndose el efecto antibacteriano óptimo se producen cuando la concentración máxima en suero es de 8 a 10 veces superior a la CMI.<sup>281</sup>

### 5.3. Mecanismo de acción

La diana principal de los aminoglucósidos es la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (30S). El ARN ribosómico (ARNr) 16S forma parte de la subunidad 30S y contiene diversas funciones, entre las cuales, estabiliza el correcto apareamiento codón-anticodón en la región A, a través de la formación de un puente de hidrógeno entre el átomo N1 de los residuos 1492 y 1493 de adenina y el grupo 2'OH de la cadena del ARN mensajero. Los aminoglucósidos se unen con gran avidez al ARNr 16S en la región A o región de aceptación y reconocimiento del ARN de transferencia (ARNt), dando lugar a la inhibición del proceso de traducción causando una lectura errónea y/u obstaculizando el paso de la translocación.<sup>282</sup> Tanto las interacciones electrostáticas entre grupos de aminoácidos cargados positivamente y los grupos fosfato del ARN cargados negativamente, como los enlaces de hidrógeno entre múltiples grupos de aminoácidos e hidroxilos de ambas moléculas, contribuyen a la producción de un complejo estrechamente ligado que desestabiliza e inhibe el proceso de traducción.

Los anillos de desoxiestreptamina, conservados entre la mayoría de los aminoglucósidos, son esenciales para unirse al sitio de decodificación ribosomal o región A. La unión de los aminoglucósidos induce un cambio conformacional en tres residuos de adenina que reduce la fidelidad de la traducción y translocación normal del ARN mensajero (ARNm) dando

## INTRODUCCIÓN

lugar a la acumulación de proteínas truncadas o no funcionales en la bacteria. Estos antimicrobianos tienen una menor afinidad por los ribosomas de origen humano debido a las diferencias en la secuencia de nucleótidos de éstos respecto al ribosoma bacteriano. En los ribosomas eucariotas, la adenosina se sustituye por una guanosina dentro del sitio A, produciendo una reducción en la unión de éstos. Los nucleótidos de doble adenosina en los ribosomas procarióticos crean una protuberancia interna y una ranura mayor que permite el acceso al sitio de unión ribosomal de los aminoglucósidos. La avidéz de la unión varía con el tipo de aminoglucósido, dependiendo del número de grupos de amino y su estado de protonación.<sup>278</sup> Estudios cristalográficos han demostrado que la amikacina se une al sitio A del ARN 16S de manera a la kanamicina A, sin embargo, existen interacciones específicas entre el grupo 2-hidroxi-4-aminobutírico de la amikacina y el ARN en C1404-G1497 y G1405-G1496.<sup>283,284</sup> También se ha demostrado que los aminoglucósidos causan otras alteraciones en las células bacterianas cuando están presentes en concentraciones subinhibitorias, pudiendo dar lugar a modificaciones en las tasas de transcripción. También se ha visto que la amikacina a bajas concentraciones conduce a la inhibición de la división celular.<sup>285</sup>

Para poder actuar sobre la diana intracelular, los aminoglucósidos deben penetrar previamente en la bacteria. La permeabilidad de estas moléculas está potenciada en las bacterias aerobias que utilizan transportadores de electrones unidos a la membrana. Inicialmente se produce una unión electrostática del aminoglucósido a la superficie celular seguida de dos fases que necesitan consumo de energía. En las bacterias Gram negativas, los aminoglucósidos catiónicos se unen a los residuos cargados negativamente de los lipopolisacáridos, a los extremos polares de los fosfolípidos y a las proteínas aniónicas de la membrana exterior.<sup>278</sup>

Al desplazar competitivamente los puentes de iones de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) e iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) que normalmente unen las moléculas de polisacáridos entre sí en la pared celular, los aminoglucósidos dan lugar a una reorganización de los lipopolisacáridos, formando soluciones de continuidad de la pared celular de forma transitoria, alterando la permeabilidad de la membrana bacteriana. Después de la unión inicial, los aminoglucósidos son transportados a través de la membrana citoplasmática bacteriana por dos fases dependientes de energía. Una fase lenta dependiente que transporta la droga al citosol y una posterior fase rápida en la que se une al ribosoma bacteriano, coincidiendo la muerte celular bacteriana en la transición de una fase a la otra. La mayoría de las células bacterianas manifiestan lesiones letales tras haberse completado solo el 25% de la segunda fase. A mayor concentración externa de aminoglucósidos, el agente alcanzará más rápidamente la concentración intracelular necesaria para pasar de la primera a la segunda fase y producir así la muerte celular.<sup>278</sup>

## INTRODUCCIÓN

Realmente, aún hoy en día, se desconocen los mecanismos exactos de la actividad bactericida de los aminoglucósidos. La unión de estos agentes a los ribosomas es un fenómeno reversible, lo que suele producir un efecto bacteriostático, como es el caso de otros antimicrobianos inhibidores de la síntesis proteica. Esto sugiere la existencia de mecanismos adicionales no identificados en la actividad bactericida de los aminoglucósidos. Producto de la acumulación de grandes concentraciones de aminoglucósidos en el interior de las células bacterianas, se producen una serie de efectos en la bacteria, como la producción de proteínas anómalas o la pérdida de la integridad de la membrana celular, además de la inhibición de la replicación del ADN y la estimulación de la formación de radicales hidroxilo.<sup>286</sup>

### 5.4. Efectos secundarios

El uso de estos antimicrobianos no está exento de efectos secundarios. Los principales riesgos de toxicidad son: ototoxicidad, nefrotoxicidad y bloqueo de la transmisión neuromuscular, aunque este último es más infrecuente.<sup>287-289</sup> El índice terapéutico de los aminoglucósidos es estrecho con respecto a la ototoxicidad y la nefrotoxicidad que producen, siendo dosis-limitante.

El efecto tóxico de estos fármacos en el oído puede dañar tanto a nivel coclear como vestibular. La cocleotoxicidad puede manifestarse como tinnitus y/o pérdida de audición neurosensorial, pudiendo dar lugar a pérdida de audición completa, la cual se produce como resultado del daño causado a las células ciliadas sensoriales del oído interno, en particular, las células ciliadas basales externas de alta frecuencia. La vestibulotoxicidad puede presentarse con vértigo, náuseas, nistagmo y ataxia. No todos los aminoglucósidos presentan los mismos efectos. La neomicina se considera el aminoglucósido más ototóxico, seguido de la gentamicina, la kanamicina y la tobramicina. La estreptomycin y la gentamicina son principalmente vestibulotóxicos, mientras que la amikacina, la neomicina y la kanamicina son preferentemente cocleotóxicos. Los tratamientos con dosis elevadas, las altas concentraciones plasmáticas, las dosis repetidas con mayor frecuencia y los largos períodos de tratamiento se asocian a un mayor riesgo de ototoxicidad de estos fármacos. La disfunción renal, la edad avanzada, la exposición al ruido, déficits auditivos preexistentes y la administración conjunta con otros medicamentos ototóxicos o nefrotóxicos son también factores que aumentan el riesgo de ototoxicidad inducida por los aminoglucósidos.<sup>287</sup> Se han intentado buscar diferentes estrategias en los esfuerzos por limitar los efectos ototóxicos de los aminoglucósidos, como agentes depuradores de radicales libres, así como quelantes de hierro, salicilato, N-acetilcisteína o la d-tubocurarina y la berbamina como posibles agentes otoprotectores.<sup>290</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los aminoglucósidos ejercen sus efectos nefrotóxicos a través de 3 mecanismos generales: toxicidad tubular renal, reducción de la filtración glomerular y reducción del flujo sanguíneo renal. La toxicidad tubular renal es el mecanismo principal por el cual los aminoglucósidos causan su efecto nefrotóxico. Estos agentes sufren endocitosis en el túbulo proximal de la nefrona, acumulándose en los lisosomas, el cuerpo de Golgi y el retículo endoplasmático. Alcanzado un umbral de concentración en el lisosoma, los aminoglucósidos pasan al citoplasma y actúan sobre las mitocondrias induciendo la apoptosis y la muerte celular. Además, por otro lado, inhiben una serie de proteínas transportadoras del túbulo proximal, afectando a la reabsorción tubular y comprometiendo la viabilidad celular. Mediante distintos mecanismos (secreción del factor activador de plaquetas, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la estimulación en la producción de sustancias vasoconstrictoras y el aumento del estrés oxidativo) los aminoglucósidos provocan aumentos de los niveles de calcio intracelular, produciendo contracción del mesangio glomerular renal, provocando una disminución en la tasa de filtración glomerular. En definitiva, mediante este último mecanismo, la nefrotoxicidad se produce por una reducción del flujo sanguíneo renal secundaria al aumento de la resistencia vascular en el lecho vascular renal.<sup>288</sup> El daño tubular es reversible, y se ha visto en algunos pacientes que a pesar de continuar con el tratamiento con aminoglucósidos son capaces de recuperar la función renal. Los factores de riesgo para que se produzca toxicidad renal en un paciente en tratamiento con aminoglucósidos se encuentran en relación con características del propio paciente, la administración de ciertos fármacos de forma concomitante o simplemente en relación con características del tratamiento con aminoglucósidos en sí. Entre los factores de riesgo derivados del paciente se ha visto relación con un mayor riesgo de nefrotoxicidad en pacientes que presentan: edad avanzada y fallo renal o hepático preexistente.<sup>291</sup> La relación del sexo masculino o femenino con un mayor riesgo de nefrotoxicidad no está del todo clara y difiere entre los estudios.<sup>292,293</sup> Se ha visto también una mayor tendencia en aquellos pacientes que sufren de sepsis o shock séptico ya que son en sí más proclives a sufrir insuficiencia renal. No está del todo claro la influencia que ejercen los aminoglucósidos *per se*, ya que la propia infección puede inducir hipotensión, coagulopatía de consumo y daño endotelial por citoquinas, entre otros factores, que dan lugar a una disminución del filtrado glomerular. Se ha visto que en el inicio del tratamiento con antibióticos se produce la liberación de endotoxinas, consecuencia de la liberación de los componentes de la pared celular bacteriana, que pueden agravar la situación clínica en el paciente con sepsis o shock séptico; sin embargo, los aminoglucósidos son del grupo de antimicrobianos que se ha visto que induce una menor liberación de endotoxinas.<sup>294</sup> La mayoría de los estudios sugieren un mayor

## INTRODUCCIÓN

riesgo de disminución de la tasa de filtración glomerular cuando se administran otros fármacos nefrotóxicos de forma concomitantemente con los aminoglucósidos.<sup>288</sup>

### 5.5. Espectro de acción y epidemiología de la resistencia

Los aminoglucósidos presentan actividad frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Son especialmente efectivos frente a las enterobacterias, incluyendo al agente causal de la peste, *Yersinia pestis*; así como frente a bacilos Gram negativos no fermentadores o frente a *Francisella tularensis*.<sup>295,296</sup> Sin embargo, no presentan actividad *in vitro* frente a algunos bacilos Gram negativos como *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>297</sup> o *Burkholderia spp.*<sup>298</sup> Con respecto a su actividad frente a bacterias Gram positivas, son activos frente a diferentes especies de estafilococos, tanto coagulasa negativos como frente a *S. aureus*; sin embargo, todas las especies de estreptococos son resistentes a este grupo de antimicrobianos. Su actividad frente a los enterococos es eficaz solo cuando se utilizan en combinación con un antibiótico que actúa frente a la pared celular bacteriana, como son los betalactámicos o la vancomicina.<sup>299</sup> Debido a que los aminoglucósidos requieren de un metabolismo de tipo aerobio para ejercer un efecto antibacteriano, todas las bacterias anaerobias son intrínsecamente resistentes a estos antimicrobianos.<sup>300</sup> Además, también son activos frente a las micobacterias, variando su efecto entre las diferentes especies.<sup>301,302</sup>

Los aminoglucósidos presentan actividad *in vitro* frente a *Haemophilus spp* y *Legionella spp*; sin embargo, no se utilizan para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos. La *Legionella spp* es un patógeno intracelular, y debido a la baja concentración que alcanzan los aminoglucósidos en el compartimiento lisosómico, su actividad antimicrobiana intracelular se ve obstaculizada. Sin embargo, su uso es efectivo en el tratamiento de otras infecciones intracelulares, como la brucelosis, formas crónicas de bartonelosis, así como en la tuberculosis, la tularemia y la yersiniosis.<sup>303</sup>

Por otro lado, se ha observado que la actividad de estos antimicrobianos se ve mermada en la orina, lo que se piensa que es debido al pH bajo en orina y una alta osmolalidad causada por las altas concentraciones de sal y glucosa, así como a la presencia de betaínas presentes normalmente en la orina.<sup>304</sup>

La actividad bactericida de los aminoglucósidos es concentración-dependiente, es decir, su efecto se incrementa al aumentar las concentraciones del antibiótico. Además, estos antimicrobianos presentan lo que se conoce como efecto postantibiótico, lo cual se define como la supresión del crecimiento bacteriano posterior a la exposición a un antibiótico *in vitro*; es decir, el antimicrobiano continúa suprimiendo a las bacterias incluso después de que se haya

## INTRODUCCIÓN

eliminado el aminoglucósido tras una breve incubación con el microorganismo. Este efecto también se ha observado en modelos *in vivo*.<sup>305</sup> La actividad bactericida de estos fármacos dependiente de la concentración, así como el efecto postantibiótico y su toxicidad son las principales razones para que su administración en una única dosis diaria sea apropiada en pacientes que presentan función renal normal.<sup>306</sup>

Otra importante característica de los aminoglucósidos es su capacidad de producir una actividad bactericida sinérgica en combinación con agentes antimicrobianos que inhiben la biosíntesis de la pared celular, como los betalactámicos o la vancomicina. El sinergismo se presume como resultado de una mayor captación intracelular del aminoglucósido causada por el aumento de la permeabilidad de las bacterias tras el efecto de los inhibidores de la síntesis de la pared celular.<sup>307</sup> El efecto sinérgico entre los aminoglucósidos y los antibióticos betalactámicos se conoce desde hace décadas,<sup>308</sup> sin embargo, este efecto está menos constatado junto con otros antimicrobianos. A su vez, se ha descrito un efecto antagónico entre los aminoglucósidos y los betalactámicos vinculado a la inducción de un enzima modificador de los aminoglucósidos presente en microorganismos Gram positivos.<sup>309</sup>

En concreto, la amikacina se ha utilizado para tratar con éxito infecciones resistentes a otros aminoglucósidos, además de utilizarse tanto sola como en combinación para tratar una variedad de infecciones graves causadas por bacterias Gram negativas aerobias,<sup>310</sup> así como por micobacterias y *Nocardia*.<sup>311</sup> Tras su introducción a finales de los 70, empezaron a aparecer cepas resistentes en diferentes zonas geográficas; sin embargo, sigue siendo el aminoglucósido más activo frente a las enterobacterias junto con la plazomicina, incluso frente a enterobacterias productoras de carbapenemasas.<sup>276,277</sup> En un estudio realizado en Estados Unidos en 50 aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, de las cuales el 80% y el 10% eran productoras de carbapenemasas de tipo KPC-2 y KPC-3, respectivamente, se detectaron enzimas modificadoras de aminoglucósidos hasta en un 98 % de los aislados, siendo resistentes a amikacina solo el 16%, mientras que el 40% y el 98% fueron resistentes a gentamicina y tobramicina, respectivamente.<sup>312</sup> En otro estudio canadiense en el que se evaluó la actividad *in vitro* de distintos aminoglucósidos frente a una colección de 5.015 aislados clínicos se observaron valores de sensibilidad a amikacina entre los aislados de *E. coli* (n=84) y *K. pneumoniae* (n=15) productores de BLEE de hasta un 96,4% y un 93,3%, respectivamente, así como un porcentaje de sensibilidad superior al 80% en los aislados de SARM (n=266). Además, estos autores encuentran que la actividad de amikacina y plazomicina frente a los aislados de *P. aeruginosa* multirresistente (n=64) fue muy parecida, con CMI<sub>50</sub> de 4 mg/L y 8 mg/L, respectivamente.<sup>313</sup>

### 5.6. Mecanismos de resistencia

La resistencia bacteriana a los aminoglucósidos se puede producir por cuatro mecanismos diferentes: A) modificación enzimática e inactivación de los aminoglucósidos mediada por acetiltransferasas de aminoglucósidos, nucleotidiltransferasas o fosfotransferasas,<sup>276</sup> B) bombas de expulsión, C) disminución de la permeabilidad del antimicrobiano; y D) modificaciones de la diana antimicrobiana, de la subunidad ribosómica 30S (mutaciones a nivel génico o cambios postranscripcionales del ARNr 16S), que interfieren en la unión de los aminoglucósidos.<sup>314</sup>

#### A) Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

A continuación, se describen los enzimas modificadores de aminoglucósidos cuyo espectro de acción en la disminución de la sensibilidad a amikacina ha sido demostrado.

N-Acetiltransferasas (AAC): se trata de una superfamilia de proteínas que incluye aproximadamente 10.000 proteínas. Éstas catalizan la acetilación de los grupos -NH<sub>2</sub> en la molécula aceptora utilizando el acetil-coenzima A (acetil-CoA) como sustrato donante.<sup>315</sup> En este caso, el sustrato receptor se trata del antimicrobiano aminoglucósido, el cual puede acetilarse en diferentes posiciones según al grupo amino al que afecte. Se determinan así cuatro clases diferentes de acetilasas: las que acetilan en la posición 1 [AAC (1)], en la posición 3 [AAC (3)], en la posición 2' [AAC (2')], o en la 6' [AAC (6')].

- AAC (3): se han descrito hasta nueve subclases de este enzima, todas ellas en Gram negativos. La subclase AAC (3)-X, presente en aislados de actinobacterias, además de catalizar la acetilación de la kanamicina y la dibekacina en el grupo 3-N también media la acetilación del grupo 3"-N en la arbekacina y la amikacina. La acetilación de la amikacina da lugar a la formación de la 3"-N-acetilamikacina, la cual carece de prácticamente de actividad antibiótica.<sup>316</sup>
- AAC (6')-I: esta clase de enzimas son las más frecuentes en los aislados clínicos y su mecanismo de acción es la acetilación en la posición 6'-N. Están presentes tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas incluyéndose a nivel plasmídico o cromosómico. Existen dos subclases principales que difieren en su actividad frente a amikacina y a gentamicina. Mientras que la subclase AAC (6')-I muestra gran actividad frente a amikacina y a gentamicina C1a y C2, su actividad es muy limitada frente a la gentamicina C1. Sin embargo, la subclase AAC (6')-II produce la acetilación de las tres formas de gentamicina sin afectar a la amikacina.<sup>317</sup>

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas AAC (6') pueden existir como proteínas de fusión presentes en la región amino terminal o carboxilo de la proteína compuesta. Estos genes de AAC (6') fusionados se encuentran generalmente dentro de integrones. Se han encontrado proteínas fusionadas con actividad acetiltransferasa de tipo AAC (6')-I junto con otra con actividad fosfotransferasa, adeniltransferasa o incluso con otra acetiltransferasa distinta. La AAC (6')-Ib es probablemente la acetiltransferasa más importante desde el punto de vista clínico, siendo responsable de la resistencia a amikacina, así como a otros aminoglucósidos, encontrándose en diferentes géneros de bacterias Gram negativas (*Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Vibrionaceae*). Algunas de sus variantes muestran un espectro ampliado que incluye la resistencia a gentamicina o la sensibilidad reducida a las quinolonas.<sup>276</sup> Suele encontrarse como un casete de genes en diferentes integrones y se asocia a genes de resistencia a quinolonas y betalactámicos.<sup>318</sup>

O-Nucleotidiltransferasas (ANT): estos enzimas producen la inactivación de los antibióticos aminoglucósidos mediante la transferencia de un grupo AMP procedente del sustrato donante ATP a un grupo hidroxilo de la molécula de aminoglucósido. Se describen así cinco clases de ANT diferentes que catalizan la adenilación en las posiciones 6 [ANT (6)], 9 [ANT (9)], 4' [ANT (4')], 2'' [ANT (2'')], y 3'' [ANT (3'')], de las cuales ANT (4') incluye dos subclases, I y II.

- ANT (4'): este enzima se ha encontrado en plásmidos de microorganismos Gram positivos. Existen dos subclases (I y II), y ambas confieren resistencia a la tobramicina, la amikacina y la isepamicina. La subclase I confiere además resistencia a la dibekacina.<sup>319</sup>

O-Fosfotransferasas (APH): se trata de enzimas de tipo kinasa; es decir, catalizan la transferencia de un grupo fosfato a la molécula de aminoglucósido. Las clases y subclases son APH(4)-I, APH(6)-I, APH(9)-I, APH(3')-I hasta la VII, APH(2'')-I hasta la IV, APH(3'')-I, APH(7'')-I.<sup>320</sup>

- APH (3'): existen distintas subclases de este enzima, pero se han descrito solo dos de este tipo que afectan a la sensibilidad a amikacina: la APH (3')-IIIa y la APH (3')-VIb. La APH (3')-IIIa, la que confiere resistencia además a otros aminoglucósidos como la kanamicina, la neomicina, la lividomicina, la paromicina, la livostamicina, la butirosina y la isepamicina y se encuentra ampliamente distribuido entre los microorganismos Gram positivos.<sup>320</sup> Por otro lado, el enzima APH(3')-VIb se describió en *K. pneumoniae* y *S. marcescens* y produce resistencia a

## INTRODUCCIÓN

kanamicina, neomicina, paromicina, ribostamicina, butirosina e isepamicina, además de a amikacina.<sup>321</sup>

### **B) Bombas de expulsión y C) disminución de la permeabilidad del antimicrobiano**

Se han descrito bombas de expulsión que pueden actuar expulsando del interior celular a diversos fármacos y produciendo resistencias de bajo nivel y de amplio espectro, afectando a diferentes antimicrobianos. Este tipo de proteínas transmembrana puede ejercer su acción también frente a los aminoglucósidos.<sup>322</sup> Por otro lado, debido a que la penetración del antimicrobiano en el interior bacteriano requiere de la respiración celular, la cual genera un potencial eléctrico a través de la membrana citoplasmática, el que se produzca un bajo nivel de potencial transmembrana o la ausencia del mismo, es responsable de la resistencia intrínseca de las bacterias anaerobias y de la sensibilidad disminuida en los microorganismos anaerobios facultativos, como es el caso de los enterococos.<sup>323</sup> También se han descrito mutaciones cromosómicas en *S. aureus* que influyen en el potencial eléctrico transmembrana que además reducen la tasa de crecimiento del microorganismo dando lugar a una disminución de la sensibilidad a los aminoglucósidos.<sup>324</sup>

### **D) Modificaciones de la diana antimicrobiana**

Las modificaciones de la diana que producen resistencia a los aminoglucósidos incluyen los cambios mutacionales en las proteínas ribosomales o ARNr 16S, así como la metilación enzimática postranscripcional del ARNr. Los cambios mutacionales producen resistencia sobre todo a estreptomomicina;<sup>325</sup> aunque también se ha descrito resistencia a espectinomomicina. Sin embargo, las mutaciones dentro de la subunidad ribosómica 30S no parecen ser un mecanismo común de resistencia a los aminoglucósidos entre las bacterias patógenas de crecimiento rápido en general.

Es común observar en bacterias productoras de aminoglucósidos, como *Streptomyces* spp y *Micromonospora* spp, la modificación postranscripcional del ARNr 16S, las cuales son resistentes a estos metabolitos de forma natural. Estos enzimas producen la metilación postranscripcional, concretamente en dos localizaciones específicas del ARNr 16S como son: la posición N-7 del nucleótido G1405 y la posición N-1 del nucleótido A1408. La metiltransferasa intrínseca N7-G1405 se encuentra tanto en *Streptomyces* spp como en *Micromonospora* spp, mientras que N1-A1408 solo se ha identificado en *Streptomyces* spp. Se han identificado nueve enzimas N7-G1405 (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG y RmtH) de tipo adquirido que comparten secuencias aminoacídicas similares y confieren resistencia a gentamicina, tobramicina y amikacina, pero no afectan a neomicina ni a apramicina

## INTRODUCCIÓN

(aminoglucósidos del grupo de la 2-deoxistreptamina, 4,5-disustituídos y 4-monosustituídos). Sin embargo, las N1-A1408 son capaces de conferir resistencia a agente aminoglucósidos de cualquiera de estos grupos y hasta la fecha solo se ha descrito una única N1-A1408 adquirida. Esta enzima, denominada NpmA, fue identificada a partir de una cepa clínica de *E. coli* en Japón.

314

Por último, aunque no se considera tradicionalmente como un mecanismo de resistencia, las proteasas de membrana pueden ofrecer protección frente a los aminoglucósidos, ya que forman parte de un sistema intrínseco de control de calidad de la biosíntesis de las proteínas que reconoce y degrada las estructuras proteicas aberrantes. Debido a que uno de los efectos que provoca los aminoglucósidos es la síntesis de proteínas aberrantes, que se acumulan y perturban la integridad de la membrana celular, cualquier protección frente a estas estructuras dará lugar a tolerancia a estos fármacos. Se han descrito mutaciones en estas proteínas que producen una mayor sensibilidad a algunos aminoglucósidos, como la tobramicina, mostrando la implicación éstas en la resistencia a los aminoglucósidos.<sup>326</sup>

### 5.7. Estudios de sensibilidad: técnicas, puntos de corte de sensibilidad/resistencia

Para el estudio de sensibilidad a amikacina las técnicas que se pueden utilizar son aquellas descritas en el punto 6.3.3. A diferencia de las condiciones establecidas para el estudio de sensibilidad a fosfomicina, para el estudio de la amikacina no se requiere ningún suplemento adicional. Ambos antimicrobianos presentan diferencias en los puntos de corte clínicos aplicados en *Enterobacterales* según las recomendaciones de ambos comités, EUCAST y CLSI (Tabla 1).

**Tabla 1.** Puntos de corte de CMI (mg/L) y diámetro de halo (mm) para amikacina según EUCAST<sup>255</sup> y CLSI.<sup>247</sup>

Comité científico	Puntos de corte de CMI (mg/L)			Puntos de corte de diámetro de halo de inhibición (mm)		
	S	I	R	S	I	R
<b>EUCAST</b>	≤8	-	>8	≥18	-	<18
<b>CLSI</b>	≤16	32	≥64	≥17	15-16	≤14

S: sensible, I: intermedio (CLSI)/sensible a incremento de exposición (EUCAST), R: resistente

## INTRODUCCIÓN

Recientemente, EUCAST realiza una revisión de los puntos de corte para amikacina, estableciendo una reducción de los mismos respecto a las versiones anteriores.<sup>327</sup> Estos puntos de corte se basan en datos de FC/FD teniendo en cuenta la concentración alcanzada en el organismo según la administración de una única dosis diaria de 25-30 mg/kg/día. El problema puede surgir cuando se presentan infecciones por bacterias multirresistentes o extremadamente resistentes que presentan valores de sensibilidad en valores límite de los puntos de corte, hecho que se complica aún más en el caso de afectar a pacientes críticos, ya que la predicción de los valores FC/FD es aún más compleja.<sup>328</sup> Estudios recientes realizados en pacientes críticos, demuestran que en aislados con CMI de 16 mg/L a amikacina, las dosis necesarias para alcanzar concentraciones terapéuticas en plasma que permitan lograr el objetivo FC/FD serían de 30-40 mg/kg. Incluso con puntos de corte más bajos, de 8 mg/L, no se lograría alcanzar este objetivo a pesar de la administración de la dosis más alta aprobada.<sup>329</sup> Por ello, una de las opciones recomendadas para el tratamiento en este tipo de pacientes es el uso de altas dosis de amikacina seguidas de terapia de reemplazo renal para minimizar los posibles efectos tóxicos asociados.<sup>330</sup>

Los tratamientos de corta duración con aminoglucósidos (5-7 días), pautados una sola vez al día, se asocian con una menor nefrotoxicidad en comparación con la administración de varias dosis diarias. Se ha asociado un mayor riesgo de nefrotoxicidad en pacientes en estado crítico, pacientes con shock séptico y pacientes con regímenes de tratamiento superiores a 10 días, por lo que como consecuencia, se establece la necesidad de realizar la vigilancia de las concentraciones séricas en los pacientes para garantizar los niveles terapéuticos y evitar niveles tóxicos de estos fármacos.<sup>306</sup>

Algunos autores han sugerido que alcanzar una proporción de  $C_{m\acute{a}x}/CMI \geq 8$  en infecciones por bacilos Gram negativos predice el éxito terapéutico. En un estudio realizado por Burdet y colaboradores, cuyo objetivo FD principal era de una ratio  $\geq 10$  entre la concentración alcanzada a la hora del inicio de la infusión con amikacina y la CMI en pacientes críticos, demostraron con una infusión simulada de 20 mg/kg de amikacina, que se alcanzaba el objetivo en el 96% en las infecciones producidas por bacilos Gram negativos con CMI de 4 mg/L. En base a una disminución en la eliminación de la droga, así como por el aumento del volumen de distribución en este tipo de pacientes, los autores concluyen que son necesarias dosis  $\geq 25$  mg/kg/día para lograr el objetivo terapéutico en la neumonía asociada a ventilación mecánica por bacilos Gram negativos en pacientes críticos.<sup>331</sup>

En otro estudio reciente retrospectivo realizado por Hideo y colaboradores, analizan la relación que existe entre  $C_{m\acute{a}x}/CMI$  teniendo en cuenta diferentes valores de CMI de 0,5 a 32 mg/L, utilizando simulaciones de Monte Carlo. Incluyen a 35 pacientes con distintos tipos de

## INTRODUCCIÓN

infección que habían sido tratados con amikacina durante al menos 3 días. Del total de pacientes, 25 eran de sexo masculino, con una mediana de edad de 70 años (rango: 15-95) y de peso corporal de 49,5 kg (rango: 32,5-78). Utilizaron un modelo de dos compartimentos, y observaron que la probabilidad de lograr una  $C_{m\acute{a}x}/CMI$  de  $\geq 8$  con el régimen de 15 mg/kg fue suficiente en el  $\geq 90\%$  de los pacientes con valores de  $CMI \leq 4$  mg/L. Concluyen que la dosis de 15 mg/L sería recomendable como dosis inicial, siendo suficiente como dosis de mantenimiento en aquellos pacientes con una infección por bacterias con  $CMI \leq 4$  mg/L. Sin embargo, estos autores recalcan que esta dosis debería evitarse en el tratamiento en monoterapia para infecciones por microorganismos con  $CMI \geq 8$  mg/L a amikacina, sobre todo en presencia de bacteriemia o neumonía.<sup>332</sup>

## 6. Fenómeno de heterorresistencia antibiótica

### 6.1. Definición de heterorresistencia y su frecuencia en la clínica

La definición generalizada de heterorresistencia es la presencia de una población heterogénea de bacterias con una o varias subpoblaciones con sensibilidad disminuida al antibiótico en comparación con la población principal o mayoritaria.<sup>333</sup> Hay que tener en cuenta que esta definición abarca multitud de factores distintos subyacentes que aportan diferentes connotaciones a la población bacteriana heterorresistente como son: el origen clonal de la población bacteriana, el nivel de resistencia de las subpoblaciones comparado con el de la población principal, la frecuencia de subpoblaciones resistentes y la estabilidad del fenotipo heterorresistente.<sup>334</sup>

#### Factores que definen la heterorresistencia bacteriana:

##### 1. Origen clonal de la población bacteriana:

En este apartado se define como un clon bacteriano a aquellas células bacterianas que surgen a partir de una única UFC aislada.

*Heterorresistencia policlonal:* se define así cuando la heterogeneidad en la resistencia de la población bacteriana se debe a la presencia de diferentes clones bacterianos, genéticamente distintos, uno sensible y otro resistente. En la heterorresistencia policlonal al separar, aislar y purificar los diferentes clones bacterianos en UFC, desaparece el fenómeno de heterorresistencia. Es decir, si tomamos una única UFC y se realiza un antibiograma, ésta será sensible o resistente, dependiendo del origen clonal de la misma.

## INTRODUCCIÓN

*Heterorresistencia monoclonal:* la heterogeneidad de la resistencia se genera a partir de un único clon bacteriano que se diferencia en dos poblaciones diferentes, una sensible y otra resistente en ausencia de presión antibiótica. La diferencia respecto al caso anterior es que la frecuencia con la que aparecen poblaciones mutantes resistentes de forma espontánea a partir de la población general sensible es muy elevada. Por lo tanto, una UFC compuesta por millones de células bacterianas individuales que se ha formado a partir de la fisión de una única célula bacteriana, de un único clon, se compondrá a su vez por una variedad poblacional de células resistentes y sensibles. Este fenotipo de heterorresistencia se va a mantener incluso al analizar los clones puros a diferencia de la policlonal. Es decir, en la heterorresistencia monoclonal, si se realiza un antibiograma de una colonia pura y aislada por disco difusión, se podrá observar los dos tipos de poblaciones derivados del mismo clon, una población bacteriana sensible que produce un diámetro de halo de inhibición superior al punto de corte de sensibilidad y otra población bacteriana con sensibilidad disminuida que se podrá visualizar creciendo dentro del halo de inhibición.

### 2. Nivel de resistencia de las subpoblaciones:

La mayoría de aislados bacterianos pueden presentar subpoblaciones que crecen en concentraciones antibióticas cercanas a su CMI. Por este motivo, diversos estudios intentan establecer un número mínimo en el incremento de la CMI de las subpoblaciones respecto al valor de CMI de la población mayoritaria para definir el criterio de heterorresistencia. Sin embargo, no existe un criterio homogéneo y según algunos estudios, se definen las bacterias heterorresistentes cuando la CMI de las subpoblaciones son superiores a valores entre 2 y 8 diluciones seriadas en base 2 por encima de la CMI de la población mayoritaria (Figura 15).<sup>335,336</sup> Por el contrario, otros estudios utilizan para definir poblaciones heterorresistentes aquellas en las que la subpoblación resistente supera los puntos de corte de resistencia clínicos establecidos para el antibiótico.<sup>337</sup>

### 3. Frecuencia de subpoblaciones resistentes:

La proporción o frecuencia de subpoblaciones resistentes dentro de la población mayoritaria es también un factor a tener en cuenta a la hora de definir a un aislado como heterorresistente. Esta frecuencia nos indica el número de células bacterianas resistentes (o con sensibilidad disminuida) totales que hay en la población. En la heterorresistencia

## INTRODUCCIÓN

monoclonal, tanto la sensibilidad y concentraciones del antibiótico que se utilicen para estudio de las subpoblaciones resistentes como la proporción mínima que se establezca para considerar a estas subpoblaciones como significativas, van a influir en la clasificación del aislado como heterorresistente. En la última revisión sobre heterorresistencia de Andersson y colaboradores, proponen que se informe la frecuencia de las subpoblaciones bacterianas a una concentración del antibiótico 8 veces superior a la CMI de la población principal.<sup>334</sup>

#### 4. Estabilidad de la heterorresistencia:

La estabilidad de las subpoblaciones resistentes es otro factor que debe tenerse en cuenta para definir la heterorresistencia, ya que este fenómeno puede ser estable<sup>338</sup> o inestable, pudiendo afectar a la capacidad de detección del mismo. La heterorresistencia inestable es aquella que se define siempre que las subpoblaciones resistentes pueden volver a ser sensibles en ausencia de presión antibiótica después de 50 generaciones en ausencia de antibiótico.<sup>336</sup>

#### **Frecuencia de la heterorresistencia en los aislados clínicos**

La frecuencia de heterorresistencia en los aislados clínicos es directamente dependiente de la definición y del método de detección de heterorresistencia que se apliquen así como del número de aislados estudiados; por lo que se observa una gran variabilidad de las tasas de heterorresistencia, oscilando de un 0% a un 100% para una misma combinación de antibiótico-especie bacteriana, dependiendo del estudio.<sup>334</sup>

Un tipo de heterorresistencia que ha sido estudiada por numerosos autores es la heterorresistencia al antibiótico vancomicina en aislados de *S. aureus* (SAIVh). En esta especie bacteriana es más frecuente encontrar el fenotipo SAIVh que un valor de CMI de toda la población intermedio o resistente. En un metaanálisis en el que analizan la incidencia de SAIVh en 91 estudios publicados desde 1997 al 2014, calculan una prevalencia de SAIVh de un 6,05% en casi 100000 aislados de SARM, observándose un incremento a lo largo del periodo de estudio, aumentando de valores inferiores al 5% en los estudios previos al 2006, a porcentajes superiores al 7% en aquellos posteriores al año 2010.<sup>339</sup> Además, en *Staphylococcus spp*, diversos estudios han demostrado altas tasas de heterorresistencia a antibióticos como oxacilina, teicoplanina o daptomicina, entre otros; observándose fenómenos de co-heterorresistencia con SAIVh en algunos casos.<sup>340-342</sup>

Si nos centramos en los valores de heterorresistencia que se han observado en un estudio reciente realizado por Nicoloff y colaboradores en bacilos Gram negativos (A.

## INTRODUCCIÓN

*baumannii*, *E. coli*, *S. typhimurium* y *K. pneumoniae*) observaron hasta un 27,4% de heterorresistencia en las 766 combinaciones distintas de aislado-antibiótico.<sup>336</sup> En la misma línea se encuentran los resultados de un trabajo también realizado recientemente en el que analizan 104 aislados clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasa multirresistentes frente a 16 antibióticos diferentes. Se observó que, para cada uno de los antibióticos testados, la proporción de aislados que presentaban heterorresistencia difería para los distintos fármacos; sin embargo, el porcentaje más elevado de heterorresistencia se observó con el antibiótico fosfomicina (72,1%), siendo el más bajo para la ampicilina (1%). Destacar, que en este estudio, el 97,1% de los aislados eran heterorresistentes al menos a uno de los 16 antibióticos estudiados, y el 86,5% presentaba heterorresistencia al menos a dos fármacos.<sup>343</sup>

Con respecto al porcentaje de heterorresistencia a antimicrobianos importantes en el tratamiento de infecciones sistémicas por bacilos Gram negativos, como los carbapenémicos, se ha visto que es un fenómeno con resultados muy heterogéneos entre los distintos estudios llevados a cabo sobre aislados clínicos. Por ejemplo, en un trabajo realizado en Suiza sobre aislados clínicos de *Haemophilus influenzae*, se han observado porcentajes de aislados heterorresistentes a carbapenémicos, concretamente a imipenem, de hasta un 37%, con una tasa de frecuencia de aparición de subpoblaciones que oscilaba entre un 1-10%.<sup>344</sup> En aislados clínicos de *K. pneumoniae* los porcentajes de heterorresistencia a carbapenémicos varían entre un 16,7% y un 100% de los aislados dependiendo de los estudios.<sup>336,345,346</sup> De forma más frecuente, el porcentaje más elevado de heterorresistencia a carbapenémicos en *E. coli* se observa para ertapenem más que para los otros carbapenémicos, como meropenem o imipenem.<sup>336,347</sup>

La heterorresistencia a antibióticos de reserva como la colistina, ha sido estudiada en multitud de especies de bacilos Gram negativos. Ejemplo de ello, es un trabajo en el que se analizó la sensibilidad a colistina de 76 aislados de hemocultivo de *Acinetobacter* spp, detectándose una tasa de heterorresistencia a este antibiótico casi ocho veces superior a la de resistencia (20% vs 2,6%). Además, en otro trabajo en el que estudian aislados de multirresistentes de esta misma especie bacteriana, los autores observaron un porcentaje de heterorresistentes a la colistina de un 23,3% frente a un 3,3% de aislados resistentes.<sup>348,349</sup> En otro estudio en el que se analizó la sensibilidad a colistina de 21 aislados clínicos de *K. pneumoniae* multirresistentes mediante el método de análisis del perfil poblacional (el cual se explicará detalladamente en el apartado 5.2), observaron un 60% de aislados heterorresistentes frente a un 20% de resistentes.<sup>350</sup>

La frecuencia de heterorresistencia a fosfomicina en aislados clínicos ha sido estudiada en diferentes especies bacterianas. En un trabajo realizado sobre un total de 11

## INTRODUCCIÓN

aislados de *S. pneumoniae* en el que tratan de caracterizar los mecanismos subyacentes en la heterorresistencia a fosfomicina de esta especie, incluyen 5 aislados clínicos y 6 cepas de laboratorio, encontrando la presencia del fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina en más del 90% (10/11) de los aislados del estudio.<sup>351</sup> También se ha estudiado la frecuencia de heterorresistencia a fosfomicina en otras especies con perfiles de resistencia de complejidad terapéutica, como *P. aeruginosa* multirresistente o enterobacterias resistentes a carbapenémicos. En un estudio realizado en Australia analizan 64 aislados clínicos de *P. aeruginosa* (54% multirresistentes), de los que seleccionan al azar a 14 de aquellos categorizados como sensibles según los puntos de corte clínicos (CMI  $\leq$ 64 mg/L), y realizan estudios de perfil poblacional, encontrando que en un 100% (14/14) de los aislados presentaban subpoblaciones capaces de crecer a concentraciones de fosfomicina por encima de 64 mg/L.<sup>352</sup> En otro trabajo, realizado en Alemania, analizan el porcentaje de heterorresistencia a fosfomicina en un total de 107 aislados de enterobacterias que presentaban resistencia a algún carbapenémico. Entre las diferentes especies bacterianas, obtenidas principalmente de muestras de orina, muestras respiratorias y exudados de herida, se encontraban aislados de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter farmeri*, hallándose un porcentaje total de un 41,1% de aislados heterorresistentes a fosfomicina, sin encontrarse diferencias significativas entre las diferentes especies bacterianas.<sup>166</sup>

Por último, cabe destacar otros trabajos que centran el estudio concreto de la sensibilidad heterogénea a fosfomicina en aislados clínicos de *E. coli*. Recientemente se ha publicado un trabajo en los Países Bajos, en el que analizan aislados clínicos de *E. coli* de origen urinario, encontrando una frecuencia de un 9% de heterorresistentes entre un total de 66 aislados de *E. coli* multirresistentes.<sup>353</sup> Por otro lado, en otro trabajo realizado en Estados Unidos en el que estudian una colección de más de 600 aislados clínicos de esta misma especie bacteriana, obtenidos en el periodo de 2011 al 2015, encuentran un porcentaje inferior de heterorresistencia a fosfomicina de un 3,1%. El 0,8% del total de aislados presentaba colonias con nivel de resistencia que superaban los puntos de corte de sensibilidad clínica.<sup>338</sup>

## 6.2. Mecanismos de heterorresistencia bacteriana

### Mecanismos de heterorresistencia

#### Heterorresistencia policlonal

La coexistencia en un mismo foco de dos poblaciones genéticamente distintas, una sensible y otra resistente, se puede producir de dos formas distintas: (1) por una infección bacteriana mixta de la misma especie patógena con una población sensible y otra resistente,

## INTRODUCCIÓN

como se ha descrito en *M. tuberculosis*<sup>354</sup> o *Helicobacter pylori*<sup>355</sup> o (2) por una mutación que de forma espontánea, en la población bacteriana general sensible, da lugar a una subpoblación bacteriana resistente que se diferencia del resto y se selecciona durante el tratamiento antibiótico, aumentando en proporción.

### Heterorresistencia monoclonal

A diferencia de la heterorresistencia policlonal, la resistencia monoclonal se observa en un clon bacteriano puro, es decir, una única célula da lugar a bacterias resistentes y sensibles dentro de la misma UFC. Estas bacterias sensibles y resistentes con origen monoclonal se pueden producir por una heterogeneidad genética, aunque existen estudios que relacionan esta heterogeneidad en los mecanismos de tipo fisiológico con la heterorresistencia bacteriana.<sup>356</sup> Sin embargo, los mecanismos de etiología distinta a la genética, se han relacionado principalmente con el fenómeno de persistencia más que con la heterorresistencia. Las subpoblaciones resistentes persistentes tienen la capacidad de sobrevivir a concentraciones bactericidas del antibiótico, pero no son capaces de crecer en presencia del mismo;<sup>357</sup> sin embargo, las subpoblaciones resistentes en el fenómeno de heterorresistencia se caracterizan por tener la capacidad tanto de sobrevivir como de crecer a una concentración antibiótica que inhibe el crecimiento del resto de la población más sensible. Los mecanismos genéticos implicados en la resistencia monoclonal predisponen o capacitan a la célula bacteriana para generar subpoblaciones resistentes en una frecuencia elevada.

Diferentes mecanismos genéticos producen heterorresistencia, pudiendo dar lugar a un fenotipo de tipo estable o inestable, lo que depende principalmente del coste biológico que produzcan para la bacteria (Figura 15). En los casos de heterorresistencia con fenotipo estable, las mutaciones que generan este fenómeno suelen ser a su vez estables genéticamente y además no contribuyen a disminuir el *fitness* bacteriano, manteniéndose así las subpoblaciones resistentes en ausencia de presión antibiótica selectiva.<sup>336</sup> Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de genes que transcriben para bombas de expulsión o la disminución en la expresión génica de porinas, están implicados en la resistencia de subpoblaciones con fenotipo de heterorresistencia estable (Figura 15.A), como en *A. baumannii* heterorresistente a colistina o *P. aeruginosa* heterorresistente a carbapenémicos.<sup>358,359</sup>

Por otro lado, la heterorresistencia de fenotipo inestable se trata de un tipo muy común de heterorresistencia. En trabajos recientes se han identificado dos mecanismos que pueden generar reversibilidad en la resistencia de las subpoblaciones en ausencia de antibiótico. En primer lugar, este fenómeno puede producirse por mutaciones que produzcan resistencia y sean genéticamente estables pero que supongan un alto coste biológico elevado para la bacteria

## INTRODUCCIÓN

(Figura 15.A). Esto provoca que, en ausencia del antibiótico, este alto coste biológico de lugar a la selección de una segunda mutación compensatoria que se produzca una reducción de este coste. Esta reducción del coste biológico normalmente se acompaña de forma concomitante de una pérdida de la resistencia. Esto origina una población bacteriana mixta compuesta por células bacterianas sensibles con fitness aumentado que contiene una mutación de resistencia y una mutación compensatoria, junto con una subpoblación de células resistentes con una mutación que produce alto coste biológico. Esta forma de heterorresistencia de fenotipo inestable se ha descrito en diversos antibióticos como, aminoglucósidos, carbapenémicos o cotrimoxazol.<sup>336,360</sup> En el caso de los aminoglucósidos se ha comprobado que los mutantes resistentes inestables en poblaciones heterorresistentes de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariente Typhimurium se deben a mutaciones en genes que codifican para proteínas encargadas del transporte de electrones como los citocromos o las oxidasas, las cuales se asocian a su vez con el fenotipo variante de colonia pequeña, presentando en ausencia del antibiótico una ralentización del crecimiento. Cuando estas subpoblaciones mutantes resistentes crecen en medio sin antibiótico, aparecen mutaciones compensatorias en genes encargados de la regulación de la respiración aerobia, el catabolismo del carbón o la respuesta al estrés que dan lugar al aumento del *fitness* bacteriano provocando la selección de aquellas sensibles. Esta subpoblación que ha revertido la resistencia posee una mutación que confiere resistencia a aminoglucósidos además de una mutación compensatoria. En estas cepas con mutaciones compensatorias algunas pierden su fenotipo de heterorresistencia al perder la subpoblación de células con sensibilidad disminuida por presentar un menor *fitness* y, sin embargo, otras mantienen el fenotipo heterorresistente. Otros estudios han relacionado el fenómeno de la heterorresistencia de fenotipo inestable con cambios en la expresión de genes debido a alteraciones en los promotores.<sup>360</sup>

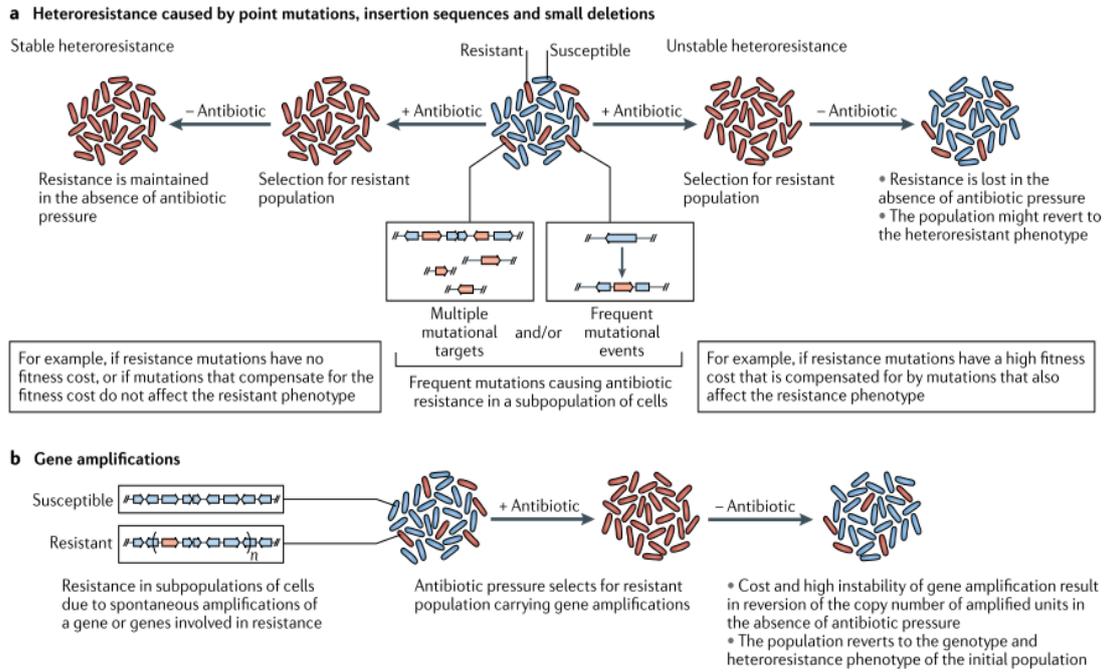
En segundo lugar, la heterorresistencia inestable puede producirse por mutaciones genéticas que implican inestabilidad en sí mismas. Esto es lo que sucede cuando las subpoblaciones resistentes se producen por mutaciones espontáneas que dan lugar a un número aumentado de copias de genes en tándem que confieren resistencia al antibiótico en cuestión (Figura 15.B), como genes que codifican para bombas de expulsión de antibióticos o enzimas que inactivan al antibiótico. Este mecanismo de heterorresistencia se describe recientemente por primera vez, en 2016, para *S. typhimurium* heterorresistente a colistina<sup>361</sup> y se ha visto que se trata del mecanismo más frecuentemente implicado de forma general, en el fenómeno de heterorresistencia en especies bacterianas Gram negativas.<sup>336</sup> La amplificación génica en tándem se produce de forma usual en el cromosoma bacteriano con una frecuencia que varía según la región cromosómica.<sup>362</sup> La forma de producirse suele ser mediante

## INTRODUCCIÓN

recombinación homóloga entre secuencias repetidas como son las secuencias de inserción, los genes codificantes de transposasas o los operones de ARN.<sup>336</sup> Sin embargo, estas secuencias se pierden de forma muy rápida en los procesos de recombinación bacteriana debido a la desigualdad que se produce de la secuencia que presenta estas repeticiones en tándem respecto a la secuencia cromosómica homóloga, produciendo una inestabilidad intrínseca y natural.<sup>363</sup> En este caso, la resistencia se revierte en ausencia de presión antibiótica debido a la inestabilidad propia de este mecanismo a nivel genético, el cual, a su vez produce un alto coste biológico, ya que se ha observado que las células que carecen de este tipo de secuencias génicas repetidas crecen más rápido en comparación con las que las contienen.<sup>362</sup> Este mecanismo se ha demostrado, recientemente, que está implicado en el mecanismo de heterorresistencia al antibiótico piperacilina-tazobactam en *E. coli* debido a un aumento dependiente del antibiótico en el número de copias de la betalactamasa *bla*TEM-1, cuya secuencia génica se encontró ubicada en una unidad de resistencia genómica de 10 kb con múltiples genes de resistencia y elementos genéticos móviles, la cual se repetía en tándem al menos 5 veces dentro de un plásmido cuando las bacterias crecían en presencia del antibiótico.<sup>364</sup> Igualmente, también se ha visto que se encuentra implicado como mecanismo de heterorresistencia a otros antimicrobianos, como los aminoglucósidos.<sup>365</sup>

Nicoloff y colaboradores, en un estudio reciente, han tratado de relacionar este fenómeno de amplificación génica en tándem como el mecanismo general implicado en bacterias Gram negativas en la heterorresistencia a los antibióticos. En este trabajo estudian 4 especies distintas de bacilos Gram negativos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *S. typhimurium*) y analizan la sensibilidad frente a 28 antibióticos distintos. En total se encontró un porcentaje de heterorresistencia del 27,4% de entre todas las combinaciones testadas, del cual, el 88% mostraba fenotipo de heterorresistencia inestable. Un 61% de aquellos que presentaban heterorresistencia inestable se debía a repeticiones de secuencias génicas en tándem. Destacar, que en este trabajo el fenómeno de heterorresistencia se observó en la mayoría de antibióticos que se analizaron, excepto en las quinolonas y la rifampicina. Esto puede explicarse debido a que el mecanismo de resistencia principal frente a estos dos antimicrobianos son las mutaciones puntuales en dianas concretas que codifican para la maquinaria de replicación y síntesis bacteriana, aunque también se describen genes de resistencia presentes en plásmidos que confieren resistencia a quinolonas como son los genes *qnr*.<sup>318</sup> Por lo tanto, en estos antimicrobianos, de forma general, los cambios en los niveles de expresión de un gen debido a repeticiones génicas en tándem como causa de heterorresistencia se trata de un mecanismo menos probable.<sup>336</sup>

## INTRODUCCIÓN



**Figura 15.** Mecanismo de heterorresistencia. **A)** Heterorresistencia causada por mutaciones frecuentes diferentes de las repeticiones genéticas en tándem (mutaciones puntuales, inserciones de secuencias de inserción y pequeñas eliminaciones). Las mutaciones de resistencia con bajo coste biológico van a producir fenotipos de heterorresistencia estable incluso en ausencia de presión selectiva. En cambio, si el coste biológico asociado a la mutación, (la cual es genéticamente estable en sí misma) es elevado, el fenotipo de resistencia puede revertir en ausencia de antibióticos. Se pueden producir mutaciones compensatorias en un segundo paso que aumentan el fitness bacteriano con la consiguiente pérdida de la resistencia, generando una población mixta de células resistentes con bajo fitness (que contienen una mutación de resistencia) y una población principal de células sensibles con fitness aumentado (que contienen una mutación de resistencia y una mutación compensatoria). **B)** Heterorresistencia inestable causada por la inestabilidad intrínseca de la propia mutación de resistencia, como la amplificación de la expresión génica mediante repeticiones genéticas en tándem. En ausencia de presión antibiótica las células revierten al genotipo y fenotipo de heterorresistencia de la célula original.<sup>334</sup>

El estudio y detección de la heterorresistencia, y en particular de la heterorresistencia de tipo inestable, es complejo y difícil de realizar. Simplemente la naturaleza inestable del fenómeno va a aumentar la probabilidad de que no se detecten las subpoblaciones en el laboratorio. Se han demostrado tasas de pérdida de duplicaciones génicas de hasta un 10% por célula bacteriana y por generación, lo que implicaría la pérdida completa en el crecimiento

## INTRODUCCIÓN

y división de una única célula bacteriana hasta formar una UFC en el cultivo directo en medio sin antibiótico.<sup>366</sup>

Por último, se conoce poco acerca de los mecanismos implicados en la heterorresistencia concreta a fosfomicina, principalmente en enterobacterias. En *Streptococcus pneumoniae* se ha asociado la heterorresistencia a fosfomicina con un origen multifactorial en el participa una de las dos copias del gen *murA* (*murA1*) que está presente en esta especie bacteriana.<sup>351</sup> Por otro lado, algunos estudios han demostrado que, mutaciones en el gen *uhpT* en *E. coli*, pueden producir la presencia de subpoblaciones resistentes estables a fosfomicina.<sup>367</sup>

### 6.3. Técnicas de estudio de la heterorresistencia

Los métodos utilizados por los diferentes laboratorios para detección de la heterorresistencia a los antibióticos son muy diversos y heterogéneos. Esto es debido a que en realidad no existe actualmente una metodología estandarizada de los mismos, lo cual origina una barrera a la hora de comparar los resultados entre los distintos trabajos.

En un trabajo muy reciente publicado por Band *et al.* en el que estudian la heterorresistencia mediante el método de análisis de perfil poblacional (cuya metodología será explicada en detalle más adelante en este mismo apartado) en un total de 104 aislados frente a 16 antibióticos utilizando 7 concentraciones diferentes de cada uno, generando un total de 11.648 condiciones de estudio diferentes. Debido a que las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se basan en la mayoría de las ocasiones en técnicas con medio de cultivo líquido que consideran el crecimiento global de toda la población bacteriana, clasificando a los aislados como resistentes o sensibles, pero carecen de capacidad para diferenciar a aquellos aislados heterorresistentes. Esto justifica las discrepancias observadas en el siguiente estudio, en el que observaron que en un 64% de las combinaciones de aislado-antibiótico se clasificaron como resistentes, mediante un sistema comercial (VITEK) o tiras de gradiente, y el 36% como sensibles. Sin embargo, al realizar el análisis de perfil poblacional, se observó que hasta un 21,4% de las combinaciones microorganismo-antibiótico eran realmente heterorresistentes. Hasta un 23,3% de las interacciones clasificadas como resistentes por los métodos realizados por VITEK o tiras de gradiente, y el 17,5% de las sensibles, en realidad eran bacterias heteroresistentes.<sup>343</sup> Estos resultados podrían explicar los encontrados en estudios previos sobre la implicación de los diferentes inóculos bacterianos según los métodos de estudio de sensibilidad y la variación en la interpretación de los resultados en base a la presencia de subpoblaciones resistentes.<sup>368</sup> Se pone de manifiesto la heterogeneidad de los resultados de los estudios de sensibilidad en base a los diferentes métodos, así como la dependencia de los mismos de la cantidad preexistente de subpoblaciones resistentes en la población general. Dependiendo del método, el inóculo de

## INTRODUCCIÓN

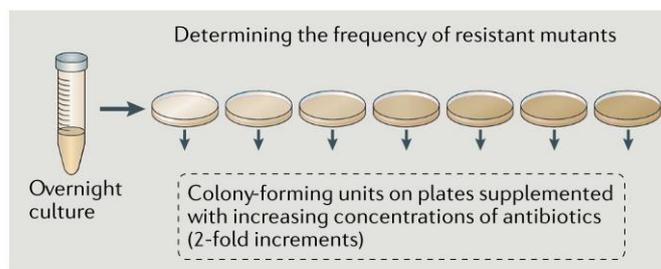
subpoblaciones resistentes presente en la población bacteriana puede influir en la categorización clínica final, así como en la clasificación de la combinación microorganismo-antibiótico como heterorresistente dependiendo de la sensibilidad de la técnica utilizada.

A continuación, se describen los principales métodos para detección de la heterorresistencia.

### **Análisis del perfil poblacional (*population analysis profile/PAP*)**

Este método se considera el método de referencia para estudio de la heterorresistencia a los antibióticos. En este método, la población bacteriana se somete a un gradiente de concentraciones de antibióticos, pudiendo realizarse tanto en agar como en medio líquido, para posteriormente cuantificar el crecimiento del bacteriano a cada una de esas concentraciones. De forma habitual, se utilizan concentraciones incrementadas al doble de los antibióticos al igual que en los estudios de CMI, aunque no todos los trabajos siguen esta norma.<sup>369</sup>

Para llevar a cabo este método, se utiliza un inóculo bacteriano con un número definido de células que se extiende sobre la superficie de agar con distintas concentraciones de antibiótico. Tras 24 horas, se procede a contabilizar el número de UFC que han crecido en la superficie, teniendo en cuenta a la concentración del antibiótico en la que han sobrevivido (Figura 16).



**Figura 16.** Representación esquemática del método de PAP realizado en agar con incrementos de concentración antibiótica al doble.<sup>334</sup>

Es muy importante definir el inóculo inicial del ensayo para determinar la heterorresistencia debido al posible efecto inóculo. Este efecto se define el incremento de la CMI a un antimicrobiano debido a la elevada densidad de células bacterianas presentes en el inóculo inicial.<sup>370</sup> Sin embargo, no existe un inóculo estandarizado para esta técnica, utilizándose en la mayoría de estudios inóculos que varían entre  $10^2$  y  $10^8$  bacterias totales. Por otro lado, la falta de estandarización en la definición de las concentraciones que se deben utilizar para definir

## INTRODUCCIÓN

la presencia de una población bacteriana heterorresistente, da lugar a resultados que pueden ser contradictorios. En este sentido puede cambiar la clasificación de un aislado como heterorresistente o como no heterorresistente dependiendo del gradiente de concentraciones que se utilice. No se obtendrán los mismos resultados en el caso de utilizar gradientes más estrechos, por ejemplo, de 0,1 mg/L, que, con gradientes más amplios, de 1 mg/L.<sup>333</sup> Algunos estudios utilizan para definir la heterorresistencia cuando las subpoblaciones son capaces de crecer al menos en concentraciones 8 veces superiores a la concentración máxima del antibiótico que no afecta al crecimiento de la población bacteriana sensible, utilizando incrementos al doble de la concentración.<sup>371</sup>

En definitiva, aunque se trate del método de referencia, carece de una normativa estandarizada que determine un consenso científico del método (inóculo, concentraciones antibióticas, incrementos de concentraciones) y la interpretación de los resultados. Además, se trata de una técnica tediosa y compleja que difícilmente se puede llevar a cabo en la práctica diaria de los laboratorios de Microbiología Clínica.

### Análisis del perfil poblacional en relación con el área bajo la curva (PAP-AUC)

Se trata de una modificación del PAP, la cual es el método de referencia para la determinación concreta de SAIVh. En este método se realiza el ensayo de PAP tal y como se ha explicado anteriormente y se calcula el AUC para cada curva (bacterias viables en relación con la concentración antibiótica) que se obtiene en el ensayo de PAP. Estos valores obtenidos del AUC se comparan siempre con los PAP-AUC obtenidos con una cepa de referencia de *S. aureus*. Los resultados clasifican a los aislados en estudio como sensibles si la proporción es menor de 0,9, como heterorresistentes si esa proporción está entre 0,9 y 1,3, y como resistente si es superior a 1,3.<sup>372</sup>

### **Ensayos de disco-difusión y tiras de gradiente**

El método para realizar esta técnica no difiere del explicado previamente en el apartado 4.6, sobre técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. En este caso se considerarían como heterorresistentes aquellos aislados que presentan subpoblaciones que crecen dentro del halo o elipse de inhibición; sin embargo, muchos estudios establecen puntos de corte de diámetro de halo o de concentraciones para definir a un aislado como heterorresistente cuando realmente no existe ningún tipo de estandarización al respecto.<sup>333</sup>

El inconveniente de este método es que la detección de las subpoblaciones va a depender del tamaño del halo o elipse de inhibición. La limitación de detección del método va a depender por lo tanto de cuánto de resistente sea la población mayoritaria al antimicrobiano, a

## INTRODUCCIÓN

menor sensibilidad, menor área de inhibición; y de la cantidad o proporción de subpoblaciones, la detección de las subpoblaciones en la zona de inhibición estará más limitada a menor número de las mismas. Existen variaciones de la técnica en las que se utilizan inóculos bacterianos más elevados para aumentar la sensibilidad de detección e incluso se han desarrollado tiras especiales para el estudio de la heterorresistencia a los glucopéptidos (GRD Etest).<sup>333,336</sup> Este método no permite determinar la frecuencia exacta de aparición de las subpoblaciones ni tampoco sus valores de CMI.

### **Dilución en agar**

Este método se realiza como se ha explicado previamente en el apartado 4.6 sobre técnicas de estudio de sensibilidad. En el estudio de subpoblaciones heterorresistentes existe una desventaja, y es que, su escaso inóculo bacteriano depositado en único un punto de la superficie del agar tiene una alta probabilidad de no detectar las subpoblaciones presentes a una baja frecuencia, tratándose de una técnica con sensibilidad reducida. Con este método se pueden realizar cálculos sobre la frecuencia y valores de CMI de las subpoblaciones, aunque estos resultados podrían estar infraestimados.

Otro método es el resultante de utilizar la dilución en agar a una concentración fija como técnica de cribado de subpoblaciones resistentes al antimicrobiano. Se ha comprobado que tiene excelente correlación con el método de referencia para estudio de SAIVh. En este caso no se pueden obtener datos directos de frecuencia y CMI de las subpoblaciones.<sup>373</sup>

### **Otras técnicas para estudio de la heterorresistencia**

Existen otras técnicas que se usan con menor frecuencia para el estudio concreto de la heterorresistencia. Una de ellas es la citometría de flujo que, entre sus diversas aplicaciones, puede servir para detección de subpoblaciones resistentes mediante el uso de marcadores fluorescentes dirigidos a detectar mecanismo de resistencia concretos.<sup>374</sup> También permite el estudio de subpoblaciones resistentes los ensayos mediante curvas de tiempo-muerte, en el que las subpoblaciones se van a identificar por crecer de forma más retrasada en el medio con antibiótico tras una reducción significativa del inóculo en las primeras horas del ensayo.<sup>346</sup> Otra forma indirecta que puede indicar la presencia de un posible fenómeno de heterorresistencia en una población bacteriana es el incremento de la CMI a un antibiótico tras un aumento del tiempo de incubación del aislado previo a realizar el antibiograma.<sup>375</sup> Ambos métodos se basan en aumentar el tiempo para permitir el crecimiento de las subpoblaciones minoritarias resistentes para que éstas crezcan por encima de los límites de detección.

## INTRODUCCIÓN

Además, mediante técnicas de microdilución se puede intuir la presencia de heterorresistencia mediante el crecimiento de subpoblaciones resistentes que se observan tras pocillos salteados sin turbidez. Existen estudios que han confirmado la relación de este fenómeno con la heterorresistencia con estudios posteriores de PAP.<sup>376</sup> En general este método en presencia de una subpoblación resistente, la lectura de la CMI va a depender en gran medida del inóculo bacteriano y de la tasa de crecimiento de la subpoblación bacteriana resistente.

Existen técnicas comerciales automatizadas o semiautomatizadas, mediante técnicas moleculares dirigidas exclusivamente a la detección de subpoblaciones heterorresistentes en especies bacterianas concretas como *M. tuberculosis* o *H. pylori*.<sup>377,378</sup> El problema de estos últimos es que se basan en la detección de mutaciones concretas presentes en un sistema cerrado. Por lo tanto, aquellas dianas moleculares ausentes en el sistema que causen resistencia fenotípica al antibiótico no serán detectadas en las subpoblaciones, dando lugar a falsos negativos. Por otro lado, estos métodos cuentan con la ventaja de ser más rápidos en comparación con los métodos fenotípicos en este tipo de microorganismos de crecimiento lento y pueden detectar hasta un 5% de bacterias resistentes, dependiendo de la mutación de resistencia y de la tecnología utilizada y a veces se pueden utilizar sobre muestra directa.

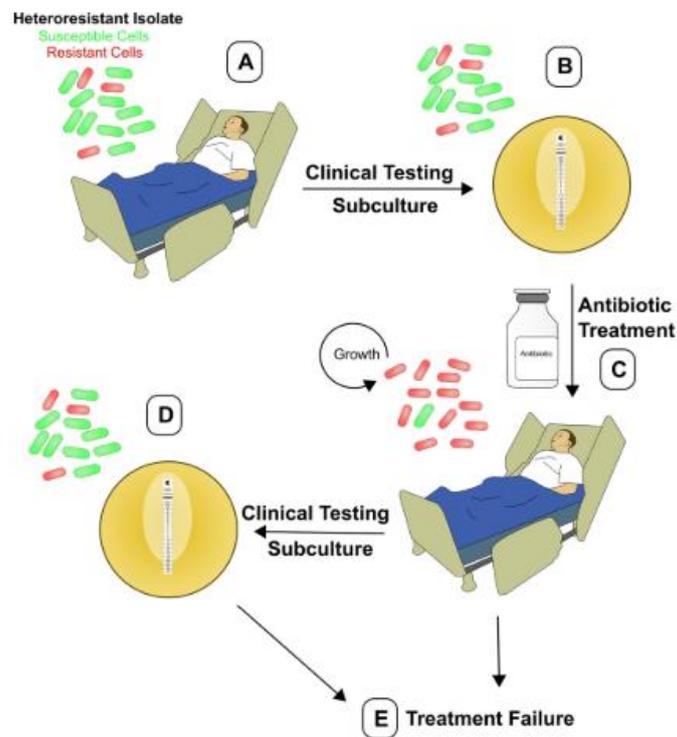
Muchas de las tecnologías que se encuentran en desarrollo actualmente para el estudio de heterorresistencia antibiótica se basan en métodos moleculares. Los estudios basados en la secuenciación del genoma completo parecen prometedores en el estudio de este fenómeno; sin embargo, el manejo e interpretación de los resultados puede llegar a ser extremadamente complejo cuando se trata de subpoblaciones presentes en baja proporción con tasas inferiores al 1%.<sup>379</sup> La PCR digital en gotas es otra técnica que divide una sola reacción de PCR en 20.000 gotas, lo que permite una mayor sensibilidad para detectar dianas poco comunes y una cuantificación absoluta mediante el análisis de la frecuencia de las gotas positivas. Además, aumenta la tolerancia de los inhibidores de la reacción y mejora así la sensibilidad del ensayo.<sup>380</sup>

### **6.4. Implicaciones en el éxito o fracaso terapéutico**

Como se ha mencionado anteriormente, la detección de la heterorresistencia mediante pruebas convencionales de sensibilidad a los antibióticos varía mucho en función del método utilizado. El método de referencia es el PAP, el cual es tedioso, complejo y carece de estandarización, lo que da lugar a que la detección de la heterorresistencia en el laboratorio clínico sea difícil de realizar, además de dificultar las comparaciones de los resultados entre los distintos estudios. Asimismo, la diferencia en la sensibilidad de los métodos para detectar subpoblaciones resistentes, la heterorresistencia de fenotipo inestable o el ignorar estas

## INTRODUCCIÓN

subpoblaciones en la interpretación del resultado, puede dar lugar a clasificaciones erróneas de la sensibilidad de los aislados y/o a fracaso terapéutico (Figura 17).



**Figura 17.** Esquema de la dinámica de la heterorresistencia durante la infección y las pruebas de sensibilidad clínica. **A)** Esquema de paciente infectado con un aislado bacteriano heterorresistente con subpoblación minoritaria de células resistentes a los antibióticos (en rojo) y otra mayoritaria sensible (en verde). **B)** Clasificación del aislado como sensible por causas técnicas, de interpretación del resultado o por fenotipo inestable de heterorresistencia. **C)** Selección de subpoblación resistente por el tratamiento antibiótico. **D)** De nuevo sucede lo explicado en el punto B. **E)** Fracaso del tratamiento por incapacidad para eliminar la infección en base a un tratamiento dirigido clasificado como sensible.<sup>381</sup>

Cada vez existen evidencias que avalan que la presencia de heterorresistencia en una población bacteriana puede dar lugar al fracaso terapéutico. Algunos de los estudios están basados en trabajos sobre modelos *in vivo* con animales de experimentación. Band y colaboradores realizaron recientemente dos estudios sobre un modelo murino donde se comparó la respuesta al tratamiento en monoterapia con colistina en infecciones por enterobacterias heterorresistentes frente a infecciones por enterobacterias sensibles. En ambos mostraron, que el tratamiento con colistina fue efectivo frente a la infección por cepas heterorresistentes; sin embargo, sí fue eficaz en el tratamiento de la infección por bacterias

## INTRODUCCIÓN

sensibles. Adicionalmente, en ambos estudios observaron, que la frecuencia de subpoblaciones resistentes a colistina fue superior en el modelo *in vivo* en ausencia de tratamiento antibiótico, en comparación con los ensayos *in vitro* mediante PAP; denotando cierta limitación de la técnica *in vitro*. Esto se justificó por un aumento del péptido antimicrobiano humano LL-37 en el ratón infectado. Esta molécula forma parte de la respuesta del sistema inmune innato y se ha relacionado con la capacidad de producir resistencia a la colistina. El mecanismo subyacente que realmente produce el fenotipo de heterorresistencia a colistina se desconoce. Lo que sí se ha demostrado es que la resistencia a este antibiótico se debe a la expresión y regulación de sistemas de dos componentes que regulan la expresión a su vez de enzimas modificadoras del lípido A, las cuales disminuyen la permeabilidad de la membrana bacteriana al antibiótico aumentando las cargas positivas en el lípido A.<sup>382,383</sup> Del mismo modo, se han observado resultados de fracaso terapéutico en diferentes modelos de infección animal por *S. aureus* heterorresistente a glucopéptidos.<sup>384,385</sup>

Por otro lado, los modelos *in vitro* de FC/FD también han ayudado a predecir la posible respuesta de aislados con fenotipo de heterorresistencia al tratamiento antibiótico. Ejemplo de ello es un trabajo realizado utilizando este tipo de modelos con *A. baumannii* heterorresistente a colistina en el cual se estudiaron diferentes dosificaciones, que fueron incapaces de erradicar las subpoblaciones resistentes.<sup>386</sup> En el trabajo de Nicoloff y colaboradores utilizan un modelo predictivo matemático en el que consideran, que la infección por patógenos heterorresistentes daría lugar probablemente al fracaso del terapéutico en el caso de que el antibiótico fuese el único mecanismo que se tuviera en cuenta para el control de la infección.<sup>336</sup>

En otro trabajo recientemente publicado por Abbott y colaboradores, han comprobado mediante un modelo dinámico *in vitro* de infección vesical, en el que simulan el perfil farmacodinámico, a fin de evaluar la exposición a alta y baja concentración de fosfomicina oral tras tratamiento con una única dosis o triple dosificación separadas por diferentes intervalos de tiempo (24, 48 o 72 horas) frente a 16 aislados clínicos de enterobacterias (8 *E. coli*, 4 *E. cloacae* y 4 *K. pneumoniae*) con diferentes CMI a fosfomicina. Observaron que, independientemente de la concentración de fosfomicina urinaria utilizada en el modelo *in vitro*, los aislados que sobrevivieron fueron los mismos. En este estudio, no sobrevivió ningún aislado con CMI inferior a 1mg/L; sin embargo, los aislados con CMI superiores tuvieron un comportamiento que varió en función de la presencia de subpoblaciones resistentes de alto nivel a fosfomicina presentes en la población bacteriana previamente a la exposición antibiótica. Además, todos los aislados de *K. pneumoniae* sobrevivieron bajo las diferentes concentraciones de fosfomicina utilizadas, independientemente de su CMI de fosfomicina (rango de valores de

## INTRODUCCIÓN

CMI: 2-16 mg/L). Con estos resultados, los autores concluyen que los factores que parecen predecir la supervivencia de los microorganismos bajo tratamiento oral con fosfomicina son la presencia de heterorresistencia con subpoblaciones resistentes de alto nivel en la población general, así como la influencia de un tipo de especie concreto, en este caso, *K. pneumoniae*. Por último, no observaron un beneficio a favor de la triple terapia en comparación con la dosis única en la erradicación bacteriana en la mayoría de los aislados estudiados.<sup>387</sup>

Existen a su vez estudios *in vivo* sobre la respuesta clínica de infecciones por aislados heterorresistentes realizados en pacientes. Varios de ellos han relacionado las infecciones por SAIvH y *A. baumannii* heterorresistente a carbapenémicos, con una mayor mortalidad, aumento de las complicaciones clínicas y de la estancia hospitalaria, así como con la presencia de bacteriemia persistente.<sup>388-390</sup> El fracaso al tratamiento antibiótico se ha demostrado también en estudios retrospectivos sobre infecciones causadas por aislados de *S. aureus* y *S. epidermidis* heterorresistentes a vancomicina y de *A. baumannii* heterorresistentes a colistina y carbapenémicos.<sup>391-394</sup> Sin embargo, otros estudios sobre infecciones por SAIvH y *A. baumannii* heterorresistente no han encontrado ninguna relación entre la heterorresistencia y el fracaso terapéutico.<sup>395,396</sup> Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar más estudios que aclaren la verdadera implicación de las subpoblaciones con sensibilidad disminuida en la efectividad del tratamiento antibiótico. Por todo ello, es de especial importancia conocer la importancia de este “mosaicismo” de sensibilidad en la población bacteriana, para así poder realizar la elección del tratamiento adecuado.

### 6.5. Heterorresistencia y el posible papel de la hipermutación

Existen estudios que han demostrado el importante papel de la mutación en la adaptación de las bacterias al medio, aportándole así una serie de ventajas selectivas.<sup>397</sup> En 1996, LeClerc y colaboradores publicaron un estudio cuyos resultados informan de la presencia de una alta frecuencia de mutación entre patógenos bacterianos comunes.<sup>398</sup> Estos hallazgos demostraron, que las bacterias pueden responder a la selección ambiental gracias a modificaciones en su ADN, favorecido por elevadas frecuencias de mutación o por la propia recombinación genética, que aportan cambios en la célula bacteriana que le permitan sobrevivir. Las bacterias pueden disfrutar de forma temporal de frecuencias de mutación elevadas protegiéndose a su vez de la acumulación de mutaciones deletéreas que puedan comprometer su supervivencia. Una forma que tiene la bacteria para lograr este estado de mutador de forma transitoria es mediante la disminución de las proteínas que forman parte del sistema de reparación directo del ADN. En un estudio realizado en 1999 utilizando un modelo matemático,

## INTRODUCCIÓN

se describe cómo el estado de hipermutador transitorio juega un papel importante en la adaptación de *E. coli* al medio.<sup>399</sup>

La vinculación del fenotipo de heterorresistencia con diferentes mecanismos moleculares, como la amplificación génica en tándem, podría verse favorecido por un estado de la bacteria de predisposición para adquirir cambios genéticos; es decir, por un estado de hipermutabilidad.<sup>334,336</sup>

### **Definición de aislados mutadores o hipermutadores**

En los últimos años, y particularmente en los estudios que se utilizan aislados clínicos, se adopta el término de hipermutadores a los aislados que presentan un fenotipo con una elevada frecuencia de mutación. Previamente, los genes que dan lugar a aislados con un fenotipo de tasa de mutación elevada se han denominado *mut*, cuya etimología reside en el término anglosajón “*mutator*” (mutantes), y a los aislados portadores de estos genes se les ha designado como aislados mutadores. Hoy en día estos dos términos, hipermutadores o mutadores, se utilizan indistintamente en los estudios científicos.

Según los estudios, existen dos estrategias diferentes para definir a un aislado como hipermutador. Por un lado, se puede definir como aquellos aislados que se encuentran fuera de la distribución normal de las frecuencias de mutación para un conjunto de aislados de la misma especie, lo cual se debe llevar a cabo estudiando un gran número de aislados. Richardson y colaboradores estudiaron 95 aislados de *Neisseria meningitidis* y observaron que las frecuencias de mutantes se separaban en dos grupos distintos con medias de  $2,6 \times 10^{-9}$  y  $2,3 \times 10^{-8}$  mutantes resistentes a rifampicina/UFC.<sup>400</sup> Demostraron en algunos de los aislados del grupo considerado como hipermutadores, que al ser complementados con los genes funcionales *mutS* o *mutL*, su frecuencia de mutantes disminuía. En otro estudio realizado en aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística dividen a la población bacteriana en dos grupos, un grupo considerado como población normal, con una frecuencia media de mutantes resistentes a rifampicina de  $2,9 \times 10^{-8}$ , y otro considerado como aislados hipermutadores, con una frecuencia media de aislados resistentes a rifampicina de  $3,6 \times 10^{-6}$ . De nuevo, en este estudio se comprobó que al incorporar *mutS* en algunos aislados del grupo considerado como mutantes, el fenotipo hipermutador de los aislados disminuía, lo que daba peso a los resultados del estudio.<sup>401</sup>

Por otro lado, la estrategia alternativa consiste en definir como hipermutadores a aquellos aislados cuya frecuencia de aparición de mutantes sea superior a un valor de corte determinado. Se definen como aislados hipermutadores por ejemplo, aquellos que superan x10 o x50 la frecuencia de aparición de mutantes de una cepa control; o se utiliza un valor absoluto,

## INTRODUCCIÓN

como por ejemplo, aquellos aislados con frecuencia de aparición de mutantes superiores a  $10^{-7}$ .<sup>402</sup>

En conclusión, no existe una definición consensuada para clasificar a un aislado clínico como hipermutador. Además, se ha comprobado, que los defectos de los genes del sistema de reparación del ADN difieren en la frecuencia de aparición de mutantes según la especie, por lo tanto, tampoco parece viable establecer una interpretación y metodología general en el estudio de los aislados.<sup>402</sup>

### **Mecanismos moleculares implicados en la hipermutación bacteriana**

Las proteínas implicadas en la vía de reparación del ADN por errores en la secuencia de nucleótidos durante la replicación bacteriana van a ayudar a sustituir los nucleótidos introducidos erróneamente, además de dificultar la recombinación entre las secuencias de ADN que no son exactamente iguales. Las deficiencias en cualquiera de los mecanismos de reparación de este sistema pueden dar lugar a un fenotipo bacteriano hipermutador.

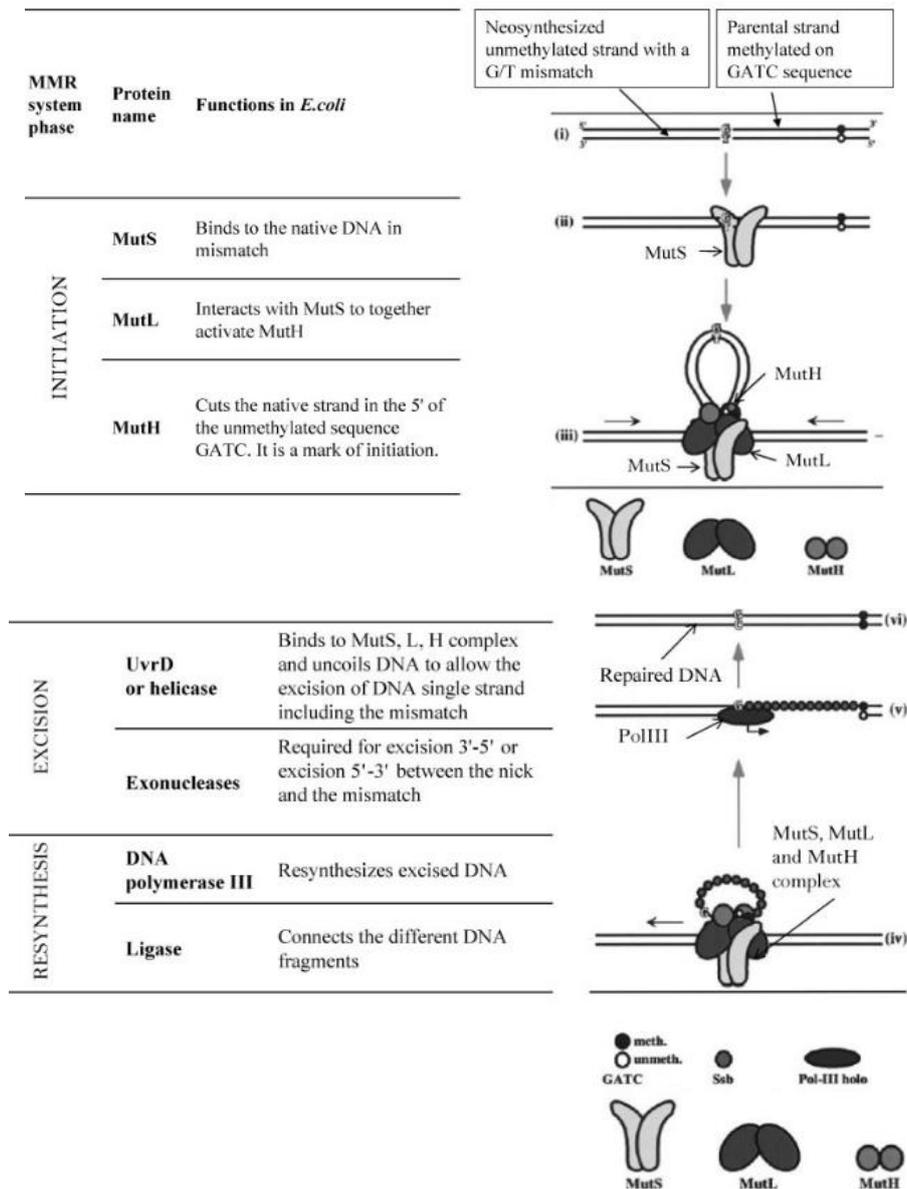
#### Sistemas de reparación del ADN bacteriano

Sistema de reparación de errores del ADN por reconocimiento de la cadena metilada por emparejamiento erróneo (*methyl-directed mismatch repair o MDMMR system*)

La mayoría de las bacterias hipermutadoras que presentan elevadas frecuencias de mutación se producen por defectos naturales en el sistema de proteínas de reparación de emparejamiento erróneo de bases del ADN mediante metilación directa (Figura 18). Se trata de un sistema de reparación que reconoce y repara los errores que se producen durante la replicación, como las inserciones, las deleciones o los emparejamientos erróneos de las bases. En *E. coli*, la deoxiadenina metil-transferasa (Dam) es uno de los enzimas principales que contribuye en la función de este sistema de reparación. Se encarga de transferir un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina para crear una N6-metiladenina de las secuencias GATC, lo que va a permitir discernir la hebra de nueva creación de la hebra molde. La metilación del ADN lleva cierto desfase respecto a la actividad bacteriana replicativa lo que permite reconocer a la hebra no metilada como la cadena de nueva generación portadora del error.<sup>403</sup>

En *E. coli*, las proteínas que forman parte del sistema MDMMR son: *mutS*, *mutH*, *mutL* y *mutU (uvrD)*.<sup>404</sup> El gen *mutS* se describió por primera vez en 1967 en un aislado de *E. coli* que presentaba un fenotipo hipermutador con resistencia al agente antibiótico azaserina debido a la deleción de este gen.<sup>405</sup>

## INTRODUCCIÓN

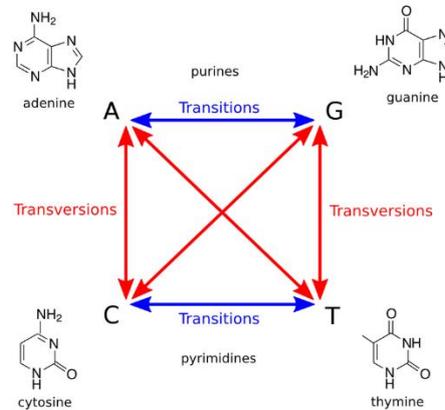


**Figura 18.** Sistema MDMMR Mecanismo de reparación del ADN. El inicio de la reparación de errores en la unión de los nucleótidos requiere de MutS, MutL y MutH. MutS y MutL son ATPasas diméricas: MutS reconoce el error, se une en esa zona del ADN (ii) y recluta a MutL, que se une formando un complejo junto con MutS. La endonucleasa MutH es la encargada de catalizar la ruptura endonucleotídica en la cadena de ADN no metilada en una zona cercana al error (iii, iv). La ADN helicasa II (UvrD) inicia el desenrollamiento del ADN de doble cadena de los extremos romos dónde se ha realizado el corte de la hebra no metilada y la holoenzima ADN polimerasa III cataliza la reparación (v, vi).<sup>406</sup>

Las bacterias mutantes que carecen de cualquiera de estos cuatro componentes específicos del sistema de reparación de emparejamiento erróneo de bases (*mutH*, *mutL*, *mutS* o *uvrD*); se describen como mutantes fuertes que inducen las mutaciones de transición (Figura

## INTRODUCCIÓN

19), así como los cambios puntuales del marco de lectura (inserciones y deleciones). Se describen aumentos de 100 a 1000 veces, dependiendo del sistema y del sitio específico de la mutación.<sup>407</sup>



**Figura 19.** Esquema de tipos de mutación puntual por cambio de bases. Mutación de transición (flechas azules): sustitución de una base pirimidínica por otra pirimidínica (por ejemplo, de C a T) o de una púrica por otra púrica (por ejemplo, de G a A). Mutación de transversión (flechas rojas): La sustitución de una base púrica por una pirimidínica (por ejemplo, de G a T) o viceversa (por ejemplo, de C a A).

Debido al importante papel de la proteína Dam en la replicación del ADN bacteriano, concretamente en la regulación de la expresión génica y en la metilación del ADN para la discriminación de las cadenas en el reconocimiento de errores por emparejamiento erróneo de bases, se ha visto que cepas de *H. influenzae* deficientes en esta proteína son hipersensibles a la acción de agentes que dañan el ADN, como por ejemplo a las especies reactivas de oxígeno.<sup>408</sup> También se ha comprobado que la inactivación de esta proteína por inserción génica da lugar a fenotipos hipermutadores en *Pasteurella multocida*.<sup>409</sup> En *E. coli* se ha observado, que se puede producir un fenotipo hipermutador debido a la hiperproducción de este enzima por alteraciones en el funcionamiento correcto del sistema MDMMR.<sup>410</sup>

### Actividad ADN polimerasa III

En *E. coli*, la ADN polimerasa III es responsable de duplicación del cromosoma para la replicación celular. Se trata de un complejo holoenzima compuesto por 18 proteínas, en las que se incluyen las subunidades alfa (*dnaE*) y épsilon (*dnaQ*). Se presenta como un dímero asimétrico con un monómero para la replicación de la hebra principal y otro para la hebra secundaria. Una vez cada aproximadamente 10 000 inserciones de nucleótidos, se produce un

## INTRODUCCIÓN

error que da lugar a un emparejamiento erróneo de un par de bases (por ejemplo, produce un desajuste combinando una citosina con una adenina (C-A)). La holoenzima por sí sola no es capaz de reconocer ese error en el ajuste de las bases y se pueden producir tres situaciones diferentes. Por un lado, puede eliminar la base mal emparejada de la nueva cadena de ADN (lo que se conoce como corrección exonucleolítica), insertar el nucleótido correcto y continuar con la extensión de la cadena de ADN. En segundo lugar, la holoenzima puede separarse de la hebra molde y volver a unirse intentando de nuevo la unión de una base correcta. La última opción es que el holoenzima continúe la replicación sin tener en cuenta el error en el emparejamiento de bases que en caso de no repararse en un segundo paso por el sistema MDMMR dará lugar a una mutación en la siguiente generación bacteriana.

Se ha descrito mutaciones en el gen *dnaE*, el cual codifica para la subunidad alfa de la polimerasa III, que aumentan o disminuyen la mutagénesis espontánea, dando lugar a un fenotipo hipermutador o antimutador, respectivamente. Esta subunidad es importante para que la subunidad épsilon lleve a cabo su función de forma óptima, ya que se han descrito mutaciones en el gen *dnaE* que perjudican la actividad en la corrección del emparejamiento erróneo de bases por el holoenzima.<sup>411</sup> Sin embargo, aunque ambas subunidades son necesarias son necesarias para el desarrollo de la actividad correctora de la exonucleasa de forma óptima, la acción principal la lleva a cabo la subunidad épsilon, la cual se codifica en el alelo *mutD5* (alelo dominante de *dnaQ*). Defectos en este sistema dan lugar a un aumento de la proporción de mutaciones de transversión en relación con las transiciones; sin embargo, los defectos en el sistema MDMMR tienen el efecto contrario a favor de las mutaciones de transición. Esto sugiere que la acción exonucleasa tiene preferencia por la corrección de errores de transversión, mientras que el sistema de MDMMR tiene una mayor afinidad por la corrección de errores de tipo transición y los desplazamientos simples del marco de lectura (deleciones e inserciones).<sup>412</sup>

Las mutaciones en el gen *dnaQ* (responsable de la síntesis de proteína MutD o DnaQ) van a dar lugar a una disfunción en la corrección de los errores que conduce a un fenotipo mutante. Además, hay estudios que demuestran una disminución en la tasa de crecimiento bacteriano de estos mutantes. Durante el crecimiento, los mutantes con defectos en *dnaQ* presentan numerosos errores de replicación que no se corrigen, de manera que el sistema MDMMR, que normalmente repara estos errores en un segundo paso, se sobrecarga y no es capaz de corregirlos todos. Así pues, el fuerte fenotipo mutante de las bacterias que carecen del gen *dnaQ* es esencialmente consecuencia de una acción defectiva en ambos sistemas de corrección, la actividad exonucleasa de DnaQ junto con defectos en la actividad óptima del sistema MDMMR.<sup>413</sup>

## INTRODUCCIÓN

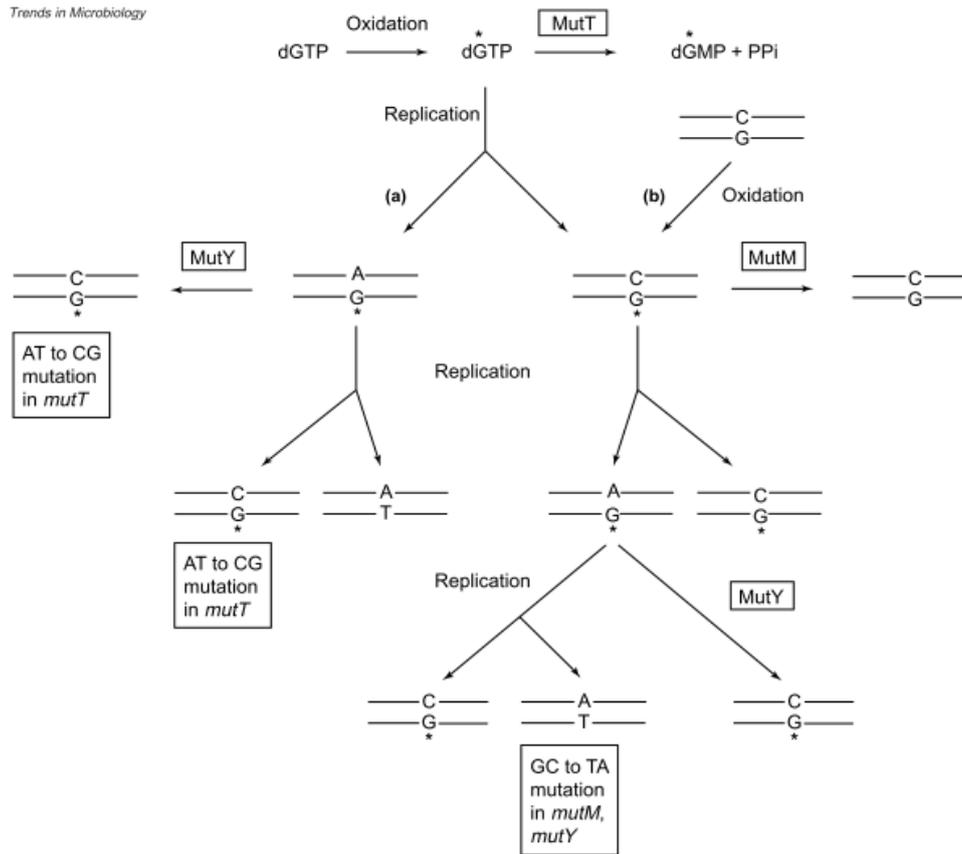
### *Sistema de reparación específico de residuos de guanina oxidados*

Otro sistema de reparación del ADN es el formado por las proteínas encargadas de eliminar el daño del ADN producido por estrés oxidativo, el cual se basa en la detección y eliminación de residuos de guanina oxidados, y cuyas alteraciones genéticas se han relacionado también con incrementos en la frecuencia de mutación. Los residuos de guanina oxidados pueden aparecer en el ADN de doble cadena, así como en las moléculas precursoras. La 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxoG) es una lesión oxidativa ubicua y altamente estable del ADN que se encuentra en todos los organismos, incluyendo en las bacterias. En este sistema participan las proteínas MutY, MutM y MutT, encargadas de la escisión de los nucleótidos oxidados, así como la proteína que cataliza la actividad de exonucleasa de 3' a 5' para corregir los errores, MutD o DnaQ (subunidad épsilon de la ADN polimerasa III). MutY es una glicosilasa que cataliza la eliminación de la adenosina no dañada cuando se empareja con la forma dañada de la guanina (8-oxoG), por lo que MutY previene las mutaciones deletéreas por transversión de bases (Figura 20) de tipo G:C a T:A. MutM, también conocida como Fpg o formamidopirimidina glicosilasa, es una glicosilasa de ADN que tiene preferencia por la eliminación de 8-oxoG de las uniones de 8-oxoG:C sobre las uniones 8-oxoG:A. Esto es importante para el funcionamiento correcto de este sistema, ya que será MutY el encargado de eliminar en un segundo paso los residuos de adenina de las uniones 8-oxoG:A. En ausencia tanto de MutM como de MutY, se ha observado aumentos de la frecuencia de la transversión de bases CG por AT, detectándose una frecuencia mucho más baja en las células que carecen solo de una de las dos proteínas. Los experimentos genéticos han demostrado que la sobreproducción de MutM puede compensar la elevada frecuencia de mutación en cepas carentes de MutY, lo que indica que la acción de MutM es previa a la de MutY.<sup>414</sup>

Por otro lado, la proteína MutT se encarga de hidrolizar el 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosin-trifosfato (8-oxo-dGTP) y el 8-oxo-7,8-dihidroguanosin-trifosfato (8-oxo-GTP) a la forma de monofosfato, evitando así la incorporación errónea de los nucleótidos mutagénicos en el ADN y el ARNm durante la replicación y la transcripción. En ausencia de esta proteína, se produce la incorporación errónea de 8-oxo-dGTP frente a una base de adenina formando una unión 8-oxoG-A, que por un lado puede ser reparado por la acción de MutY eliminando la base adenina o bien en la replicación da lugar a 8-oxoG-C. En consecuencia, la ausencia del gen *mutT* aumenta la aparición espontánea de transversiones de bases A:T por C:G.<sup>415,416</sup>

Se describen como mutantes débiles aquellas cepas con delección del gen *mutM*, como mutantes moderados aquellas con delección de *mutY* y como fuertes aquellos con delección del gen *mutT* o aquellas que son mutantes dobles *mutM-mutY*.<sup>417</sup>

## INTRODUCCIÓN



**Figura 20.** Esquema del sistema de reparación del ADN de la oxidación de las guaninas y de la implicación de las mutaciones en los genes que codifican para cada uno de los componentes (*mutM*, *mutT* y *mutY*).<sup>414</sup>

Por otro lado, se ha descrito que los mutantes de *E. coli* para el gen *miaA*, muestran un aumento de 3 a 9 veces en el número de transversiones de GC a TA en situación de escasez de nutrientes. Esta proteína produce una modificación necesaria para la unión eficiente del ARNT a los ribosomas y es importante para prevenir desplazamientos en el marco de lectura y otras mutaciones. Se ha sugerido que puede tener una posible implicación en la generación o reparación de residuos de guanina oxidados.<sup>418,419</sup>

### *Superóxido dismutasas (SOD)*

Todos los organismos de crecimiento aeróbico también tienen que hacer frente a los efectos secundarios tóxicos del oxígeno, como la producción de radicales libres. El radical anión superóxido es un producto temprano de la reducción de oxígeno. En un paso posterior, puede convertirse en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y oxígeno en un paso que es catalizado por las enzimas superóxido dismutasas (SOD). En *E. coli*, se conocen tres enzimas SOD, y la mutación en dos de los genes

## INTRODUCCIÓN

que los codifican (*sodA* y *sodB*) resulta en un fenotipo mutante. Se ha comprobado que la inactivación del gen *sodA* incrementa la tasa de mutación bacteriana hasta en 8 veces, y hasta 41 veces superior para el doble mutante *sodA-sodB*, pero no ocurre así lo mismo con el mutante simple *sodB*. Además, este aumento de la frecuencia de mutación en los mutantes *sodA* y *sodA-sodB* se ha visto que es dependiente de las condiciones de aerobiosis y de la actividad de la exonucleasa III planteando que el aumento del flujo de radicales superóxido en esta bacteria produce lesiones en la molécula de ADN sobre las que puede actuar esta enzima resultando finalmente en un mayor número de mutaciones.<sup>420</sup>

Por otro lado, el  $H_2O_2$  producido por la SOD se regula en el interior celular por la acción de una serie de proteínas entre las cuales se encuentra OxyR. Ésta se trata de una proteína reguladora del estrés oxidativo que asegura la presencia de una concentración celular estable de  $H_2O_2$  durante el crecimiento bacteriano. Se ha demostrado que cepas con mutaciones en este gen muestran tasas de mutación espontánea 10 veces superior a las observadas en las cepas salvajes. A su vez, OxyR se encarga de la regulación de los genes que codifican para la hidroxidroxidasa I (*katG*) y para la alquil hidroxidroxidasa reductasa (*ahp*) y se ha comprobado que la sobreexpresión de cualquiera de estos dos genes puede disminuir el fenotipo mutante resultante de la carencia de la proteína OxyR en *E. coli*.<sup>421</sup>

### *Otros enzimas encargados de la reparación del ADN*

Se han descrito también fenotipos hipermutadores en relación con mutaciones en genes que codifican para los enzimas con actividad endonucleasa, como son la endonucleasas III (*nth*), IV (*nfo*) y VIII (*nei*) así como la exonucleasa III (*xth*) que juegan también un papel en la eliminación de bases nucleotídicas dañadas o los enzimas ADN uracilo N-glicosilasa (*ung*) y ADN glicosilasa específica para el emparejamiento erróneo de bases tipo uracilo (*mug*). Existen estudios que relacionan la carencia de estos enzimas en *E. coli* con aumentos en la tasa de mutación.<sup>414,422</sup>

### Sistemas de recombinación del ADN y el papel del sistema SOS

El sistema SOS se trata de un importante mecanismo de respuesta al estrés mediado por la producción de ADN de cadena simple producido por el daño de agentes tóxicos para la bacteria. El incremento de esta forma de ADN en la célula bacteriana funciona como una señal que activa el sistema SOS, el cual tendrá un papel en la reparación del daño genético. Este sistema se regula principalmente por dos proteínas: LexA y RecA, las cuales actúan como represor y activador, respectivamente.<sup>423</sup>

## INTRODUCCIÓN

LexA inhibe la expresión de los genes que son inducidos por el regulón (respuesta SOS) uniéndose a promotor de los genes SOS en ausencia de daño de ADN, interfiriendo a su vez en la actividad de la ARN-polimerasa, dando lugar a la supresión de la transcripción y expresión de los genes.<sup>424</sup> Sin embargo, cuando se produce daño en el ADN, RecA y los complejos RecBCD y RecFOR se activan para unirse a las moléculas de ADN de cadena simple (ADNcs). RecA en presencia de ATP ayuda a hidrolizar al represor LexA, separándolo en dos fragmentos polipeptídicos carentes de actividad permitiéndose así la transcripción de los genes del sistema SOS. El tipo y el número de genes que componen el regulón SOS varía según las distintas especies bacterianas; sin embargo, se han descrito una serie de genes que se encuentran conservados y que son comunes como son: *recA*, *uvrA*, *ruvAB* y *recN*. UvrA forma parte de una de las proteínas que se activan por el sistema SOS, concretamente del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide excision repair* o NER). NER es el sistema principal encargado de la reparación de las lesiones del ADN producidas por la radiación ultravioleta, entre otras. Los principales componentes de la vía son las proteínas UvrA, UvrB y UvrC.<sup>425</sup>

En definitiva, este complejo de helicasa/nucleasa (RecBCD) dependiente del ATP va a promover la recombinación homóloga en la reparación de roturas de ADN de doble cadena y durante la conjugación bacteriana. Recientemente, además, se ha sugerido que este complejo participa también en degradación de regiones de ADN duplicadas que se han producido como errores en la replicación genética.<sup>426</sup>

Debido al importante papel de todas estas proteínas en la reparación del daño celular, cualquier disfunción de las mismas o alteraciones en la expresión genética va a dar lugar a una falta de reparación del daño genético y por lo tanto puede producir un incremento en la frecuencia de mutación bacteriana. Se ha observado que las cepas con delección de los genes *recA* y *recB* carecen de capacidad para realizar reversión de las mutaciones como respuesta adaptativa, y que la ausencia del gen *recD* produce aumento de la tasa de recombinación así como de mutación dependientes de los genes funcionales *recA* y *recB*.<sup>427</sup>

Por otro lado, cuando el ADN se ve dañado se produce un bloqueo de la ADN polimerasa III, así que, a través de la activación del sistema de respuesta SOS se va a producir la activación de genes codifican para las ADN polimerasas II, IV y V. Estas polimerasas son de baja fidelidad por lo que son propensas a producir un mayor número de errores durante el proceso de la replicación y, por lo tanto, van a producir un aumento en la tasa de mutación bacteriana. En consecuencia, la activación del sistema SOS en sí va a favorecer el fenómeno de hipermutación transitoria como respuesta de supervivencia bacteriana. Muchos trabajos apoyan la idea de que concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos inducen mutagénesis mediada por la respuesta SOS.<sup>428,429</sup>

## INTRODUCCIÓN

Es interesante un trabajo que ha demostrado que la inducción potente del sistema SOS en bacterias con déficit del sistema MDMMR permite el intercambio completo de secuencias entre dos especies bacterianas distintas como son *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, eliminándose completamente la barrera genética.<sup>430</sup>

### **Incidencia del fenotipo del hipermutador en la clínica**

Diversos estudios analizan la proporción de aislados clínicos hipermutadores en distintas especies bacterianas, ya sean patógenos o comensales, obtenidas de diferentes muestras; cuya incidencia va a depender de cómo se defina el concepto de aislado hipermutador previamente establecido por los autores. Aunque se han encontrado cepas hipermutadoras en aislados comensales, muchos estudios demuestran esta característica en aislados patógenos. Los microorganismos patógenos están expuestos a cambios ambientes que producen estrés celular, ya sea por los propios mecanismos de defensa del huésped o por la propia presión que ejercen los agentes antimicrobianos durante el tratamiento. Estos factores pueden favorecer la aparición de mutantes y acelerar la evolución de los patógenos mediante selección de factores de virulencia. En el estudio realizado por LeClerc y colaboradores del año 1996 encuentran una incidencia de mutantes en aislados de *E. coli* y *Salmonella enterica* superior al 1%. Los hallazgos de este trabajo dieron lugar a reconsiderar que la frecuencia de este fenómeno en los aislados clínicos podría ser mayor de lo esperado.<sup>398</sup>

Posteriormente, en otro estudio realizado en 603 aislados de *E. coli*, comensales y patógenos (causantes de bacteriemias, infecciones urinarias, infecciones gastrointestinales o infecciones del sistema nervioso central), compararon la proporción de hipermutadores presentes en ambos grupos sin encontrar diferencias significativas. Sin embargo, el 7,5% de los patógenos de origen urinario se clasificaron en este estudio como hipermutadores de alto nivel por presentar una frecuencia de aparición de mutantes superior a  $2,5 \times 10^{-7}$ , suponiendo una diferencia significativa respecto a los aislados de origen no urinario.<sup>431</sup> La presencia de elevadas frecuencias de mutantes en uropatógenos se ha observado también en otro estudio realizado por Baquero y colaboradores. En este trabajo analizaron 696 aislados de *E. coli* (patógenos de origen urinario y de bacteriemia y comensales de muestras de heces) procedentes de muestras de distintos países europeos. Encontraron una mayor proporción de mutantes débiles ( $4 \times 10^{-8} \leq$  frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina  $< 4 \times 10^{-7}$ ) en los aislados procedentes de bacteriemia (38%) que en los patógenos urinarios (25%) y de los comensales (11%).

El fenómeno de la hipermutación ha sido ampliamente estudiado en aislados de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística contando con numerosos estudios en

## INTRODUCCIÓN

este campo. *P. aeruginosa* es el patógeno más relevante en el desarrollo de infecciones pulmonares en esta patología. Existen estudios que demuestran elevadas frecuencias de mutantes en los aislados de *P. aeruginosa* de muestras respiratorias procedentes de pacientes con fibrosis quística.<sup>432,433</sup> Además, la prevalencia de aislados hipermutadores en estos pacientes es frecuente. Varios estudios muestran un alto porcentaje de pacientes con esta enfermedad que se encuentran colonizados con aislados hipermutadores de esta especie. En dos trabajos distintos en los que estudian la prevalencia en 30 pacientes de fibrosis quística colonizados por aislados de *P. aeruginosa* hipermutadora, obtienen unos porcentajes del 57% y el 36%, respectivamente.<sup>401,434</sup> Estos estudios muestran la elevada prevalencia del fenómeno de hipermutación en los procesos de infección crónicos de los enfermos con esta patología. Esto sugiere un posible papel de la hipermutación en la adaptación bacteriana para la persistencia a largo plazo, ya que estos microorganismos deben sobrevivir en un entorno en el que existe una fuerte respuesta inflamatoria que implica la generación de estrés oxidativo.<sup>434,435</sup> Por otro lado, se ha observado un porcentaje superior de hipermutadores en aislados procedentes de muestras clínicas en comparación con aquellos de origen ambiental, en un trabajo en el que estudian 174 aislados de *S. maltophilia*, patógeno oportunista que produce infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística.<sup>436</sup> Resultados similares se han observado en aislados de *S. aureus*. En un estudio en el que comparan la proporción de aislados hipermutadores de esta especie en muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística frente a pacientes sin esta enfermedad, se observa una mayor proporción en los aislados de pacientes con fibrosis quística (14,6% de un total de 89 aislados) respecto al grupo comparado (1,3% de un total de 74 aislados).<sup>437</sup> Esto mismo se ha observado con aislados de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.<sup>438,439</sup>

Se han observado elevadas frecuencias de mutación en aislados procedentes de infecciones del sistema nervioso central, como es el caso del trabajo realizado por Richardson y colaboradores, en el que encontraron hasta un 57% de aislados hipermutadores de *N. meningitidis* entre un total de 95 aislados estudiados.<sup>400</sup>

Otros trabajos realizados en enteropatógenos han demostrado también frecuencias de mutantes más elevadas en aislados clínicos en comparación con aislados comensales. En el estudio de Denamur y colaboradores, realizado en 603 aislados de *E. coli* y *Shigella* spp., encontraron que las cepas patogénicas (enterohemorrágicas y enteroinvasivas) tenían frecuencias de mutantes más elevadas (alrededor del 5% y el 4%, respectivamente) en comparación con los aislados comensales (1 y 3%).<sup>431</sup> En otro estudio se ha observado diferencias significativas entre la frecuencia de mutantes en aislados de *Salmonella* spp de origen animal en comparación con los aislados de esta especie obtenidos de muestras humanas, con unas proporciones de un 15,6% y un 3,3%, respectivamente.<sup>440</sup>

### **Técnicas para detección del fenotipo hipermutador**

#### Disco difusión y tiras de gradiente

Existen trabajos que han comprobado que los métodos de disco difusión y las tiras de gradiente de antibióticos son capaces de identificar a los aislados hipermutadores mediante la presencia de subpoblaciones resistentes a los antibióticos dentro de los halos de inhibición. En un estudio realizado con *P. aeruginosa* de muestras de pacientes con fibrosis quística los autores observaron que aquellos aislados que presentaban subpoblaciones resistentes en los halos de inhibición por disco-difusión y por tiras de gradiente en tres o más de los antibióticos testados, coincidían con aquellas clasificadas como hipermutadoras en base al análisis previo de frecuencia de aparición de mutantes. Además, comprobaron el fenotipo hipermutador mediante esta técnica con una cepa control no hipermutadora y una cepa  $\Delta mutS$ .<sup>441</sup> Sin embargo, otros autores han encontrado discrepancias con el uso de este método.<sup>442</sup>

#### Frecuencia de aparición de mutantes

La frecuencia de aparición de mutantes resistentes a un antimicrobiano se define como el número de bacterias resistentes respecto al total de las sensibles, presentes en un cultivo. Su estimación suele realizarse en un cultivo en líquido durante 24 horas, que se diluye lo máximo posible para disminuir la probabilidad de la presencia de mutantes preexistentes en el cultivo y de nuevo se incuba el caldo diluido durante 24 horas. A continuación, se realizan diluciones seriadas del cultivo y se siembran en placas de agar con y sin antibiótico. Por último, estas placas se incuban a 37°C durante 24 horas y se procede al recuento de colonias para calcular la proporción de aquellas que crecieron en antibiótico frente a las que crecieron en ausencia de antibiótico. Para obtener unos resultados concluyentes se deben realizar un número elevado de réplicas del ensayo para evitar el sesgo de aparición de mutantes en los primeros momentos del cultivo.

Para el estudio de la capacidad mutadora de una cepa de manera general se emplean antibióticos para los cuales las bacterias desarrollan resistencia en un solo paso, por la afectación de un único gen, detectando así las subpoblaciones mutantes mediante la expresión del fenotipo resistente. Por este motivo, de forma habitual se utiliza rifampicina debido a que la presencia de subpoblaciones resistentes a este antibiótico se produce por mutaciones en el gen *rpoB*. Sesenta y nueve mutaciones diferentes en este gen son capaces de generar resistencia a la rifampicina en *E. coli*.<sup>443</sup> Cabe señalar también que la selección por resistencia a la rifampicina no puede detectar mutadores que generen predominantemente mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. Por otro lado, se utilizan otros antibióticos como el ácido nalidíxico, la espectinomicina, la novobiocina, el ácido fusídico o la fosfomicina.<sup>398,408,431,444</sup>

## INTRODUCCIÓN

### Tasa de mutación bacteriana:

La tasa de mutación es una estimación de la probabilidad de que se produzca una mutación por división celular, lo que se traduce en la probabilidad de que se produzca una mutación durante la vida de una célula bacteriana. La determinación exacta de la tasa de mutación depende de comprender la potencia y limitaciones de los métodos utilizados para su determinación, además de cómo optimizar un ensayo para un método determinado. De forma general, existen dos tipos de metodología para determinar la tasa de mutación, uno que mide la acumulación de mutaciones y otro que se basa en el análisis de fluctuaciones.

Los métodos que miden la acumulación de mutaciones son muy precisos, pero tienen el inconveniente de que su ejecución requiere de mucho tiempo y laboriosidad. Durante el crecimiento exponencial de un cultivo bacteriano, cuando la población alcanza un tamaño tal que la probabilidad media de que ocurra una mutación es del 100%, la proporción de células que son mutantes aumenta linealmente (suponiendo que no haya diferencia en la tasa de crecimiento entre las mutantes y las no mutantes). Si el número de mutantes,  $r$ , y el número total de células,  $N$ , se determinan en varios puntos durante el crecimiento del cultivo, entonces la tasa de mutación,  $\mu$ , es simplemente la pendiente de la línea de  $r$  frente al número de generaciones bacterianas, suponiendo un crecimiento sincrónico.

$$\text{Tasa de mutación } (\mu) = (f_2 - f_1) / \ln (N_2/N_1); f=r/N$$

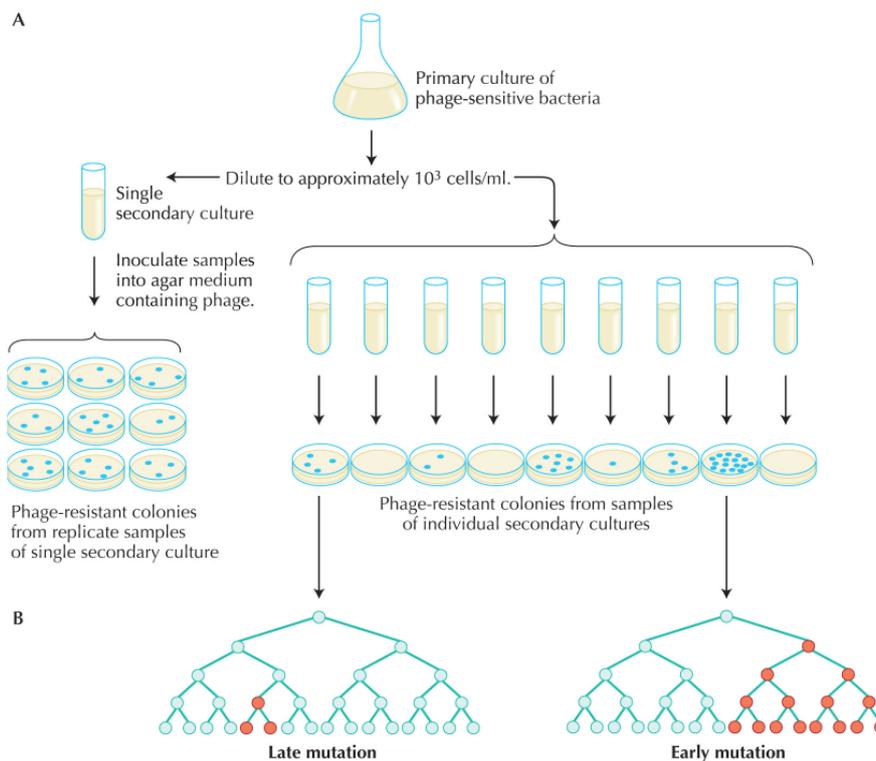
- $r$ : número observado de mutantes
- $N$ : número total de bacterias
- $f$ : frecuencias mutantes

Sin embargo, para determinar con precisión la tasa de mutación de esta manera se requiere un número elevado de células con intervalos de tiempo prolongados entre la población bacteriana  $N_1$  (inicial) y la  $N_2$  (final). El uso de diluciones en serie del cultivo va a ayudar al recuento bacteriano en estos experimentos; sin embargo, cada dilución introduce un error de muestreo que puede influir de forma importante en el cálculo de la tasa de mutación.<sup>445</sup> Además, otro problema de este método es la subestimación de aquellas poblaciones bacterianas mutantes que presentan un detrimento del fitness.

El otro método utilizado es el análisis de fluctuación de Salvador E. Luria y Max Delbrück (Figura 21),<sup>446</sup> el cual permite demostrar el carácter preadaptativo de las mutaciones bacterianas mediante la determinación de la distribución del número mutantes en cultivos bacterianos paralelos. En base al análisis de la distribución de los mutantes obtenidos del test de fluctuación se podrá analizar la tasa de mutación. Aunque existen diferentes ensayos para realizar el análisis de fluctuación, todos tratan de estimar el número probable de mutaciones por cultivo bacteriano que da lugar a la distribución observada de los mutantes bacterianos. Es

## INTRODUCCIÓN

decir, todos se basan en el cálculo del número de mutaciones que se ha producido por cultivo, no en el número de mutantes presentes por cultivo. Estos métodos tienen en cuenta que el número de mutaciones por cultivo va a depender, no solo de la tasa de mutación celular, sino también del crecimiento bacteriano (que dependerá de la naturaleza del medio y del volumen del cultivo). Como la tasa de mutación es la probabilidad de que una única célula sufra una mutación durante su vida, la tasa de mutación puede calcularse por el número de mutaciones que se ha producido en un cultivo entre el número de células totales en riesgo de sufrir la mutación.



**Figura 21.** Demostración del carácter preadaptativo de la mutación mediante el "test de fluctuación". En el caso de que las mutaciones no tuvieran un carácter preadaptativo, teniendo en cuenta que todos los cultivos tienen el mismo número de bacterias totales, la distribución del número de colonias resistentes al medio con fago por placa debería ser similares en **A** y en **B**. Sin embargo, si se tiene en cuenta el carácter preadaptativo, lo cual quiere decir que la aparición de las mutaciones no va a depender de la presencia en sí del fago, sino que se producen al azar, éstas habrán aparecido previamente al contacto con el fago, de ahí que en los casos **A** y **B**, las distribuciones del número de colonias resistentes por placa son diferentes. El número final de mutantes dependerá de la generación en la que aparezca la mutación, en caso de una mutación que se produzca en generaciones tardías dará lugar a un número bajo de bacterias mutantes, sin embargo, si la mutación se produce en las primeras generaciones, se

## INTRODUCCIÓN

producirá un número mucho mayor de bacterias mutantes. El fago permite simplemente seleccionar aquellas mutantes que son resistentes al mismo.<sup>447</sup>

Todos los modelos para estimar el número de mutaciones en un cultivo bacteriano dependen de la distribución teórica de los clones mutantes, descrita por Luria-Delbrück.<sup>446</sup> Lea y Coulson, plantean el primer modelo para poder estimar la distribución de los clones mutantes, convirtiéndose en la base de los modelos posteriores.<sup>448</sup> Estos modelos matemáticos están basados en una serie de presunciones sobre el proceso de mutación que son: (1) la probabilidad de mutación es constante a lo largo de la vida de la célula, (2) la probabilidad de mutación a lo largo de la vida de la célula no varía durante su crecimiento, (3) la proporción de mutantes es siempre muy baja, (4) el número inicial de células es insignificante en comparación con el número final de células en un cultivo bacteriano, (5) las bacterias mutantes y las no mutantes tienen las mismas tasas de crecimiento, (6) la reversión de las mutaciones ocurren en una frecuencia insignificante (7) al igual que la muerte celular, (8) se detectan todos los mutantes y (9) no surgen mutantes nuevos posteriores al proceso de selección. Sin embargo, estas suposiciones realmente no son del todo ciertas, ya que se ha demostrado que las mutaciones que afectan a ciertos genes pueden producir un coste biológico y por lo tanto influir en la tasa de crecimiento de la población y así el método detectaría un menor número de células mutantes.<sup>334,363</sup>

Un ensayo de fluctuación se realiza mediante una serie de cultivos en paralelo utilizando inóculos bacterianos muy bajos (para evitar la presencia de mutantes en el inóculo inicial) e iguales entre sí, que posteriormente se incuban y se dejan crecer durante 24 horas. A continuación, se siembra un volumen determinado del cultivo líquido en agar con medio selectivo, para calcular el número de mutantes presente en cada cultivo, y en medio no selectivo, para determinar el número total de células. La tasa de mutación se determina a partir de la distribución del número de mutantes.

En este modelo hay que tener en cuenta una serie de factores para realizarlos de forma adecuada. En primer lugar, hay que atender el número de bacterias totales presentes en los cultivos. Debido al uso de cultivos paralelos, va a ser de extrema importancia que la población bacteriana total sea la misma en todos los cultivos cuando se realice el proceso de selección de mutantes. Para ello, se debe llevar un control del crecimiento bacteriano mediante densidad óptica o recuento bacteriano en placas sin antibiótico. En segundo lugar, el número de cultivos paralelos va a afectar a cómo de precisa sea la estimación del número de mutaciones dentro de un cultivo. A mayor número de cultivos en paralelo, se va a producir una mayor precisión de esta estimación. Se considera adecuada una precisión de un 20% del modelo para la estimación del número de mutantes por cultivo. Dependiendo de la técnica utilizada, el número de cultivos

## INTRODUCCIÓN

paralelos para alcanzar este grado de precisión va a variar. En tercer lugar, hay que tener en cuenta el inóculo inicial, el cual además de no deber contener ningún mutante preexistente, debe ser insignificante en comparación con el inóculo final. Sin embargo, a menor inóculo, el tiempo para lograr un inóculo bacteriano adecuado será superior y se pone en riesgo la viabilidad del mismo. Se recomienda un inóculo inicial total que se calcula a partir del número final de bacterias totales en el cultivo/ $10^4$ . Por otro lado, no se recomienda realizar estos ensayos a partir de UFC individuales, ya que el número de mutantes puede variar entre ellas. Se debe hacer una dilución de las UFC en medio líquido fresco y posteriormente distribuirlo en los tubos de cultivo individuales para proceder al ensayo.<sup>445</sup>

Luria y Delbrück propusieron dos métodos diferentes para estimar la tasa de mutación de la población bacteriana. Por un lado, un método basado en medir la proporción de cultivos bacterianos en los que no se observan mutantes que se denomina el método  $p_0$ ; y, por otro lado, el método basado en calcular la media de células mutantes de la población bacteriana. Ambos dan lugar a una distribución de Poisson, la cual se trata de una distribución de probabilidad discreta que, a partir de la estimación de la frecuencia de ocurrencia media de un suceso con probabilidades muy bajas, expresa la probabilidad de que ocurra un determinado número de eventos (mutaciones) en un período de tiempo. La media y la varianza del evento van a depender de la probabilidad de que se produzca una mutación, así como del número de bacterias presentes en la población. Aparte, existen otros modelos para calcular la tasa de mutación a partir del ensayo de fluctuación, como el método de la mediana de Lea-Coulson, la fórmula de Drake usando la mediana, estimación de la mediana de Jones, el método de los cuartiles, método de máxima probabilidad de Lea-Coulson, etc.

## **7. Tratamiento antibiótico combinado como estrategia terapéutica frente a subpoblaciones bacterianas**

### **7.1. Fundamentos**

La fosfomicina presenta una serie de aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos, como son la limitada unión a proteínas séricas, la excreción del fármaco activo en orina a altas concentraciones, además de las concentraciones relativamente altas que se alcanzan en otros compartimentos como el pulmón, sangre o líquido cefalorraquídeo, que favorecen su uso para el tratamiento de infecciones que impliquen a estos focos.<sup>449</sup> Sin embargo, como se ha comentado previamente, la presencia de un fenotipo bacteriano heterorresistente frente a un antimicrobiano puede dar lugar al fracaso terapéutico ante un tratamiento en monoterapia con el propio fármaco. En el caso de este antibiótico hay que tener en cuenta que, además, presenta

## INTRODUCCIÓN

una elevada frecuencia de aparición de subpoblaciones resistentes aún en microorganismos considerados como sensibles,<sup>367,450</sup> lo que puede ser un problema añadido a la posible eficacia del tratamiento en monoterapia frente a aislados que además presentan subpoblaciones resistentes preexistentes. La ventaja es que este fármaco permite ser combinado de forma segura con otros antibióticos ya que no presenta resistencia cruzada con otros agentes antimicrobianos y se han descrito escasos estudios que demuestren un efecto antagonista de este fármaco en combinación con otros antimicrobianos. Por ello, el uso de combinaciones sinérgicas de antibióticos se trata de una vía interesante a tener en cuenta como estrategia para combatir poblaciones bacterianas con sensibilidad heterogénea a este antimicrobiano.<sup>343</sup>

El uso de la terapia antibiótica combinada ha tomado especial relevancia con el aumento de la frecuencia de infecciones por microorganismos frente en los que las opciones terapéuticas son limitadas, especialmente frente a bacilos Gram negativos multirresistentes. Realmente existen pocos estudios clínicos con suficiente potencia que comparen el efecto de la terapia combinada frente a la monoterapia. La mayoría de los estudios en este sentido son de cohortes retrospectivos y series de casos con tamaños muestrales insuficientes, lo que hace que sea complicado tener en cuenta la influencia de los factores de confusión pudiendo dar resultados contradictorios. Para obtener conclusiones clínicamente relevantes, es necesario realizar estudios de cohortes que incluyan un gran número de pacientes, así como ensayos clínicos aleatorizados dotados de suficiente potencia. Se ha visto, que la terapia combinada no tiene beneficio añadido con respecto a la mortalidad de los pacientes que presentan infecciones por microorganismos sin múltiples mecanismos de resistencia, pudiendo suponer un incremento en el riesgo de aparición de efectos adversos, costes y afectación de la ecología bacteriana;<sup>451,452</sup> sin embargo, los resultados difieren cuando se estudia su efecto en infecciones por microorganismos multirresistentes o en pacientes graves. En un estudio retrospectivo en el que se analizan los datos de 28 Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de diferentes hospitales para evaluar el beneficio terapéutico de la terapia empírica combinada (betalactámicos en combinación con aminoglucósidos, fluoroquinolonas o macrólidos/clindamicina) en comparación con monoterapia con betalactámicos en 4.662 pacientes diagnosticados de shock séptico bacteriano, encontraron una disminución de la mortalidad a los 28 días de los pacientes que habían recibido tratamiento empírico combinado frente a los que recibieron monoterapia (29% frente a 36%;  $P=0,0002$ ), con un aumento de días libre de ventilación mecánica (mediana [rango intercuartílico]: 17 días [0-26] vs mediana: 10 días [0-25 días];  $p=0.008$ ) y vasopresores (25 días [0-28 días] versus 23 días [0-28 días];  $p=0.007$ ).<sup>453</sup> Gutiérrez-Gutiérrez y colaboradores, en un estudio de cohortes retrospectivo en el que incluyen 437 pacientes con bacteriemia por enterobacterias productoras de carbapenemasa de 26 hospitales de tercer nivel de diez países

## INTRODUCCIÓN

diferentes, comprueban que el tratamiento combinado se asocia con un aumento de la supervivencia solo en aquellos pacientes que presentan una alta probabilidad de muerte en base a un índice de puntuación previamente validado y dirigido a predecir la mortalidad en este tipo de infecciones.<sup>454</sup> Estos estudios demuestran que es de especial importancia la individualización en la elección terapéutica, basada en las características del paciente (antecedentes personales, gravedad de la enfermedad, naturaleza de la infección, exposición previa a antibióticos, estancias previas hospitalarias, la presencia de sondaje o dispositivos externos y la colonización con microorganismos multirresistentes) así como en la epidemiología local.<sup>455</sup> A pesar de la falta de consenso entre los diferentes estudios, un metaanálisis recientemente publicado por Schmid y colaboradores encuentran que el tratamiento combinado frente a bacterias Gram negativas multirresistentes parece ser superior a la monoterapia en términos de mortalidad.<sup>456</sup>

Sin embargo, el efecto de la terapia combinada frente a bacterias heterorresistentes, es un campo menos explorado. Band y colaboradores, en su trabajo recientemente publicado, estudian el fenómeno de la heterorresistencia a diferentes antibióticos en aislados clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Realizan ensayos de curvas de letalidad y modelos de infección animal para evaluar el efecto de la terapia combinada con diferentes fármacos frente a distintos aislados que presentaban heterorresistencia a dos o más fármacos, obteniendo unos resultados que demostraron eficacia en aquellas combinaciones con antimicrobianos para las que los aislados presentaba fenotipo de heterorresistencia (colistina + fosfomicina, colistina + ceftazidima, fosfomicina + ceftazidima). Sin embargo, el tratamiento fracasó cuando se combinó un antimicrobiano frente al que el aislado era heterorresistente junto con otro considerado como resistente. Este trabajo aporta además datos llamativos sobre la frecuencia de heterorresistencia a antimicrobianos presente en aislados de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, ya que observaron que el 97,1% de los aislados estudiados (104 enterobacterias multirresistentes, productoras de carbapenemasas) eran heterorresistentes a por lo menos un antimicrobiano de los 16 estudiados (11.648 condiciones diferentes: 104 aislados × 16 antibióticos × 7 concentraciones diferentes del antimicrobiano) y el 86,5% presentaba heterorresistencia a por lo menos dos. Además, se observó heterorresistencia para cada uno de los diferentes antimicrobianos estudiados, pero la proporción variaba entre ellos, desde un 72,1% para fosfomicina hasta un 1 % para ampicilina. Estos datos indican que la heterorresistencia es más frecuente de lo que podemos pensar y, sobre todo, que puede aparecer en la respuesta de bacterias multirresistentes frente a fármacos de rescate que pueden suponer la única opción terapéutica. Estos resultados sugieren que los tratamientos combinados con antimicrobianos clasificados como heterorresistentes pueden suponer una buena opción

## INTRODUCCIÓN

terapéutica en una gran proporción de enterobacterias multirresistentes.<sup>343</sup> Los hallazgos de este estudio aportan luz en la eficacia del tratamiento combinado frente a aislados clínicos frente los que las opciones terapéuticas son escasas y pone de manifiesto la importancia del laboratorio para establecer una clasificación adecuada de aquellas bacterias que realmente son heterorresistentes. El uso de los métodos de estudio de sensibilidad, que no permiten detectar este fenómeno, puede dar lugar a error pudiendo clasificarse como sensibles a bacterias que son heterorresistentes frente a los que la monoterapia sea ineficaz o, por el contrario, podría clasificarse como resistentes a aquellas combinaciones microorganismo-antimicrobiano heterorresistentes, imposibilitando así la posibilidad de utilizar tratamientos combinados que erradicasen las subpoblaciones resistentes.

El efecto sinérgico concreto de la fosfomicina con otros fármacos ha sido demostrado en numerosos trabajos, la mayoría de ellos *in vitro*, dirigiéndose generalmente al estudio de distintas combinaciones frente a aislados multirresistentes para los que existen escasas opciones terapéuticas y que suelen ser sensibles a fosfomicina en los estudios *in vitro*.<sup>457-460</sup> La combinación de fosfomicina con foscarnet, un antiviral derivado del ácido fosfónico que inhibe al enzima FosA resulta interesante ya que se ha comprobado que incrementa la actividad de la fosfomicina en aislados que poseen esta enzima codificada en su cromosoma (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*).<sup>461</sup> Además en *P. aeruginosa*, que como se ha explicado previamente contiene una vía alternativa para síntesis de la pared bacteriana vinculada al reciclaje del peptidoglicano, se ha demostrado que cuando se combina la fosfomicina con moléculas que inhiben el reciclaje del peptidoglicano, aumentan la sensibilidad a dicho antimicrobiano.<sup>462</sup> En *E. coli* productor de BLEE se ha comprobado el efecto sinérgico de la fosfomicina junto con carbapenémicos, aztreonam, colistina, netilmicina y tigeciclina en diferentes estudios.<sup>463-465</sup> Sin embargo, también existen trabajos que no han demostrado efecto sinérgico de la fosfomicina en combinación con otros fármacos, o incluso han llegado a observar antagonismo. En un estudio en el que se evalúa la actividad sinérgica *in vitro* de fosfomicina en combinación con colistina, tigeciclina, imipenem y meropenem, mediante ensayo en tablero de ajedrez, frente a 12 aislados de *K. pneumoniae* productor de OXA-48, observaron sinergia en las combinaciones de fosfomicina con imipenem, meropenem y tigeciclina en una proporción de un 42%, 33% y 33%, respectivamente. Sin embargo, encontraron que la combinación de fosfomicina con colistina fue antagónica en el 100% de los aislados,<sup>466</sup> al contrario de lo observado en otros estudios con esta misma combinación de fármacos.<sup>464</sup>

En cuanto a los modelos *in vivo*, la mayoría son estudios realizados en modelos animales, siendo más limitado el número de estudios realizados con pacientes. Algunos de estos estudios se han desarrollado para valorar el uso de fosfomicina en combinación con otros

## INTRODUCCIÓN

fármacos como una opción para el tratamiento de infecciones osteoarticulares, bacteriemias o incluso infecciones meníngeas, observándose una adecuada respuesta al tratamiento. El inconveniente de estos estudios es que el número de pacientes suele ser limitado. Ejemplo de ello es un estudio realizado para evaluar el tratamiento combinado con fosfomicina en 16 pacientes que presentaban distintas infecciones de origen osteoarticular, meníngeo o bacteriemia persistente producidas por MRSA en el que observan que el tratamiento con cefotaxima (25 mg/kg, en infusión intravenosa durante 30 minutos) en combinación con fosfomicina (50 mg/kg, en infusión intravenosa durante tres horas) permitía la curación de todos los pacientes sin presentar recaídas.<sup>467</sup> Otro estudio con un volumen mayor de pacientes que el anterior, evaluó la adición de 5 g de fosfomicina/8 horas por vía intravenosa (con un bolo inicial de 5 o 10 g) al tratamiento antibiótico de 60 pacientes con osteomielitis postraumática crónica en la que los microorganismos aislados más frecuentemente eran *S. aureus* (56,7%), estafilococos coagulasa negativa (25%) y *P. aeruginosa* (16,7%); todos sensibles a fosfomicina. Durante el seguimiento medio de 37 meses, el 54,7% de los pacientes tuvieron una excelente respuesta al tratamiento, mientras que en el 26,4% se produjo fracaso terapéutico. Además, en 19 pacientes se determinaron las concentraciones de fosfomicina en hueso, siendo superiores a las CMI<sub>90</sub> de los aislados.<sup>468</sup> En otro estudio realizado en 103 pacientes de entre 1 mes y 15 años diagnosticados de osteomielitis aguda hematógena, causada principalmente por *S. aureus*, sometieron a 23 de ellos a tratamiento con fosfomicina en monoterapia y lo compararon con 47 pacientes tratados con fosfomicina en combinación con otro antibiótico (en el 94% de los pacientes se combinó la fosfomicina con un betalactámico) y con 33 pacientes que recibieron cualquier otro tratamiento sin fosfomicina. En este estudio, todos los pacientes progresaron favorablemente durante la terapia, excepto un paciente en el grupo de tratamiento combinado (2%) y otro paciente del grupo de tratamiento sin fosfomicina (3%), en los que se desarrolló recurrencia.<sup>469</sup>

### **7.2. Papel de los aminoglucósidos en la terapia combinada.**

La amikacina se trata de un antimicrobiano perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, grupo considerado como antibióticos de primera y segunda línea. Son clasificados por la OMS como antibióticos del “grupo accesible”, categoría que se utiliza para aquellos antimicrobianos que ofrecen un mejor valor terapéutico a la vez que poseen un efecto colateral menor en la potenciación de la resistencia antimicrobiana.<sup>470</sup> A veces los aminoglucósidos pueden ser la única opción de tratamiento contra las infecciones bacterianas multirresistentes y se recomiendan ocasionalmente como parte de una terapia combinada, frecuentemente en combinación con betalactámicos.<sup>455,471-473</sup> El posible efecto sinérgico de los

## INTRODUCCIÓN

aminoglucósidos en combinación con los betalactámicos en el tratamiento frente a diferentes microorganismos, Gram negativos y Gram positivos, no es algo novedoso, sino que ha sido un asunto de interés desde hace décadas.<sup>307,474,475</sup> El uso concreto de amikacina en monoterapia se recomienda principalmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario.<sup>476</sup> Una de las ventajas que presenta este fármaco para su uso en combinación es la preservación de su eficacia terapéutica con la administración de una única dosis diaria, lo que facilita su administración en la práctica clínica.<sup>477</sup>

Numerosos estudios han demostrado ventajas a favor de la terapia combinada de los aminoglucósidos junto con betalactámicos frente a bacterias multirresistentes o extremadamente resistentes en los que la actividad de los antimicrobianos de primera línea puede verse seriamente comprometida. El uso de aminoglucósidos en combinación con carbapenémicos ha demostrado efecto sinérgico *in vitro* frente a cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasa<sup>478,479</sup> así como en combinación con piperacilina-tazobactam en modelos de infección por endocarditis causada por aislados de *K. pneumoniae* productor de BLEE.<sup>480</sup> Sin embargo existen otros estudios en los que no se observa efecto sinérgico de los aminoglucósidos en combinación con betalactámicos frente a este tipo de aislados.<sup>481</sup>

Por otro lado, en un meta-análisis que compara el uso de tratamiento combinado con aminoglucósidos y betalactámicos frente al tratamiento en monoterapia con betalactámicos se observa que el uso de estos antimicrobianos en combinación no aporta ningún beneficio en la prevención del desarrollo de resistencia a los antimicrobianos en el tratamiento de aislados que inicialmente son sensibles a los betalactámicos, asociándose la monoterapia con betalactámicos con una menor tasa de sobreinfecciones y menor fracaso terapéutico (OR: 0,62; IC del 95%, 0,42-0,93 y OR: 0,62; IC del 95%, 0,38-1,01; respectivamente).<sup>482</sup>

Estos antimicrobianos se han utilizado en combinación e incluso en monoterapia para el tratamiento de infecciones causadas por aislados productores de carbapenemasa. En un estudio realizado en Grecia durante un brote por *K. pneumoniae* productora de KPC-2 en el cual participaron 22 pacientes, se le administró aminoglucósidos junto con colistina a 5 pacientes con neumonía, añadiéndose un tercer fármaco (tigeciclina) en 2 de los pacientes. Todos presentaron un resultado favorable, inclusive un paciente con bacteriemia que recibió el aminoglucósido en monoterapia.<sup>483</sup> En un estudio retrospectivo en el que participaron 44 pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* productor de BLEE, fallecieron 2 de 4 pacientes que recibieron un aminoglucósido activo en monoterapia.<sup>484</sup>

El efecto concreto de los aminoglucósidos en combinación con fosfomicina se ha investigado en diversos trabajos, ya que existe especial interés como posible estrategia terapéutica frente a infecciones por bacterias multirresistentes frente a los que estos

## INTRODUCCIÓN

antimicrobianos son a veces la única opción posible. Los resultados de las combinaciones en estudios *in vitro* han demostrado un efecto sinérgico con la combinación de fosfomicina y netilmicina frente a varios aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa y de BLEE, así como frente a *E. coli* productor de BLEE;<sup>464</sup> sin embargo, se ha observado en otros estudios que la combinación de otros aminoglucósidos, como la gentamicina, es indiferente frente a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC-2).<sup>485</sup>

El efecto concreto de la combinación de fosfomicina junto con el aminoglucósido amikacina ha suscitado gran interés para combatir las infecciones por bacterias multirresistentes, especialmente Gram negativas. Se ha comprobado su efecto sinérgico mediante diferentes métodos de laboratorio frente a microorganismos como *P. aeruginosa* o *A. baumannii* para tener en cuenta como una posible alternativa de tratamiento ante infecciones por estos microorganismos.<sup>486-488</sup> Concretamente, se ha estudiado en mayor profundidad el uso de esta combinación de antimicrobianos como terapia adyuvante mediante vía inhalatoria en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica. Se trata de un sistema de inhalación administrado a través de nebulizadores en línea que contienen amikacina y fosfomicina combinadas en una proporción de 5:2 (amikacina, 3 mL a 100 mg/ml; fosfomicina, 3 mL a 40 mg/ml). Esta dosificación se ha establecido en base a resultados de estudios que han determinado las dosis máximas toleradas para administración de estos dos agentes en aerosol y conseguir altos niveles del aminoglucósido a nivel traqueal, así como concentraciones suficientes de fosfomicina para lograr efecto sinérgico con amikacina sin aumentar la osmolalidad de la solución, además de un volumen del producto que permita su administración segura en un tiempo de administración relativamente corto.<sup>489</sup> Teniendo en cuenta este régimen de dosis, Montgomery y colaboradores realizaron subsecuentes estudios *in vitro* que avalan la eficacia de esta combinación. En el primero de ellos, evalúan la actividad de amikacina y fosfomicina, solas y en combinación, frente a 62 aislados (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*) con valores de CMI a amikacina >32 mg/L, considerados dentro de la categoría clínica de resistentes siguiendo la normativa de los comités internacionales CLSI y EUCAST. Cada aislado se testó mediante dilución en agar frente a amikacina (0,25-1.024 mg/L), fosfomicina (0,1-409,6 mg/L) y a amikacina-fosfomicina (manteniendo la proporción de 5:2). Las interacciones entre la amikacina y la fosfomicina difirieron según aislados, detectándose sinergia en algunos casos y en otros no se estableció ningún tipo de interacción, negativa o positiva, entre los fármacos. Sin embargo, la mediana de los valores de CMI para amikacina y fosfomicina frente a los 62 aislados disminuyó a la mitad al utilizar la combinación. Además, se observó que el efecto general para conseguir la inhibición del 100% de los aislados con cada uno de los antimicrobianos por separado se reduce en el caso de la amikacina de valores superiores a 1.024

## INTRODUCCIÓN

mg/L a concentraciones inferiores a 256 mg/L, así como en fosfomicina, que se reduce de 204,8 mg/L a 102,4 mg/L, cuando se utilizaron en combinación.<sup>490</sup> En su trabajo posterior, los autores analizaron de forma *in vitro* la frecuencia de aparición de mutantes a esta combinación entre microorganismos patógenos que habitualmente causan neumonía asociada a ventilación mecánica, tanto Gram positivos como Gram negativos, algunos de ellos multirresistentes, así como la posible interacción en combinación con otros fármacos que pudieran usarse como terapia principal por vía parenteral. Los resultados reflejan una menor incidencia de aislados en los que aparecen subpoblaciones resistentes a amikacina-fosfomicina en proporción 5:2 (4 de 14 aislados) en comparación con el número de aislados que presentan subpoblaciones resistentes a amikacina (7 de 14 aislados) o fosfomicina (12 de 14 aislados) solas, así como la ausencia de antagonismo con otros antibióticos de uso común en el tratamiento intravenoso de este tipo de infecciones (gentamicina, aztreonam, cefepime, meropenem, tigeciclina, azitromicina, vancomicina, daptomicina o linezolid) evaluada en un modelo de tablero de ajedrez frente a 30 microorganismos diferentes.<sup>491</sup> Fekade y colaboradores comprueban mediante un modelo dinámico de infección *in vitro* (*hollow-fiber infection model*, HFIM) que la combinación de amikacina (300 mg/L) y fosfomicina (1.200 mg/L) cada 12 horas en aerosol es capaz de inhibir de forma eficaz el crecimiento de dos aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistentes a fosfomicina. Los ensayos en monoterapia fracasaron a pesar de que ambos aislados eran sensibles a amikacina.<sup>492</sup> Sin embargo, en un estudio en fase 2, aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo, en el que evalúan la seguridad y eficacia del sistema de inhalación con la combinación de fosfomicina-amikacina (120 mg/300 mg) para el tratamiento de neumonía asociada a ventilación mecánica por bacterias Gram negativas frente a 143 pacientes con infección confirmada microbiológicamente, no encuentran ventajas en el uso de esta terapia adyuvante. Del total de pacientes, 71 recibieron terapia combinada en aerosol y 72 recibieron placebo, en ambos casos asociado a tratamiento intravenoso, sin observarse mejoría en el resultado clínico en aquellos pacientes que recibieron la combinación antibiótica en aerosol respecto a los que recibieron placebo.<sup>493</sup> Por otro lado, en un estudio muy reciente realizado sobre modelo animal, se ha comprobado que aunque este tratamiento inhalado no incrementa la actividad antipseudomónica en el tejido pulmonar, sí contribuye a disminuir el desarrollo de resistencias al tratamiento administrado por vía intravenosa en comparación con el uso exclusivo del fármaco por vía parenteral. Estos hallazgos sugieren que el uso de esta combinación en aerosol podría ser funcional en la prevención de aparición de resistencias a los antibióticos en lugar de utilizarse como agente terapéutico *per sé*.<sup>494</sup>

Por último, también se ha observado el efecto sinérgico de estos dos fármacos en combinación frente a aislados de origen urinario de *E. coli* multirresistente, mostrándose efecto

## INTRODUCCIÓN

sinérgico en el 58% de los aislados estudiados (n=55), así como una reducción importante en la formación de biopelículas;<sup>495</sup> sin embargo, el estudio específico de esta combinación frente a aislados heterorresistentes de esta especie bacteriana o de otras, no ha sido investigado.

### **8. Estudios *in vitro* de combinaciones terapéuticas. Técnicas y limitaciones**

La actividad de dos antimicrobianos combinados puede producir diferentes efectos, pudiendo ser: indiferente, aditivo, sinérgico o antagónico.

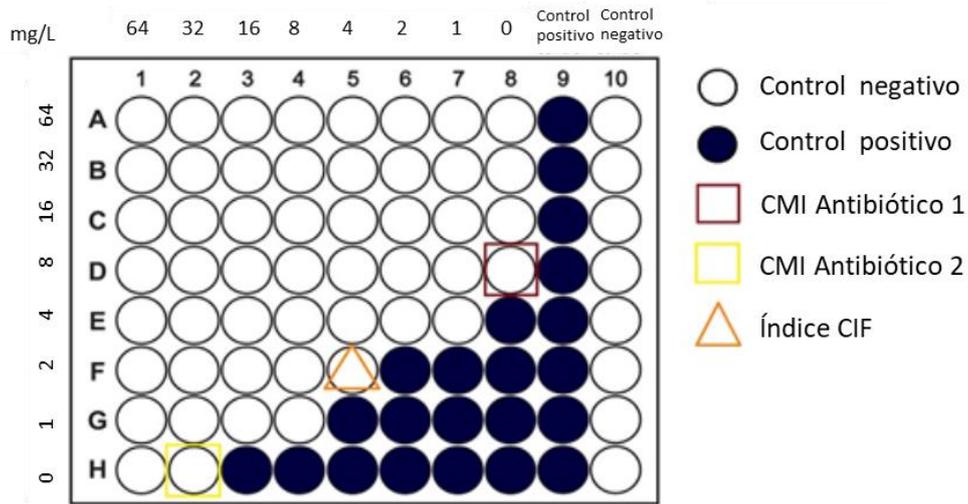
- Sinergismo: la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente superior a la suma de la actividad individual de cada uno de ellos.
- Indiferencia o autonomía: la actividad de los antimicrobianos en combinación no difiere de la actividad del más efectivo en monoterapia.
- Adición: la actividad de los antimicrobianos es la suma aproximada de la actividad individual de cada uno de los antimicrobianos.
- Antagonismo: la actividad de los antimicrobianos combinados es significativamente inferior a la suma de las actividades de los antimicrobianos por separado.

Existen diversos métodos *in vitro* que intentan evaluar qué tipo de efecto se produce de la combinación de dos o más fármacos.<sup>496</sup>

#### **Técnica del tablero de ajedrez**

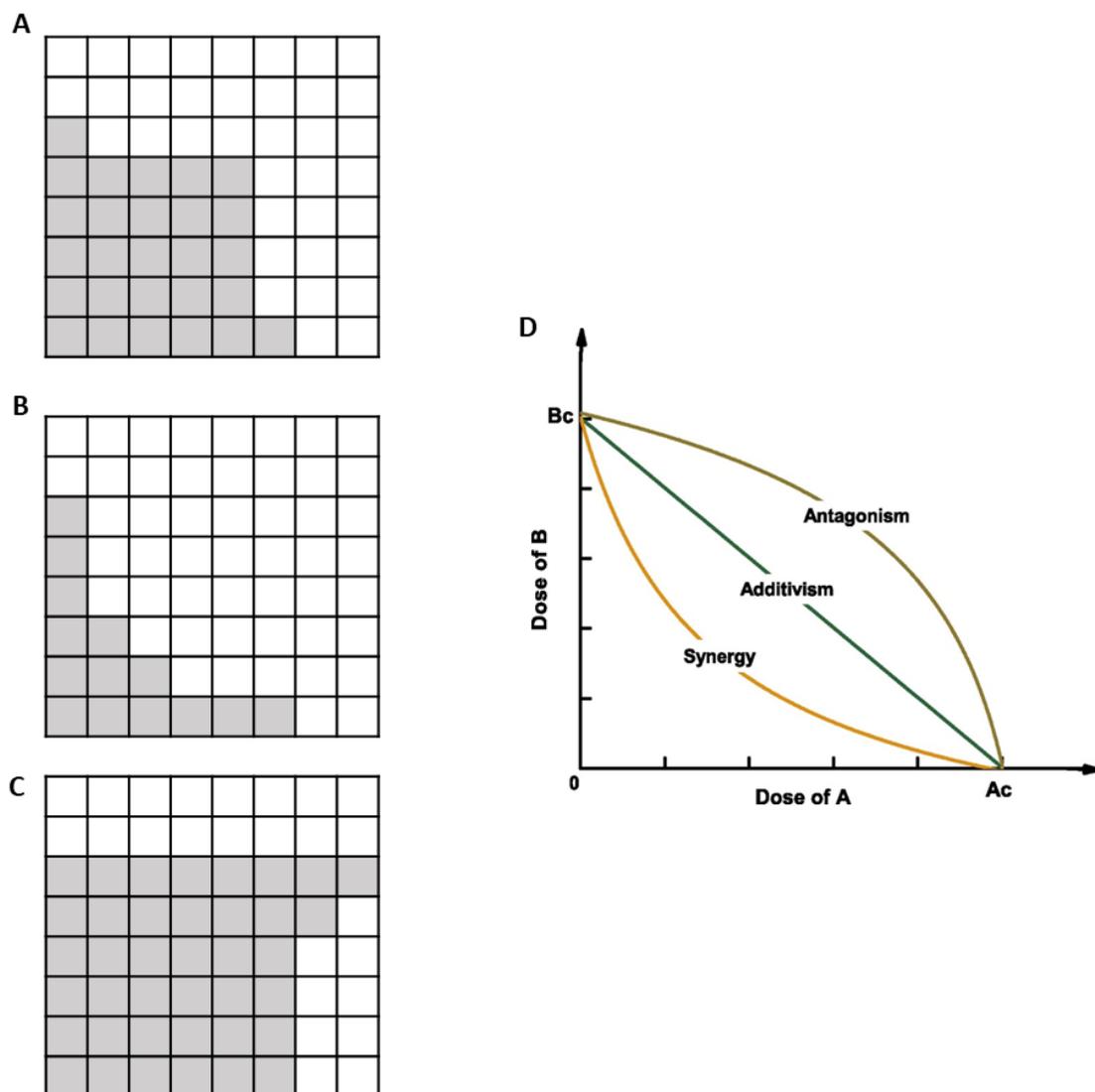
El ensayo de tablero de ajedrez consiste en la combinación de distintas concentraciones de antimicrobianos en un mismo medio de cultivo, ya sea en líquido o en agar. Se puede realizar tanto con volúmenes pequeños (100 µL) en placas de microdilución como en volúmenes mayores siempre que se mantengan las concentraciones apropiadas de los antimicrobianos y de la bacteria a estudio (1-5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL). El rango de las concentraciones es variable, pero es importante incluir un rango amplio en el que se incluyan las concentraciones correspondientes a la CMI de cada uno de los antimicrobianos de forma individual. El ensayo del tablero de ajedrez consiste en columnas en las que cada pocillo (o tubo) contiene la misma cantidad del antimicrobiano "A", el cual se diluye a lo largo del eje x; y filas en las que cada pocillo (o tubo) contiene la misma cantidad del antimicrobiano "B", que se diluye en el eje y. El resultado es que cada cuadrado del tablero (que representa un tubo o pocillo) contiene una combinación única de las dos drogas que se están probando (Figura 22).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 22.** Técnica de tablero de ajedrez y su interpretación. En la figura se representa cómo identificar la CMI del antimicrobiano 1 (cuadrado rojo), CMI del antimicrobiano 2 (cuadrado amarillo), índice de Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF) (se explica posteriormente) (triángulo naranja), el control negativo (círculo azul vacío) y el control positivo (círculo azul relleno).

Los resultados de este ensayo se interpretan por el patrón que forma en el isoblograma (el cual traduce los datos de una escala exponencial (logarítmica) a una escala aritmética) (Figura 23).<sup>496</sup>



**Figura 23.** Esquema representativo del tablero de ajedrez y el isoblograma. **A, B y C)** Los cuadros grises indican crecimiento observado a simple vista en el tablero de ajedrez. **A)** Representación de tablero de ajedrez con efecto aditivo. **B)** Representación de tablero de ajedrez con efecto sinérgico. **C)** Representación de tablero de ajedrez con efecto antagónico. **D)** Isoblograma con representación de interacción aditiva (línea verde), sinérgica (línea naranja) y antagónica (línea marrón).

Al interpretar los resultados de los estudios de tablero de ajedrez, el punto crítico suele ser si una combinación aparentemente sinérgica está significativamente por debajo de la línea aditiva del isoblograma. Dado que el margen de error de estos estudios es de una dilución, la combinación de dos antimicrobianos debería inhibir el crecimiento bacteriano en al menos dos diluciones por debajo de la línea aditiva del isoblograma para ser considerada como sinérgica y al menos dos diluciones por encima para ser considerada como antagonista. Dado

## INTRODUCCIÓN

que la determinación de la sinergia suele depender de aquellas concentraciones cercanas al punto medio del isoblograma, muchos investigadores examinan solo la CMI y una concentración inferior a la CMI de cada droga por separado. Por otro lado, estudian ambos antimicrobianos combinados a partir de un control en ausencia de antibiótico, incrementando las concentraciones de antimicrobianos de menos a más, hasta alcanzar la combinación de la mitad de la CMI del antimicrobiano A junto con la mitad de la CMI del antimicrobiano B. Este esquema reduce sustancialmente el número de pocillos y combinaciones de diluciones de fármacos necesarias para realizar esta prueba, manteniendo al mismo tiempo una discriminación suficiente en el punto medio para definir la producción del efecto sinérgico en la mayoría de los casos. Además, la realización de este ensayo en placas de microdilución, requiere una menor cantidad tanto de fármacos y caldo de cultivo. El uso de placas de microdilución permite realizar la inoculación de la placa mediante el uso de pipetas multicanal automáticas o semiautomáticas, lo que acelera y facilita la realización de esta técnica.

Para evaluar la interacción que se produce entre las drogas estudiadas e interpretar los resultados de este tipo de ensayo se utiliza el denominado CIF. Este se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice CIF} = \text{CIF}_a + \text{CIF}_b = \frac{A}{(\text{CMI})_a} + \frac{B}{(\text{CMI})_b}$$

A: concentración del antimicrobiano A necesaria para inhibir el crecimiento cuando se encuentra en combinación con el antimicrobiano B

B: concentración del antimicrobiano B necesaria para inhibir el crecimiento cuando se encuentra en combinación con el antimicrobiano A

(CMI)<sub>a</sub>: CMI del antimicrobiano A

(CMI)<sub>b</sub>: CMI del antimicrobiano A

El índice CIF acumulado se calcula mediante la suma del CIF de ambas drogas por separado. Para calcular el CIF del antimicrobiano A y B de forma individual, es necesario dividir la concentración de ese compuesto necesaria para inhibir el crecimiento en una fila o columna por la CMI de ese antimicrobiano.

Según los valores de CIF obtenidos, se considera:

- Sinergismo:  $\text{CIF} \leq 0,5$
- Indiferencia o no interacción:  $\text{CIF} > 0.5-4.0$

## INTRODUCCIÓN

- Antagonismo:  $CIF > 4$

Sin embargo, en algunos estudios, los autores han definido como sinergia parcial el índice CIF entre  $> 0,5$  y  $< 1$  y como interacción aditiva al índice CIF de 1.

Debido a la variabilidad inherente de los resultados derivados del tradicional esquema descrito, no suele ser posible distinguir entre un efecto aditivo y un efecto indiferente, con confianza, cuando los índices CIF se sitúan entre valores de 0,5 y 4. Aunque esas distinciones pueden ser útiles para evaluar los mecanismos de las interacciones de los medicamentos, pueden ser engañosas cuando se utilizan para describir interacciones clínicas potencialmente beneficiosas.

### Limitaciones de la técnica

Este ensayo posee varias limitaciones. En primer lugar, a menos que se tomen muestras de cada uno de los tubos (o pocillos) sin evidencia macroscópicas de crecimiento para determinar la actividad bactericida, solo aporta datos de inhibición. En segundo lugar, esta técnica asume que los antimicrobianos estudiados poseen curvas lineales de dosis-respuesta, lo cual no es así para todos los fármacos. Por último, este ensayo no permite observar de forma dinámica el comportamiento de dos fármacos, únicamente proporciona una información estática de la interacción.

A pesar de estas limitaciones, se trata de una técnica simple y de uso extendido para estudio de combinaciones de antimicrobianos.

### **Modelos matemáticos para estudio de interacciones de fármacos**

Diversos autores han aplicado distintos modelos matemáticos con el fin de aumentar la validez de las conclusiones relativas a las interacciones de los medicamentos cuando las relaciones dosis-respuesta no son lineales o muestran relaciones concentración-efecto tridimensionales. Li y colaboradores, describieron un método que utiliza las constantes de la tasa bactericida inicial a distintas concentraciones del antimicrobiano. Los modelos farmacodinámicos sirven para describir de forma adecuada las curvas de concentración-respuesta de los antimicrobianos, y los resultados se expresan con isoblogramas en gráficos bidimensionales en los que los ejes representan efectos máximos para cada medicamento (en una escala de cero a uno).

Tanto la actividad como la toxicidad de las combinaciones de antimicrobianos se han evaluado utilizando el método tridimensional gráfico descrito por Prichard y Shipman.<sup>497</sup> Las concentraciones de las dos drogas se trazan a lo largo de los ejes  $x$  e  $y$  formando un plano horizontal, y el efecto (por ejemplo, viabilidad bacteriana o inhibición del crecimiento

## INTRODUCCIÓN

bacteriano) que se mide se traza en el eje z perpendicular al plano. El trazado de los puntos de datos experimentales da como resultado una superficie. Una segunda superficie que representa las interacciones aditivas generadas a partir de las curvas dosis-respuesta de los agentes individuales se resta de ésta, dejando una serie de picos y valles correspondientes a áreas de desviación significativa respecto al efecto aditivo.

Para cuantificar la interacción entre diferentes fármacos se suelen usar modelos de referencia que comparan el efecto observado con los fármacos en combinación frente a la respuesta esperada bajo el supuesto en el que no se produjese ningún tipo de interacción entre los fármacos. En estos modelos matemáticos, cuando la respuesta de la combinación es mayor de la esperada, se clasifican como sinérgicas, mientras que el antagonismo se concluye cuando la combinación produce un efecto menor del esperado. Los modelos que se utilizan con mayor frecuencia para determinar el tipo de interacción farmacológica son: el modelo del agente único más alto (*Highest single agent* [HSA]),<sup>498</sup> el modelo de aditividad de Loewe<sup>499</sup> y el modelo de independencia de Bliss.<sup>500</sup>

El efecto producido por un fármaco a una dosis  $x$  suele expresarse en una escala continua de 0 a 1, que suele medir la fracción de inhibición de crecimiento bacteriano o porcentaje de muerte celular ( $y$ ) o su inverso; es decir, la fracción viable de bacterias ( $1-y$ ).

El modelo HSA o modelo de Daddum afirma que el efecto esperado de la combinación de dos fármacos es igual al efecto máximo de cada uno de ellos de forma individual; es decir,  $y = \max(y_1, y_2)$ . Por lo tanto, cualquier incremento en el porcentaje de muerte bacteriana (o disminución de la viabilidad) producido por ambas drogas en combinación respecto al máximo producido por cualquiera de los fármacos individualmente, se considerará como sinérgico.

Para una clasificación más estricta del efecto sinérgico de dos fármacos, se utiliza el modelo de Aditividad de Loewe y el modelo de independencia de Bliss, los cuales son los modelos más aceptados para evaluar la interacción entre distintos fármacos en una mezcla.

El modelo de independencia de Bliss utiliza la teoría probabilística para calcular el efecto de cada uno de los fármacos de forma individual en una combinación de eventos independientes. Este modelo asume que el efecto de cada fármaco se produce de forma independiente. Es decir, en el caso de que se cumpla este criterio, los componentes de la combinación muy probablemente tienen mecanismos y dianas de acción diferentes.<sup>500</sup> El cálculo del efecto que supone la combinación de fármacos respecto al efecto individual de cada uno de ellos se realiza siguiendo la siguiente fórmula:

## INTRODUCCIÓN

$$y = y_1 + y_2 - y_1 y_2$$

$y_1$ : porcentaje de inhibición del fármaco 1 en solitario

$y_2$ : porcentaje de inhibición del fármaco 2 en solitario

$y_1 y_2$ : porcentaje de inhibición de la mezcla

$y$ : índice de Bliss (diferencia del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de la mezcla respecto al porcentaje de inhibición que produciría cada fármaco de forma independiente al combinarlos)

Sin embargo, el modelo de Aditividad de Loewe establece que los diferentes fármacos de la mezcla actúan sobre la misma diana y utilizando el mismo mecanismo, pero difieren en su potencia. Este modelo se basa en las concentraciones que se utilizan de cada fármaco de forma individual o en combinación para lograr un mismo porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

Este modelo establece que el efecto esperado ( $y_{\text{Loewe}}$ ) de dos fármacos debe cumplir que:

$$y_{\text{Loewe}} = \frac{x_1}{X_1} + \frac{x_2}{X_2}$$

$x_1$ : concentración del fármaco 1 en la mezcla que consigue un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del  $x\%$

$x_2$ : concentración del fármaco 2 en la mezcla que consigue un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del  $x\%$

$X_1$ : concentración del fármaco 1 en solitario que consigue un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del  $x\%$

$X_2$ : concentración del fármaco 2 en solitario que consigue un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del  $x\%$

Este modelo establece que un  $y_{\text{Loewe}} = 1$  significa que se requiere la misma concentración del fármaco 1 y 2 en combinación que la concentración de cada uno de ellos por separado para conseguir un mismo porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano, indicándose así aditividad o indiferencia. Por otro lado, se establece sinergismo cuando  $y_{\text{Loewe}} < 1$ , ya que la suma de las concentraciones requerida de ambos fármacos en la mezcla para producir un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del  $x\%$  es inferior a la concentración requerida por cada uno de los fármacos en solitario para producir el mismo

## INTRODUCCIÓN

porcentaje de inhibición. En el caso contrario, cuando  $y_{Loewe} > 1$ , se establece antagonismo; es decir, la suma de las concentraciones de ambos fármacos en la mezcla para producir un porcentaje de inhibición del x% es superior a la concentración que sería necesaria por sendos fármacos en solitario.

Hay autores que establecen puntos de corte diferentes para diferenciar entre sinergia, antagonismo o aditividad, considerando  $0,50 < y_{Loewe} \leq 4$  como aditivo;  $y_{Loewe} \leq 0,50$  como sinérgico e  $y_{Loewe} > 4$  como antagónico.<sup>501</sup> Este criterio tiene en cuenta los posibles errores y desviaciones de la CMI que se pueden producir en el estudio de sinergia mediante el método de tablero de ajedrez.

Como se puede observar, la ecuación para calcular el índice de Aditividad de Loewe es la misma que la indicada para calcular el ICIF. En este caso  $A=x_1$ ,  $B=x_2$ ,  $(CMI)_a=X_1$  y  $(CMI)_b=X_2$ .

El modelo de Aditividad de Loewe también puede tomar una forma paramétrica en la que se describen las curvas de dosis-respuesta en una función logarítmica de 4 parámetros para cada fármaco por separado:

$$y_{Loewe} = \frac{E_{min} + E_{m\acute{a}x} \left( \frac{x_1 + x_2}{m} \right)^\lambda}{1 + \left( \frac{x_1 + x_2}{m} \right)^\lambda}$$

$E_{mín}$ : efecto mínimo del fármaco ( $0 \leq E_{mín} \leq 1$ )

$E_{m\acute{a}x}$ : efecto máximo del fármaco ( $0 \leq E_{m\acute{a}x} \leq 1$ )

$m$ : concentración del fármaco que produce el 50% del efecto máximo. Se denomina también como EC50 o IC50

$\lambda$  ( $\lambda > 0$ ): parámetro que indica la sigmoidicidad o pendiente de la curva de dosis-respuesta

$x_1$ : concentración del fármaco 1 en combinación

$x_2$ : concentración del fármaco 2 en combinación

En definitiva, este modelo demuestra que  $y_{Loewe}$  es igual a la respuesta a una sola droga a una dosis en la que se sumarían las dosis de cada fármaco ( $x_1+x_2$ ). Sin embargo, en los estudios de combinación de drogas en los que es improbable que dos drogas sean idénticas, esta implicación de la Aditividad según esta ecuación puede no ser del todo aplicable. Si consideramos un caso en el que el efecto del fármaco 1 sea  $y_1=0,3$ , el del fármaco 2 sea  $y_2=0,4$  y el de ambos en combinación sea  $y_c=0,6$ . Teniendo en cuenta que el efecto máximo del fármaco 1 es  $E_{max1}=0,4$  y el del fármaco 2 es  $E_{max2}=0,5$ , dependiendo del fármaco en el que nos

## INTRODUCCIÓN

focalicemos, obtendremos un valor del efecto de la interacción diferente, pudiéndose concluir que  $y_{Loewe} = 0.4$  o  $y_{Loewe} = 0.5$ .

### **Modelo de potencia de interacción cero (Zero Interaction Potency Model [ZIP])<sup>502</sup>**

Este modelo se desarrolla recientemente en el trabajo publicado por B. Yadav y colaboradores en el año 2015. En este modelo además de considerarse las curvas de dosis-respuesta de los fármacos individualmente, también se tienen en cuenta estas curvas en la combinación, obteniéndose finalmente una puntuación que cuantifica la interacción de dichos fármacos.

El efecto esperado de la combinación debe ser independiente del orden en que se añadan los distintos medicamentos de la combinación. En este modelo, se parte de que el efecto esperado de dos fármacos en combinación no cambia la potencia de las curvas de dosis-respuesta de dichos fármacos. Si tenemos en cuenta las curvas de dosis-respuesta del fármaco 1 de forma individual, la ecuación para averiguar el efecto que produce será la siguiente:

$$y = \frac{\left(\frac{x}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x}{m1}\right)^{\lambda1}}$$

Cuando el fármaco 2 a una dosis de  $x_2$  se añade al fármaco 1, la curva de dosis-respuesta cambiará en consecuencia. En el caso de que no se produjera interacción entre ambos fármacos, al añadirse el fármaco 2 debe simplemente aumentar el nivel de base de la curva de dosis-respuesta del fármaco 1, sin influir en la potencia de la curva; es decir, sin afectar a  $m1$  ni a  $\lambda1$ . Como consecuencia, la curva de dosis-respuesta del fármaco 1 en combinación con el fármaco 2, o lo que es lo mismo, la influencia del fármaco 2 sobre la curva del fármaco 1 sería la siguiente:

$$y_{ZIP^{1\leftarrow 2}} = \frac{y_2 + \left(\frac{x}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x}{m1}\right)^{\lambda1}} = \frac{\frac{1}{1 + \left(\frac{m2}{x2}\right)^{\lambda2}} + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}$$

Igualmente ocurriría con el efecto sobre la curva de dosis-respuesta del fármaco 2 al añadir el fármaco 1 ( $y_{ZIP^{1\leftarrow 2}}$ ) reflejando finalmente que  $y_{ZIP^{1\leftarrow 2}} = y_{ZIP^{2\leftarrow 1}}$ . Finalmente, los autores de este modelo concluyen que el efecto de interacción  $y_{ZIP}$  puede calcularse con la

## INTRODUCCIÓN

multiplicación de las curvas individuales de dosis-respuesta, implicando la independencia probabilística entre las dos drogas:

$$y_{ZIP} = \frac{\left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}} + \frac{\left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}}{1 + \left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}} - \frac{\left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}} * \frac{\left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}}{1 + \left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}}$$

Realmente, esta fórmula está teniendo en cuenta los dos modelos de referencia, el de independencia de BLISS y el de Aditividad de Loewe. Añade el uso de las curvas de dosis-respuesta al modelo de independencia de BLISS para obtener un valor concreto sobre la implicación de mezclar ambos fármacos en las curvas de dosis-respuesta respecto a la respuesta que se produce con cada uno de los fármacos de forma individual.

Siguiendo esta línea de razonamiento, los autores de este trabajo establecen que se puede deducir el grado de interacción de dos fármacos a través del cambio de potencia que puede ejercer el uno sobre el otro, lo cual se refleja en los parámetros de las curvas de dosis-respuesta que se obtienen con la combinación. Si un antimicrobiano afecta a la potencia del otro, la comparación de las curvas de dosis-respuesta de cada uno de los antimicrobianos y la de su combinación, aportan una medida cuantitativa del efecto de esta interacción. En el caso del fármaco 1 y dos, se muestran respectivas ecuaciones del efecto de la interacción del uno sobre el otro en sendas curvas de dosis-respuesta:

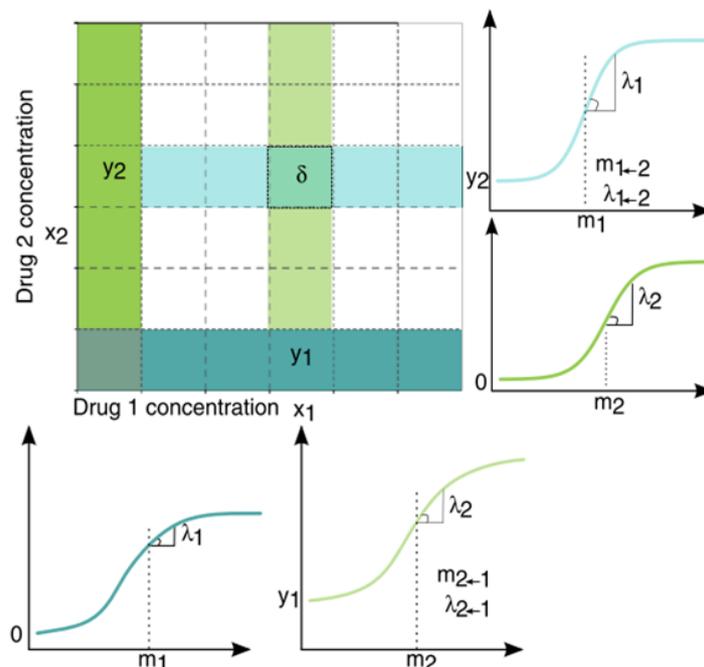
$$yc^{1\leftarrow 2} = \left( \frac{\frac{1}{1 + \left(\frac{m2}{x2}\right)^{\lambda2}} + \left(\frac{x1}{m^{1\leftarrow 2}}\right)^{\lambda^{1\leftarrow 2}}}{1 + \left(\frac{x1}{m^{1\leftarrow 2}}\right)^{\lambda^{1\leftarrow 2}}}} \right)$$

$$yc^{2\leftarrow 1} = \left( \frac{\frac{1}{1 + \left(\frac{m1}{x1}\right)^{\lambda1}} + \left(\frac{x2}{m^{2\leftarrow 1}}\right)^{\lambda^{2\leftarrow 1}}}{1 + \left(\frac{x2}{m^{2\leftarrow 1}}\right)^{\lambda^{2\leftarrow 1}}}} \right)$$

En este caso,  $m^{1\rightarrow 2}$  y  $\lambda^{1\rightarrow 2}$  son la potencia y forma de la curva de dosis-respuesta para el fármaco 1 cuando se añade el fármaco 2 a una dosis concreta (x2);  $m^{2\rightarrow 1}$  y  $\lambda^{2\rightarrow 1}$  son los

## INTRODUCCIÓN

parámetros derivados de la curva de dosis-respuesta para el fármaco 2 al añadir una dosis concreta del fármaco 1 ( $x_1$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Representación del fundamento de la formulación del modelo de estudio de sinergia ZIP.<sup>502</sup>

Para evaluar el grado de interacción en una combinación de dos concentraciones de dos fármacos ( $x_1$ ,  $x_2$ ), se compara la concentración a la que el fármaco inhibe el crecimiento bacteriano en un 50% ( $m$ ) y la pendiente de la curva de dosis-respuesta ( $\lambda$ ) de los fármacos solos; es decir, lo que en la figura 24 se representa en la primera columna y la última fila, así como sus efectos combinados en la columna  $x_1$  y la fila  $x_2$ . En la puntuación delta se consideran los cambios de  $m$  y  $\lambda$  de las curvas dosis-respuesta entre la droga 1 sola (la fila inferior) y la combinación después de añadir  $x_2$  (fila  $x_2$ ), así como entre la droga 2 sola (la primera columna) y la combinación después de añadir  $x_1$  (columna  $x_1$ ).

Definen una puntuación delta para detectar el cambio de potencia de la interacción global calculando la desviación media entre  $y_c$  e  $y_{ZIP}$ :

$$\delta(\theta) = \frac{y_c^{1 \rightarrow 2} - y_{ZIP}^{1 \rightarrow 2}}{2} + \frac{y_c^{2 \rightarrow 1} - y_{ZIP}^{2 \rightarrow 1}}{2} =$$

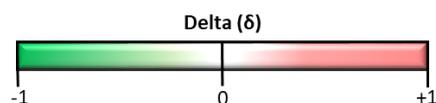
## INTRODUCCIÓN

$$\frac{1}{2} * \left( \frac{\frac{1}{1 + \left(\frac{m2}{x2}\right)^{\lambda2}} + \left(\frac{x1}{m2 \rightarrow 1}\right)^{\lambda2 \rightarrow 1}}{1 + \left(\frac{x1}{m2 \rightarrow 1}\right)^{\lambda2 \rightarrow 1}} + \frac{\frac{1}{1 + \left(\frac{m1}{x1}\right)^{\lambda1}} + \left(\frac{x2}{m1 \rightarrow 2}\right)^{\lambda1 \rightarrow 2}}{1 + \left(\frac{x2}{m1 \rightarrow 2}\right)^{\lambda1 \rightarrow 2}} \right) - \left( \frac{\left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}} + \frac{\left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}}{1 + \left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}} - \frac{\left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}}{1 + \left(\frac{x1}{m1}\right)^{\lambda1}} * \frac{\left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}}{1 + \left(\frac{x2}{m2}\right)^{\lambda2}} \right)$$

Cada uno de estos parámetros se estima a partir de los datos obtenidos de las curvas de dosis-respuesta utilizando el método de los mínimos cuadrados. La puntuación  $\delta=0$ , corresponde a ausencia de interacción (interacción cero: “zero interaction”),  $\delta < 1$  significaría antagonismo y  $\delta > 1$ , sinergismo. En este caso, cuando  $\delta = 0$  quiere decir que se combinan dos fármacos idénticos ( $m1 = m2$  y  $\lambda1 = \lambda2$ ). Para calcular la puntuación  $\delta$ , se requieren los parámetros de las curvas dosis-respuesta tanto de los fármacos en monoterapia como en combinación. La estimación de estos parámetros requiere al menos tres datos de las curvas de dosis-respuesta; es decir, requiere conocer  $y1$ ,  $y2$  e  $yc$  en a las dosis de  $x1$ ,  $x2$  y  $x1x2$ . Sin embargo, para realizar una estimación verdaderamente fiable, son necesarios un mayor número de datos de respuesta, los cuales se obtienen mediante ensayos en los que se combinan múltiples dosis de ambos fármacos.

La utilización de modelos de alto rendimiento utilizando una matriz completa en la que se combinan múltiples dosis de los fármacos en placas de microdilución ha hecho posible el estudio de las combinaciones de varios fármacos de una manera más eficiente. Se puede calcular una puntuación delta para cada combinación de dosis en la matriz, lo que permite realizar un mapa superficial de las puntuaciones delta de cada combinación de antimicrobianos (cada pocillo). Utilizando un diagrama de superficie con las diferentes puntuaciones delta, permite visualizar e identificar aquellas dosis de ambos fármacos que resultan ser sinérgicas o antagonicas, y así evaluar estas combinaciones en estudios posteriores más complejos. La puntuación  $\delta$  se mide en porcentaje de inhibición; es decir, una puntuación de  $\delta=0,5$  se trata de un porcentaje de inhibición del 50% por encima del efecto esperado. En definitiva, los valores de delta están comprendidos dentro de una escala numérica que va desde -1 (-100%) hasta +1 (+100%), teniendo al valor 0 como punto intermedio, referente a la no interacción de los fármacos (Figura 25).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 25.** Representación de escala de valores del score delta. Sinergia (color rojo): >0 a +1, no interacción/aditividad (color blanco): 0 y antagonismo (color verde): -1 a <0.

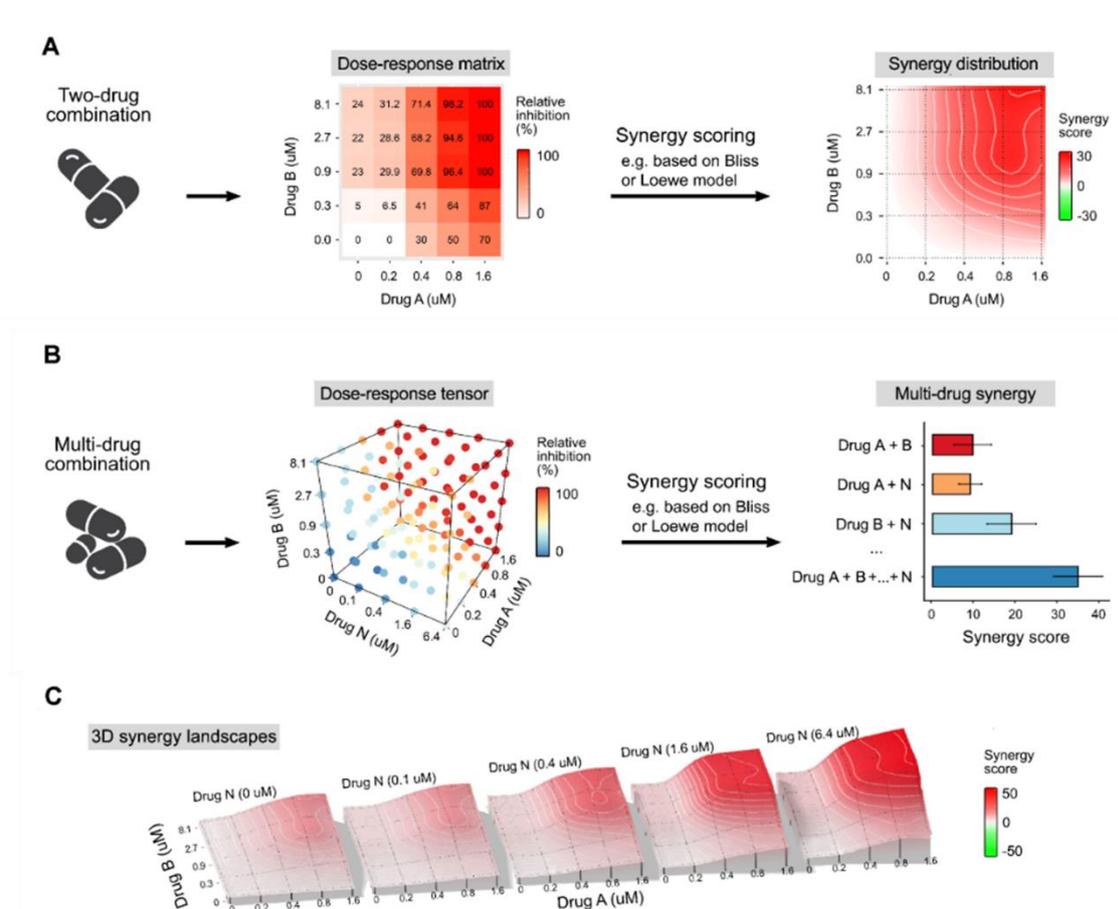
Teniendo en cuenta cada uno de los valores de puntuación delta derivados de las distintas combinaciones de concentraciones de los fármacos presentes en una matriz obtenida a partir de una placa de microdilución, se puede calcular un valor delta ( $\Delta$ ) que resume que produce la combinación de ambos fármacos:

$$\Delta = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{i=1}^n \delta$$

Normalmente se utiliza un umbral de  $\pm 5\%$  de la puntuación delta para eludir el ruido de fondo y evitar así resultados falsos positivos y falsos negativos.

Existen aplicaciones informáticas capaces de calcular diferentes scores o puntuaciones de interacción farmacológica. En este trabajo se ha utilizado la aplicación SynergyFinder (<https://synergyfinder.fimm.fi>) que se trata de una aplicación web para el análisis de combinaciones de drogas que permite visualizar de forma interactiva con gráficos en 2D y 3D los valores de interacción obtenidos mediante diferentes modelos de referencia (Figura 26).<sup>503</sup>

## INTRODUCCIÓN



**Figura 26.** Opciones de análisis visual de SynergyFinder 2.0 para: **A)** combinaciones de pares de fármacos y **B)** combinaciones de múltiples fármacos. **C)** Representación de diferentes matrices de combinaciones de drogas en modelos 3D mostrados por separado para cada combinación de dos drogas.<sup>503</sup>

Los autores de esta aplicación consideran que los valores del score  $\Delta$  deben interpretarse como: antagónico ( $<-10\%$ ), aditivas ( $\pm 10\%$ ) o sinérgicas ( $>10\%$ ) en base a su experiencia. El 0 sería el valor que asume la no interacción entre los dos fármacos.

### Métodos de difusión

La mayor ventaja de este tipo de método es que los discos y tiras de gradiente están comercializados, y se pueden obtener a diferentes concentraciones.

### Técnica con discos:

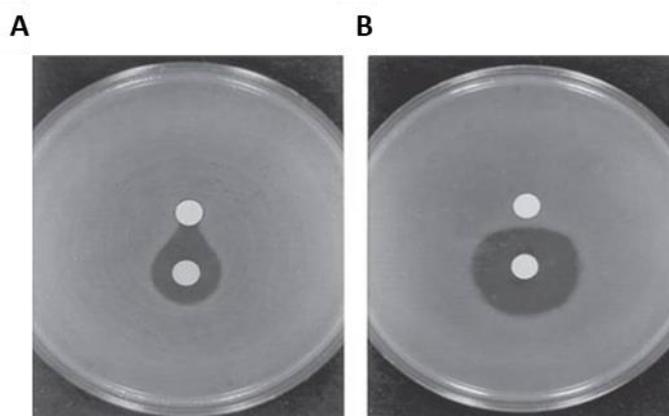
Se realiza igual que la técnica para estudio de sensibilidad mediante disco-difusión descrita en el apartado de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. En este caso, se colocarán dos discos (de sendos antimicrobianos) a una distancia que puede ser variable, pero

## INTRODUCCIÓN

de forma general debe ser igual o algo superior a la suma de los radios de los halos de inhibición de los antimicrobianos por separado. Posteriormente, se incuba a 37°C durante 16-18 horas.

El patrón observado va a ser (Figura 27):

- Sinergia: se observa un puente de unión entre ambas zonas de inhibición o un aumento en los halos (Figura 27.A)
- Indiferencia o efecto aditivo: halos de inhibición independientes.
- Antagonismo: la zona de inhibición de uno o de ambos discos se ve acortada en la zona adyacente al otro antimicrobiano (Figura 27.B)



**Figura 27.** Estudio de interacción de fármacos mediante disco-difusión. **A)** Efecto sinérgico: puente de unión entre ambas zonas de inhibición de los discos o un aumento en los halos. **B)** Antagonismo: acortamiento de la zona de inhibición.

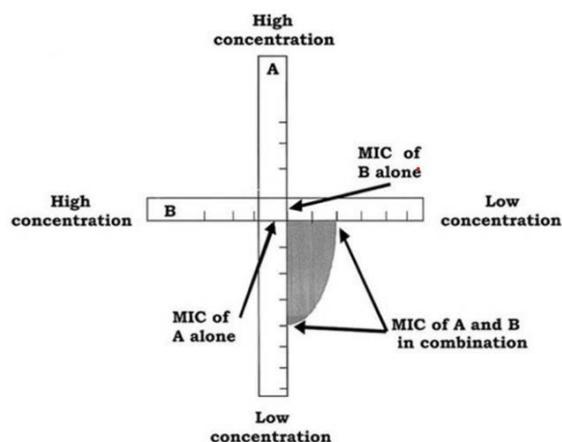
Una variación del método de aproximación de los discos consiste en utilizar dos discos que contienen las drogas individualmente más un disco que contiene ambas drogas. Después de la incubación, se comparan los diámetros de las zonas de los tres discos. La interpretación es más compleja que el método de aproximación de discos. Una zona de inhibición más grande con el disco de combinación que con cualquiera de los discos de drogas individuales por sí solo excluye el antagonismo, pero no distingue fácilmente entre la indiferencia y la sinergia. Una zona más pequeña con el disco de combinación que con cualquiera de los dos discos de droga sola sugiere antagonismo.

### Tiras de gradiente cruzadas:

En un primer paso se calcula la CMI de los agentes de forma individual mediante tiras de gradiente. Posteriormente, en un segundo paso, se inocula la placa de MHA con un 0,5

## INTRODUCCIÓN

McFarland inóculo de la bacteria a testar y se colocan tiras de gradiente una sobre otra en un ángulo de 90°, haciendo coincidir ambas CMI de los agentes de forma individual. Tras la incubación durante 18-24 horas, se procederá a la lectura de la zona de inhibición y se calculará igualmente el índice CIF como se describe en el apartado de la técnica del tablero de ajedrez (Figura 28).



**Figura 28.** Metodología de estudio de sinergia mediante combinación de tiras de gradiente cruzadas teniendo en cuenta el valor individual de CMI de ambos antimicrobianos.

De este método existen diversas modalidades que en definitiva miden el cambio que se produzca en la CMI de los agentes de forma individual respecto a los agentes en combinación.

- Método de proporción fija: en este método, las placas son inoculadas con 0.5 McFarland del microorganismo a estudio. La tira de gradiente del primer agente se coloca e incuba a temperatura ambiente durante 1 h para permitir que el antimicrobiano se difunda en el medio. Después de 1 h, se retira y se coloca la tira del segundo agente se coloca directamente sobre la impresión de la primera tira teniendo en cuenta la CMI de ambos antimicrobianos por separado se comprueba si la CMI aumenta o disminuye cuando se realiza con ambos agentes combinados en comparación con la CMI de los mismos por separado.
- Método con dilución en agar: es similar al anterior, pero en lugar de difundir el antimicrobiano con una tira de gradiente durante una hora, el antimicrobiano se encuentra ya integrado en el agar a una concentración de 0,5 ó 0,125 x CMI. Se coloca una tira de gradiente con el segundo agente a estudio para comprobar qué sucede con la CMI en combinación.
- Combinación de tiras de gradiente teniendo en cuenta la CMI: se coloca una tira de prueba en la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la difusión del

## INTRODUCCIÓN

agente. Tras 1 hora, se marca en el agar la CMI del agente previamente determinada y se retira. A continuación, se coloca la segunda tira de gradiente sobre la huella de la tira anterior, de manera que la marca en el agar corresponda a la CMI del segundo agente. La elipse de inhibición resultante se lee al día siguiente.

Técnicamente son sencillos de realizar y reproducibles. Las limitaciones de los métodos con tiras de gradiente son: la incapacidad de determinar la interacción de más de dos combinaciones de antimicrobianos y el limitado gradiente de antimicrobianos en la tira de papel.

### **Curvas de letalidad**

Mediante este método se determina la reducción real del recuento viable de bacterias tras la exposición a dos o más drogas combinadas y se compara con el efecto que ejercen de forma individual en distintos puntos de tiempo. A diferencia de la técnica anterior, la cual aporta solo datos de inhibición del crecimiento bacteriano, la curva de tiempo-muerte, mide la actividad bactericida. Esta técnica debe ser de elección cuando se estudian combinaciones de fármacos para el tratamiento de infecciones que requieren este efecto antimicrobiano. Otra ventaja que aporta este ensayo frente a la técnica anterior es que ofrece información dinámica de la interacción de los fármacos a lo largo del tiempo. Sin embargo, el recuento bacteriano es tedioso y limita el número de concentraciones antimicrobianas en el estudio, por lo que las concentraciones que se utilicen en este ensayo deben ser seleccionadas de forma escrupulosa teniendo en cuenta las concentraciones que se alcanzan en el presunto foco de infección.

Para ello se añade un inóculo estándar ( $10^5$ - $10^7$  UFC/mL) en medio líquido suplementado con los antimicrobianos de forma individual y combinada. Posteriormente se realizan subcultivos a partir del caldo en diferentes intervalos de tiempo y se realiza recuento bacteriano. En este caso, la interacción entre los agentes se define como:

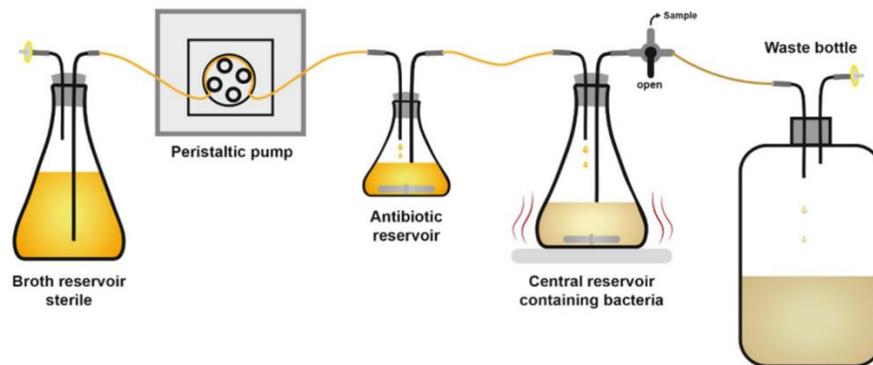
- Sinergismo: cuando se produce una reducción de la concentración bacteriana  $\geq 2 \log_{10}$  UFC/mL en el medio con las drogas combinadas en comparación con el agente individual más activo a las 24 horas. El efecto bactericida de las combinaciones de fármacos se define por una disminución  $\geq 3 \log_{10}$  UFC/mL del inóculo inicial.
- Antagonismo: cuando se produce un aumento  $\geq 2 \log_{10}$  UFC/mL al combinar ambos agentes antimicrobianos en comparación con el agente individual más activo.

## INTRODUCCIÓN

- Indiferencia: cuando se produce una variación en el inóculo bacteriano  $< 2 \log_{10}$  UFC/mL del efecto combinado respecto al efecto individual de los agentes antimicrobianos.

### Modelo farmacocinético *in vitro*

Las concentraciones y la proporción de los medicamentos *in vivo* cambian con el tiempo. Para simular mejor esas condiciones cambiantes, se han diseñado los modelos farmacocinéticos. En un modelo de un solo compartimiento, un aparato de vidrio con entrada y salida de medio se mantiene a 37°C. Los medios frescos con agentes antimicrobianos se introducen en el compartimento central con una bomba peristáltica a una velocidad constante que imita la cinética de eliminación del fármaco y la vida media en el régimen de dosificación estándar del fármaco probado. Del mismo modo se retira el medio con los desechos. El compartimento se carga con un inóculo estándar y se realizan recuentos bacterianos que se comparan entre la monoterapia y ambos agentes combinados. La sinergia se interpreta por la disminución de  $\geq 2 \log_{10}$  UFC/mL en comparación con el mejor régimen de monoterapia (Figura 29).

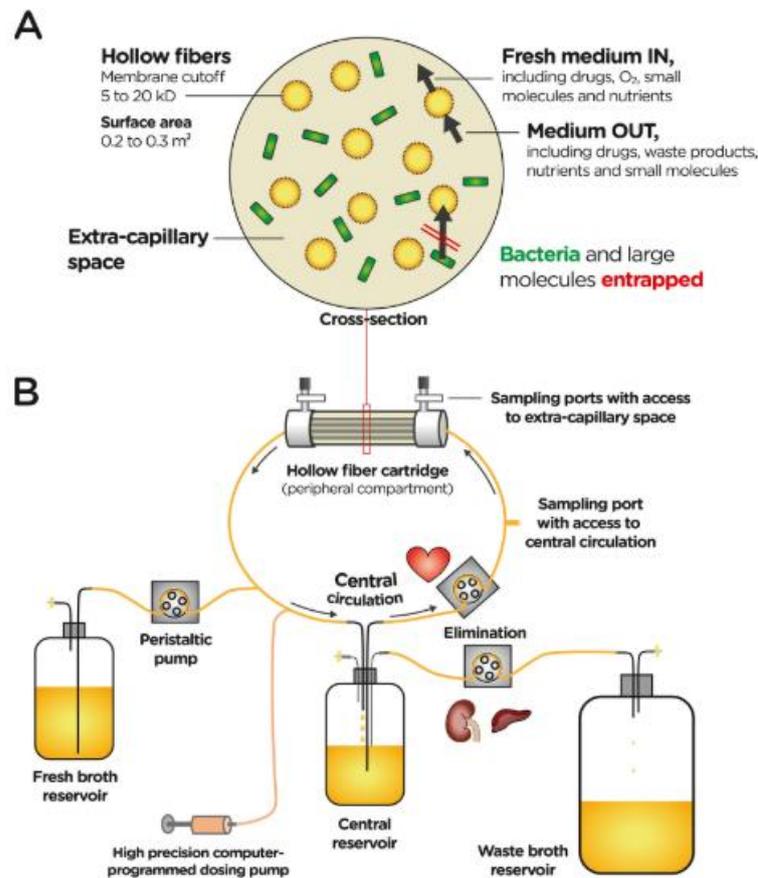


**Figura 29.** Modelo dinámico de infección *in vitro* de un solo compartimiento. Para el mantenimiento de un volumen constante, se añade medio fresco mientras se retira el contenido del cultivo a la misma velocidad. Permite simular los perfiles de concentración y tiempo de fármacos con absorción y eliminación de primer orden. Generalmente, el antibiótico o los antibióticos se dosifican en el depósito de antibióticos en forma de bolo.<sup>504</sup>

### **Modelo de infección con fibra hueca (HFIM)**

El HFIM es un importante avance en el estudio *in vitro* del efecto de los fármacos tanto en monoterapia como de las combinaciones. Este modelo tiene la ventaja de considerar los parámetros de FC y FD; por lo tanto, simula las condiciones *in vivo* manteniendo la concentración dinámica de los fármacos a lo largo del tiempo. Gracias a eso, este modelo es capaz de predecir la muerte bacteriana y la aparición de resistencias a lo largo del ensayo de forma fiable.<sup>504</sup>

El HFIM (Figura 30) es un sistema dinámico de dos compartimentos donde las bacterias quedan atrapadas en el espacio extracapilar de un cartucho de fibra hueca que simula la localización de la infección (Figura 30.A). Este sistema puede simular prácticamente cualquier curso temporal de concentraciones de drogas para una o múltiples drogas con la misma o diferentes vidas medias, pudiéndose simular múltiples perfiles cambiando la velocidad de bombeo en los momentos adecuados.<sup>505</sup> Las bacterias están contenidas dentro del compartimiento periférico del cartucho, el cual presenta una gran relación superficie/volumen, proporcionando unas condiciones óptimas para el crecimiento de las bacterias, ya que se produce una renovación constante de medio fresco con oxígeno y nutrientes, y eliminación continua de los productos de desecho (Figura 30.B).



**Figura 30.** HFIM de dos compartimentos. **A)** Sección transversal de un cartucho de fibra hueca. La cantidad de fibras huecas proporciona una gran superficie de intercambio que generalmente suele ser de 0,2-0,3 m<sup>2</sup>, dependiendo del tipo de cartucho. El tamaño de los poros que posee la membrana de las fibras, permite que, tanto el medio de cultivo, como las moléculas de oxígeno, los nutrientes, los metabolitos bacterianos, así como las distintas drogas y otras pequeñas moléculas, pueden intercambiarse entre la circulación central (que incluye el medio procedente del compartimento central, del que forma parte el interior de las fibras huecas) y el espacio extracapilar del cartucho. Sin embargo; las bacterias y las moléculas de gran tamaño permanecen atrapadas en el espacio extracapilar del cartucho. **B)** Flujo de medio de cultivo desde el compartimento con medio fresco al depósito central. Desde el compartimento central, el medio circula hacia el compartimento periférico (espacio extracapilar del cartucho) así como al compartimento de desechos. Para la circulación del medio se utilizan bombas peristálticas de alta precisión que permiten mantener la dosificación deseada del antimicrobiano a estudio en el compartimento central.<sup>504</sup>

## INTRODUCCIÓN

El muestreo se realiza desde el compartimento periférico a diferentes intervalos de tiempo para cuantificar la concentración de la droga y el recuento bacteriano, lo cual sirve para validar el ensayo y comprobar el efecto del antimicrobiano sobre la bacteria, respectivamente. Los HFIM de dos compartimentos ofrecen ventajas sobre el modelo de un solo compartimento en lo que respecta a la concentración variable de la exposición al fármaco a lo largo del tiempo. Esos modelos de FC/FD *in vitro* requieren muchos recursos, pero permiten una duración del ensayo que no es factible en los modelos animales. Sin embargo, este método es técnicamente exigente y requiere instrumentos complejos y difíciles de normalizar, así como una planificación y preparación complejas. Además, tiene un coste relativamente elevado, que se ve incrementado por los cartuchos de un solo uso. Otra de las limitaciones es la posible interferencia del material con las moléculas en estudio. Algunas drogas lipofílicas se unen a los materiales del HFIM, lo que dificulta su estudio en este tipo de dispositivos. Hay disponibles diferentes materiales de fibra hueca (fibras de celulosa, de polisulfona y fluoruro de polivinilideno) que minimizan la unión de las moléculas.<sup>506</sup>

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 1. Hipótesis

- La pérdida de actividad en *E. coli* de los genes en relación con la resistencia a fosfomicina en combinación con los genes de reparación del ADN puede explicar el fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina.
- Los distintos grados de heterorresistencia a fosfomicina en *E. coli* pueden explicarse por la afectación de distintos sistemas de reparación del ADN que influyen directamente sobre una mayor o menor frecuencia de aparición de mutantes.
- La fosfomicina en monoterapia en el tratamiento de bacteriemia por *E. coli* de origen urinario, utilizando las dosis máximas intravenosas aprobadas en humanos, se trata de una terapia ineficaz frente a aislados con fenotipo heterorresistente a fosfomicina.
- La combinación de un tratamiento optimizado fosfomicina con amikacina intravenosa frente a aislados de *E. coli* heterorresistentes a fosfomicina consigue eliminar las subpoblaciones resistentes a fosfomicina y permite utilizar dosis de amikacina menos tóxicas e igualmente efectivas.

#### 2. Objetivos del estudio

**Objetivo 1. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *Escherichia coli* heterorresistentes a fosfomicina.**

**Objetivo 1.1.** Caracterización de aislados resistentes y heterorresistentes a fosfomicina.

**Objetivo 1.2.** Construcción de mutantes sobre un fondo silvestre.

**Objetivo 2. Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a cepas de *E. coli* heterorresistentes, hipermutadoras y no hipermutadoras.**

**Objetivo 2.1.** Estudio de actividad *in vitro* de fosfomicina mediante curvas de crecimiento y curvas de letalidad.

**Objetivo 2.2.** Eficacia de fosfomicina frente a cepas de *E. coli* en un modelo dinámico de *hollow fiber*.

**Objetivo 3. Actividad *in vitro* de fosfomicina combinada con otros antibióticos frente a aislados de *E. coli* heterorresistentes, hipermutadores y no hipermutadores.**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Objetivo 3.1.** Actividad *in vitro* de fosfomicina combinada con amikacina frente a aislados de *E. coli* heterorresistentes a fosfomicina.

**Objetivo 3.2.** Optimización del tratamiento combinado fosfomicina - aminoglucósidos frente a *E. coli* heterorresistente a fosfomicina, en un modelo dinámico de infección de *hollow-fiber*.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Material

##### 1.1. Soluciones y reactivos

###### Soluciones tampón

- Solución salina: 9 g NaCl y agua destilada hasta 1 litro.
- PBS: 0,144 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,775 g  $\text{NaHPO}_4$  heptahidratado, 8,5 g NaCl y agua destilada hasta un litro; pH 7,2.
- Buffer MC (100 ml): 10 mL  $\text{MgSO}_4$  1M, 0.5 mL  $\text{CaCl}_2$  1M en agua.
- Buffer de solución salina-citrato 20X (SSC 20X): 88,23 citrato sódico, 175,32 NaCl, pH 7-8.
- Buffer maleico: 11,6 g ácido maleico, 8,75 g NaCl +/- 7 g NaOH, enrasar a 1000 ml, pH 7,5
- Buffer detection: 8,8 g NaCl, 15,8 g trizma, enrasar a 1000 ml, pH 9,5
- Buffer de lavado/washing buffer: 600  $\mu\text{l}$  Tween 20 y 200 mL ácido maleico
- Tampón Tris EDTA (TE) 10x: 10 mL Tris-HCl 1M pH 8, 2 mL  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5M pH 8 y 88 mL agua destilada.
- Tris-HCl 1M, pH 8: 121,1g Tris base y 800 mL agua destilada; ajustar con HCl a pH 8.

###### Tampón de electroforesis

TAE 50x (1l): 242 g Tris base, 57,1 mL ácido acético glacial, 37,2 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dihidratado. Añadir agua hasta un volumen de 1 litro.

###### Miniprep (lisis alcalina)

Solución II o de lisis (1 ml): 50  $\mu\text{l}$  SDS 20%, 20  $\mu\text{l}$  NaOH 5N y 930  $\mu\text{l}$  agua destilada.

Solución III alcalina (100 ml): 60 mL acetato potásico 5M, 11,5 mL ácido acético y 28,5 mL agua destilada.

###### Solución de Lauril Sulfato Sódico (SDS) 20%

20 g SDS y 100 mL agua destilada.

###### Solución de lisozima (10 mg/ml)

10 mg Lisozima y 1 mL agua destilada.

###### Solución de depurinación:

5,5 mL HCl y 494,5 de agua destilada, enrasar a 500 ml

###### Solución de desnaturalización:

87,66 g NaCl y 20 g de NaOH, enrasar a 1000 ml

###### Solución de neutralización:

87,66 g NaCl y 60,5 g de trizma, enrasar a 1000 ml, pH 7,5

**Solución de bloqueo (*Blocking reagent*, ROCHE):**

Se prepara a 10 X: disolver los 50 g que vienen en el frasco en 500 mL de ácido maleico y autoclavar. Una vez frío, hacer alícuotas de 20 mL y congelar. Añadir 180 mL ácido maleico en el momento de su utilización para obtener 200 mL de solución de bloqueo 1X.

**Solución de hibridación:** Dig easy Hyb granules (ROCHE)

**dNTPs marcados con digoxigenin:** PCR dig labeling mix(ROCHE)

**CSPD** (ROCHE): sustrato quimioluminiscente.

**Membrana de hibridación:** Hybond N+ (Amersham)

**Películas de revelado:** *Lumi film chemiluminiscent detection film*

**1.2. Medios de cultivo**

Los diferentes medios de cultivo empleados para la realización de los distintos protocolos de laboratorio se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Medios de cultivo: descripción, componentes y marca comercial.

Medio	Descripción	Componentes	Marca comercial
Luria Bertani (LB)	Medio de enriquecimiento que se constituye por tres componentes, uno mineral y dos orgánicos	<p><u>LB caldo (LBB):</u>                      cloruro sódico (10 g/l)                      triptona (10 g/l)                      extracto de levadura (5g/l)</p> <p><u>LB agar (LBA):</u> añadir agar al LBB a una concentración de 15 g/l</p> <p>pH: 7,0</p>	BD (Becton, Dickinson and Company)
Medio Luria Bertani Caldo CaCl <sub>2</sub>	Medio líquido rico en nutrientes para producir la infección con fagos	<p>Cloruro sódico (10 g/l)</p> <p>Triptona (10 g/l)</p> <p>Extracto de levadura (5g/l)</p> <p>CaCl<sub>2</sub> (0,5 mL CaCl<sub>2</sub> 1M en 100 mL LB)</p> <p>pH: 7,0</p>	BD (Becton, Dickinson and Company)

*Continuación*

**Tabla 2.** *Continuación*

Medio	Descripción	Componentes	Marca comercial
Mueller-Hinton II cation-adjusted (cationes ajustados*)	Medio nutritivo no selectivo. Recomendado para realizar las técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos	<p><u>MH caldo II (MHB-II):</u>            peptona (17,5 g/l)            extracto de carne (3 g/l)            almidón 1,5 g/l</p> <p><u>MH agar II (MHA-II):</u> añadir agar al MHB-II a una concentración de 15 g/l</p> <p>pH: 7,4</p>	BD (Becton, Dickinson and Company)
M9 (Minimal Salts, 5X)	Medio deficiente en nutrientes	<p>Sales M9 5x (200 ml/l)</p> <p>Sulfato magnésico 1M (2ml/l)</p> <p>Cloruro cálcico 1 M (100 µL/l)</p> <p>Glucosa 20%</p> <p>pH: 7,0</p>	BD (Becton, Dickinson and Company)
SOC	Medio líquido utilizado en el protocolo de transformación.	<p>Triptona (20 g/l)</p> <p>Extracto de levadura (5 g/l)</p> <p>Cloruro sódico (0,5 g/l)</p> <p>Cloruro potásico 250 mM (10 ml/l)</p> <p>Cloruro magnésico 2M (5 ml/l)</p> <p>Glucosa 1M (20 ml/l)</p>	BD (Becton, Dickinson and Company)
Caldo de triptona y soja (TSB) con glicerol al 10%	Medio líquido para la congelación de microorganismos	<p>Peptona de caseína (17 g/l)</p> <p>Peptona de soja (3 g/l)</p> <p>Cloruro sódico (5 g/l)</p> <p>Fosfato monopotásico (2,5 g/l)</p> <p>Dextrosa (2,5 g/l)</p> <p>pH: 7,3</p>	

\*Ajustado con sales adecuadas para proporcionar 20-25 mg/l de calcio y 10-12,5 mg/L de magnesio

### 1.3. Antimicrobianos

Los diferentes antimicrobianos empleados en los distintos estudios se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Antimicrobianos empleados: características y casa comercial.

Familia	Antimicrobiano	Estado	Casa comercial
Fosfomicina	Fosfomicina	Polvo valorado	Sigma Aldrich
		Sal de fosfomicina disódica	Laboratorios ERN
		Discos de papel	BioMérieux
		Tiras de gradiente	BioMérieux
Aminoglucósidos	Amikacina	Polvo valorado	Sigma Aldrich
		Amikacina solución parenteral	Laboratorios Normon
		Discos de papel	Oxoid
		Tiras de gradiente	Oxoid
	Kanamicina	Polvo valorado	Sigma Aldrich
Rifamicinas	Rifampicina	Polvo valorado	Sigma Aldrich
Anfenicoles	Cloranfenicol	Polvo valorado	Sigma Aldrich

### 1.4. Cepas de trabajo

Para realizar los diferentes ensayos de este trabajo se utilizaron distintas cepas de laboratorio (Tabla 5) y aislados clínicos (Tabla 6) de *E. coli*. Algunas de las cepas de laboratorio se construyeron en proyectos previos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla. Las cepas construidas en el desarrollo de este trabajo se detallan en el apartado de resultados.

#### Cepas de laboratorio

##### - Cepas de colección (Tabla 4):

**Tabla 4.** Cepas de colección utilizadas.

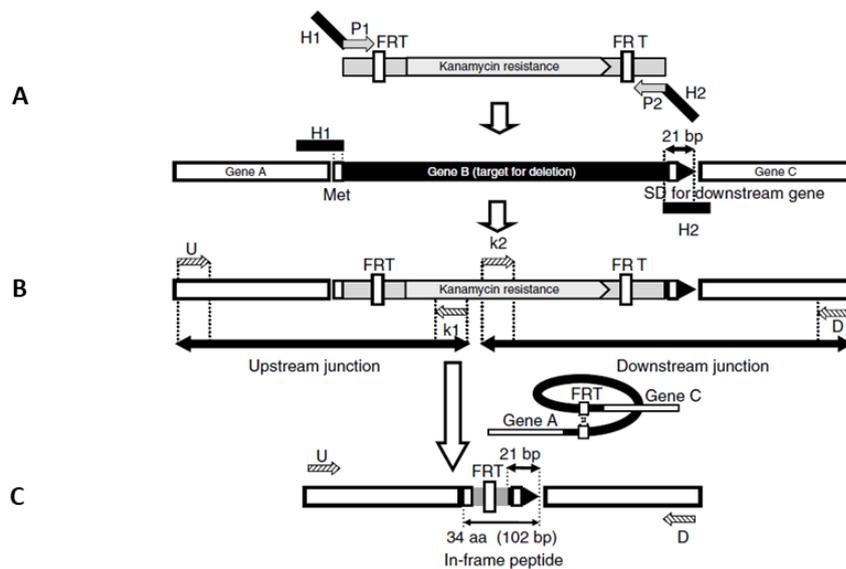
Cepas de colección	Utilidad
<i>E. coli</i> ATCC25922	Control de estudios de sensibilidad Control en ensayos realizados con aislados clínicos
<i>E. coli</i> BW25113	Control de ensayos realizados y parental de la colección KEIO
<i>E. coli</i> MG1655	Control de ensayos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

*E. coli* BW25113 se trata de una cepa modificada para facilitar los trabajos de mutagénesis. Con objeto de poder comparar nuestros resultados con el de otros relacionados con la especie bacteriana *E. coli*, resulta fundamental en nuestro caso trabajar con la cepa *E. coli* MG1655, así como con la cepa de control *E. coli* ATCC25922.

### - Cepas comerciales isogénicas:

Se seleccionaron 12 cepas de *E. coli* mutantes de deleción simple (Tabla 5) de genes en relación con el sistema de reparación del ADN (*dnaQ*, *muthH*, *mutL*, *mutM*, *mutS*, *mutT*, *mutY* y *uvrD*) o con resistencia a fosfomicina (*glpT*, *uhpT*, *cyaA* y *ptsI*) procedentes de la colección comercial “KEIO”.<sup>507</sup> Esta colección comercial presente en nuestro laboratorio, consta de un total de 3909 cepas mutantes simples en las que cada gen delecionado del cromosoma bacteriano ha sido reemplazado por un marcador de resistencia (*casete*) a kanamicina en la cepa *E. coli* BW25113 mediante el protocolo desarrollado por Datsenko y colaboradores.<sup>508</sup> Éste consiste en la sustitución de una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a un antimicrobiano que permita a posteriori seleccionar la bacteria que presenta la deleción dirigida. Utiliza un plásmido fácil de curar y de pocas copias, que expresa la recombinasa 1 Red (sistema 1 Red), la cual es inducible. Entre las ventajas de este sistema existe la posibilidad de diseñar deleciones y poder eliminar a continuación el casete de resistencia. La transformación de un plásmido en una célula posibilita la recombinación con el gen a eliminar, reemplazando el gen por el marcador de kanamicina flanqueado por las secuencias FRT. Para ello se realizan los pasos especificados en la Figura 31.



**Figura 31. A)** Desarrollo de productos de PCR de plásmidos portadores de genes de resistencia a antimicrobianos flanqueados por secuencias FRT (diana de reconocimiento de las enzimas

## MATERIAL Y MÉTODOS

recombinasas FLP) utilizando cebadores o *primers* (fragmento pequeño de ADN monocatenario que se une al molde de ADN y actúa como un "iniciador" de la polimerasa) con "colas" de 36 a 50 nucleótidos homólogos a las regiones adyacentes al gen que se va a inactivar (H1 y H2). **B)** Selección de transformantes que han sustituido el gen de resistencia al antimicrobiano por el gen B (selección de estas cepas mediante medios selectivos). **C)** Curación o eliminación del gen de resistencia antimicrobiana mediante la introducción de un plásmido que codifica para enzimas recombinasas FLP.<sup>508</sup>

Tanto los plásmidos como la recombinasa FLP pueden curarse (eliminarse) mediante su crecimiento a 37°C debido a que son termosensibles.

**Tabla 5.** Cepas comerciales utilizadas. Mutantes de delección simples de la colección KEIO.<sup>507</sup>

Cepa parental	Mutantes simples de la colección KEIO	
	Delección de genes relacionados con resistencia a fosfomicina	Delección de genes relacionados con reparación del ADN
<i>E. coli</i> BW25113	$\Delta glpT$	$\Delta dnaQ$
	$\Delta uhpT$	$\Delta mutH$
	$\Delta cyaA$	$\Delta mutL$
	$\Delta ptsI$	$\Delta mutM$
		$\Delta mutS$
		$\Delta mutT$
		$\Delta mutY$
		$\Delta uvrD$

### Cepas clínicas

#### - Aislados hipermutadores:

En este trabajo se denomina cepa clínica a aquellas bacterias aisladas de muestras humanas, ya sean comensales o patógenos. Se seleccionaron 11 aislados de *E. coli* de muestras de origen humano, los cuales fueron elegidos en base a su fenotipo mutante. Estos aislados pertenecen al trabajo realizado por Rodríguez-Beltrán y colaboradores.<sup>509</sup> Las características básicas de estos aislados se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Aislados de *E. coli* de origen humano con fenotipo mutador (comensales y patógenos).

Aislado	Patógeno/Comensal	Filogrupo	Muestra
C31	Comensal	A	Heces
C59	Comensal	A	Heces
C61	Comensal	B1	Heces
C74	Comensal	B1	Heces
P4	Patógeno	A	Orina
P17	Patógeno	A	Orina
P36	Patógeno	D	Orina
P39	Patógeno	A	Orina
P44	Patógeno	B2	Orina
P45	Patógeno	B2	Orina
P56	Patógeno	A	Orina

- Aislados heterorresistentes:

Se seleccionaron dos aislados clínicos de *E. coli* del Hospital Universitario Virgen Macarena en base a su fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina en el estudio de sensibilidad mediante disco-difusión y tiras de gradiente de fosfomicina (Tabla 7).

**Tabla 7.** Aislados patógenos de *E. coli* de muestras de bacteriemias, con fenotipo heterorresistente a fosfomicina.

Aislado	Muestra/origen	Foco
Ec3203	Sangre/bacteriemia	Urinario
		
Ec50406	Sangre/bacteriemia	Urinario
		

## 2. Métodos

### 2.1. Métodos moleculares

#### Extracción del ADN bacteriano

Para los distintos procedimientos de biología molecular, el ADN se extrajo de colonias frescas crecidas en placa directamente, mediante el kit de *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen).

#### Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction, PCR*)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la polimerasa (*My taq Red DNA Polymerase*), la cual se encuentra combinada con un colorante rojo inerte, el cual permite una rápida confirmación visual de la adición de la enzima a la mezcla además evita la adición de buffer de carga en la electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido de PCR. Los distintos componentes necesarios para la reacción y los volúmenes necesarios se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Reactivos para PCR con polimerasa “*My taq Red DNA Polymerase*”: componentes y volúmenes.

Componentes	Volumen
Cebador A (Forward) [10µM]*	2 µl
Cebador B (Reverse) [10µM]**	2 µl
Buffer Mix[5x]	10 µl
Agua miliQ	33,75 µl
Polimerasa “My taq”	0,25 µl
ADN	2 µl

Los cebadores (A y B) consisten en secuencias de unos 20 pares de bases complementarias a los extremos 5' del fragmento de ADN bacteriano a amplificar. Se utilizan en pareja para polimerizar la hebra positiva (cebador *forward*)\* y otro para la hebra negativa (cebador *reverse*\*\*). En su diseño es importante tener en cuenta que hibriden a la misma temperatura al ADN molde, así como evitar que puedan hibridar entre ellos. Los cebadores o *primers* utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 9. Se han tenido que utilizar en alguna ocasión más de una pareja de *primers* para cubrir la secuenciación completa de aquellos genes de mayor tamaño.

**Tabla 9.** Cebadores utilizados en las diferentes PCR para confirmación de mutantes de delección.

Gen diana	Cebador/Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb/aá)*
<i>glpT</i>	ECglpTF	5'-GCGAGTCGCGAGTTTTTCATTG-3'	1359/452
	ECglpTR	5'-GGCAAATATCCACTGGCACC-3'	
	ECglpTintF	5'-GGGATGGCCTGGTTCAATGAC-3'	
	ECglpTintR	5'-GCAGTTTGTTCGGCAGTACG-3'	
<i>uhpT</i>	ECuhpTF	5'-TTTTTGAACGCCAGACACC-3'	1392/463
	ECuhpTR	5'-AGTCAGGGGCTATTTGATGG-3'	
<i>cyaA</i>	ECcyaAF	5'-AACCAGGCGCGAAAAGTGG-3'	2547/848
	ECcyaAR	5'-ACCTTCTGGGATTTGCTGG-3'	
<i>ptsI</i>	ECptsIF	5'-GAAAGCGGTTGAACATCTGG-3'	1728/575
	ECptsIR	5'-TCCTTCTGTGCTCGGAAAC-3'	
<i>dnaQ</i>	ECdnaQF	5'-TTGCCAGACACGAACCATC-3'	732/243
	ECdnaQR	5'-TTGCCTCGACCTTCGTCAAC-3'	
<i>mutH</i>	ECmutHF	5'-CAGAGAATTGAACAACGCATGTGG-3'	690/229
	ECmutHR	5'-GCGTTAGGATCGGTTATCCATG-3'	
<i>mutL</i>	ECmutLF	5'-ACGGCACAACACTGCCAGTAC-3'	1848/615
	ECmutLintF	5'-ACACGGCGATCTCACGCTAC-3'	
	ECmutLR	5'-CGTTAGCCATTGAGCTGCGT-3'	
<i>mutM</i>	ECmutMF	5'-ATCCAGTTGTTGCCAGCAC-3'	810/269
	ECmutMR	5'-GGCGCTGATGGCGAAGTTAG-3'	
<i>mutS</i>	ECmutSF	5'-GCGCCTTATGTGATTACAACG-3'	2562/853
	ECmutSintF	5'-GGACTTTGTGCTGCCGTTG-3'	
	ECmutSR	5'-GGCGATAGTGATGGGCATTG-3'	
	ECmutSintR	5'-TGATTGCGCTGATGGCCTAC-3'	
<i>mutT</i>	ECmutTF	5'-GAGAGCGCAAAGTAGGACGTAAC-3'	390/129
	ECmutTR	5'-CAGGCATCGTGTGCGAATGTC-3'	
<i>mutY</i>	ECmutYF	5'-GAAAGTTCCGTTTACACCCTGC-3'	1053/350
	ECmutYR	5'-TGCAACGTGAAGCAGAAGGTC-3'	
<i>uvrD</i>	ECuvrDF	5'-TGGCATCTCTGACCTCGCTG-3'	2163/720
	ECuvrDintF	5'-CCAGGATACCAACAACATTTCAG-3'	
	ECuvrDR	5'-ATCCGGCCTACATGACGTTG-3'	
	ECuvrDintR	5'-CGTACCATGTATGAGCAGGAG-3'	

\*pb: pares de bases/aá: aminoácidos

El programa estándar para llevar a cabo la reacción de PCR es el que se detalla en la Tabla

10.

**Tabla 10.** Condiciones generales para la reacción de PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	60 seg	1
Amplificación	95°C	15 seg	30
	55°C	15 seg	
	72°C	20 seg/kb	
Elongación final	72°C	5 min	1

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Esta técnica permite la separación de moléculas de ADN en función de su tamaño al ser sometidas a un campo eléctrico, lo que permite la visualización, entre otros, de los productos de PCR y plásmidos. Esto, en parte, ayuda a comprobar que la PCR ha funcionado de forma correcta.

El gel se preparó al 1,5 % siguiendo el protocolo:

- 6 gramos de agarosa
- 400 mL TAE
- 12 µL de Red Safe

### **Purificación del producto de PCR**

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo mediante el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiéndose el protocolo que se explica a continuación:

1. Cortar la banda de gel con el ADN que se desea purificar.
2. Pesar el gel y añadir 300 µl de buffer QG por cada 100 mg de gel de agarosa.
3. Incubar a 50°C durante 10 minutos.
4. Añadir 100 µl de isopropanol por cada 100 mg de agarosa y mezclar.
5. Pasar a una columna y centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
6. Descartar el filtrado y añadir a la columna 500 µl de buffer QG. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
7. Descartar el filtrado y añadir a la columna 750 µl de buffer PE. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
8. Descartar el filtrado y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm.
9. Pasar la columna a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 mL y añadir 40 µl de agua milliQ.
10. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
11. Conservar el eluido, que contiene el ADN purificado, a -20°C.

### **Lisis alcalina (miniprep): aislamiento de ADN plasmídico**

Este protocolo se realizó para aislar el ADN del plásmido pCP20, el cual se utilizará para eliminar el gen de resistencia a kanamicina de las cepas de la colección comercial KEIO. Con este método se consigue la desnaturalización alcalina de las moléculas de ADN circular de gran tamaño, ayudando a obtener el ADN plasmídico en este caso.

El protocolo se realiza siguiendo los siguientes pasos:

1. Inocular la cepa DH10B con plásmido pCP20 en LBB e incubar en agitación durante 18 horas.
2. Centrifugar 1,5 mL del cultivo a 3.000 rpm durante 2 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 100  $\mu$ l de agua destilada.
4. Añadir 200  $\mu$ l de la solución de lisis, mezclar suavemente y dejar 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 150  $\mu$ l de la solución III alcalina, mezclar suavemente y mantener a 4°C durante 10 – 15 minutos
6. Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm.
7. Recuperar el sobrenadante y añadir el mismo volumen de isopropanol.
8. Centrifugar durante 7 minutos a 13.000 rpm.
9. Descartar el sobrenadante y añadir 800  $\mu$ l de etanol 70%
10. Centrifugar durante 7 minutos a 13.000 rpm.
11. Descartar el sobrenadante y dejar secar el sedimento.
12. Resuspender en 30 – 40  $\mu$ l de agua milliQ con ARNasa (5  $\mu$ g/ml) e incubar a 37°C durante 15 minutos.

### **Preparación de células electrocompetentes**

Este procedimiento se realiza para obtener células capacitadas para captar ADN exógeno. Así se consigue introducir el plásmido pCP20 en las cepas mutantes simples de la colección KEIO portadoras del gen de resistencia a kanamicina, con el objetivo final de eliminarlo.

El protocolo es el siguiente:

1. Inocular la cepa elegida en LB e incubar en agitación durante 18 horas.
2. Diluir el inóculo 1:100 y poner de nuevo en crecimiento el cultivo hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,5-0,6.
3. Mantener el cultivo en hielo durante 15 minutos.
4. Alicuotar el cultivo en tubos de Falcon de 50 mL y centrifugar 20 minutos a 4.200 rpm a 4°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

5. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con agua destilada fría estéril (se añade el mismo volumen que se centrifugó).
6. Centrifugar 20 minutos a 4.200 rpm a 4°C.
7. Descartar el sobrenadante, concentrar las alícuotas y repetir el lavado.
8. Repetir el paso anterior dos veces más, pero en este caso lavando con glicerol al 10% estéril y frío.
9. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en aproximadamente 800 µL de glicerol al 10%.
10. Hacer alícuotas y conservar a –80°C hasta su utilización.

### **Electroporación**

La electroporación se trata del proceso mediante el que se transfiere material genético desde exterior al interior de la bacteria. Esta transferencia se puede lograr mediante la desestructuración y ruptura transitoria de la membrana bacteriana mediante cambios en el potencial de membrana y otras propiedades celulares gracias a la aplicación de descargas eléctricas en la célula. Esta desestructuración transitoria de la membrana celular permite la entrada del ADN exógeno.

Los distintos pasos a seguir en el protocolo se detallan a continuación:

1. Añadir 3–4 µL del plásmido a electroporar en una alícuota de células electrocompetentes. Mantener en hielo aproximadamente 10 minutos.
2. Añadir esta mezcla a la cubeta de electroporación fría y aplicar un pulso (2,5 kV y 5 ms). La electroporación se realizó con el sistema Micropulser (BioRad).
3. Añadir 800 µL de medio SOC en la cubeta. Recuperar el medio e incubar a 37°C en agitación durante 1 hora.
4. Sembrar el volumen anterior en placas de medios selectivos específicos en cada caso.

### **Técnicas de reemplazamiento genético e inactivación de genes cromosómicos**

La manipulación genética de los microorganismos se realiza mediante una serie de técnicas que permiten la transferencia o eliminación programada de genes de forma dirigida. Consiste en realizar una mezcla artificial de moléculas de ADN con la finalidad de obtener fragmentos específicos de ADN, clonarlos para introducirlos en otro genoma y permitir su expresión. Estas técnicas son de utilidad en nuestro trabajo para la construcción de cepas mutantes con deleciones dobles en los genes que controlan el transporte de fosfomicina hacia el interior de la célula y en los genes de reparación del ADN.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La construcción de las dobles mutantes se realizó a partir de las cepas mutantes simples de la colección KEIO. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Eliminación o curación del casete de resistencia a kanamicina de la cepa mutante simple.
2. Transducción con el fago P1.
3. Eliminación o curación del casete de resistencia a kanamicina de la cepa mutante doble.

### Eliminación del casete de resistencia a kanamicina

El proceso de eliminación del casete de resistencia a kanamicina o proceso de curación se realiza para evitar posibles interferencias en los resultados de los ensayos además de para poder realizar la construcción de los dobles mutantes en un segundo paso. En este protocolo se utilizó el plásmido pCP20, el cual es termosensible y presenta un marcador de resistencia (Cloranfenicol-R). Este plásmido se introdujo en los mutantes simples y dobles electrocompetentes (Kan-R) descritos en el apartado de materiales correspondiente a las cepas bacterianas de la colección KEIO. El pCP20 posee una recombinasa FLT (flipasa), la cual se une a las secuencias FRT que flanquean al gen de resistencia a kanamicina provocando la escisión de la secuencia (Figura 31C).<sup>508</sup>

### Transducción mediante bacteriófago P1

Este protocolo se llevó a cabo sobre una cepa receptora *E. coli* BW25113 mutante simple sensible a kanamicina (Kan-S) utilizando a una cepa donadora de *E. coli* BW25113 mutante simple resistente a kanamicina (Kan-R). Para transferir el gen delecionado sustituido por el casete de resistencia se utiliza el bacteriófago P1.

A continuación, se describe de forma detallada los pasos a seguir en el protocolo para generar las mutantes de deleción doble realizado en nuestro laboratorio:

#### Día 1.

- Realizar un cultivo overnight de las cepas donadoras con marcador de resistencia a kanamicina (Kan-R) en medio LBB o LBB CaCl<sub>2</sub> (volumen de 3 mL aproximadamente). Poner a 37°C con agitación.

#### Día 2.

1. Tomar 1ml de cada cultivo overnight de las cepas donadoras (Kan-R) y mezclar con 4ml de LBB CaCl<sub>2</sub>. Finalmente añadir 100 µl de lisado de fagos P1vir.
2. Incubar 6-8 horas en agitación a 37°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Realizar controles de infección con la cepa *E. coli* BW25113 (BW+P1), de esterilidad de cultivo del fago P1vir (solo P1) y de turbidez de los cultivos (solo BW25113) para valorar el curso de la infección.
- Pasadas las 6-8h, se apreciará una bajada de la densidad óptica del cultivo (debido a la lisis de la bacteria donadora por los fagos).
- Transferir si fuera necesario a tubos de polipropileno y añadir 100 µl de cloroformo con el fin de eliminar aquellas bacterias aún viables, pero no así los fagos. Agitar en vórtex durante 30s y posteriormente centrifugar 4.600 rpm (20 min) o 10.000 rpm (10 min) dependiendo del volumen del tubo utilizado.
- Coger el sobrenadante y transferirlo a un tubo de polipropileno y añadir de nuevo 100 µl de cloroformo para conservarlo a 4°C.
- Poner un cultivo overnight con las cepas receptoras sin determinante de resistencia a kanamicina (Kan-S) en medio LBB o LBB CaCl<sub>2</sub> (volumen de 3 mL aproximadamente).

### Día 3.

- Transferir 1ml de cada cultivo overnight con las cepas receptoras (Kan-S) al mutante de delección simple un tubo Eppendorf y centrifugar 3 min a 3000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 1 mL buffer MC (detener el crecimiento).
- Realizar el siguiente esquema de infecciones y controles en tubos Eppendorf e incubarlos a 37°C durante 1-2 horas (Tabla 11).

**Tabla 11.** Esquema de infecciones y controles a realizar.

Esquema de infecciones	Control fagos	Control bacteria	Transducción Sin diluir	Transducción Diluida 10-1
Lisado P1 (con genoma Kan-R)	100 µl	-----	100 µl	10 µl
Bacteria receptora (Kan-S)	-----	100 µl	100 µl	100 µl
Buffer MC	100 µl	100 µl	-----	-----
Volumen final controles	200 µl	200 µl	200 µl	110 µl

- Añadir 200 µl de citrato sódico 1M (quelante del CaCl<sub>2</sub> que detiene la infección) a cada uno de los tubos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

5. Añadir 500 µl de LBB e incubar a 37°C durante 1-2 horas.
6. Sembrar 100 µl de cada tubo en placas de LB agar (suplementadas con citrato + 50 µg/ml kanamicina).
7. Para aumentar la eficiencia, centrifugar todo el contenido del tubo y descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet en volumen remanente y sembrar todo el contenido en placas de LB (citrato + 50 µg/ml kanamicina).
8. Incubar overnight a 37°C.

Por otro lado, la presencia del gen de resistencia a kanamicina en los mutantes de delección de la cepa E. coli BW25113 podría dar pie a errores de evaluación de la resistencia. Para la eliminación de dicha resistencia (curación), se necesita la producción de una FLP recombinasa dentro de la cepa mutante para permitir la recombinación de los fragmentos FRT y la eliminación del gen de resistencia a kanamicina.

### **Secuenciación genética**

La secuenciación del ADN es el proceso mediante el cual se determina la secuencia de bases de los nucleótidos (adenina, timina, guanina y citosina) que componen un fragmento de ADN. En este trabajo se realizaron dos tipos de secuenciación genética distintas en base a las necesidades de análisis posterior. Estos dos procedimientos se detallan a continuación.

#### **Secuenciación tipo Sanger**<sup>510</sup>

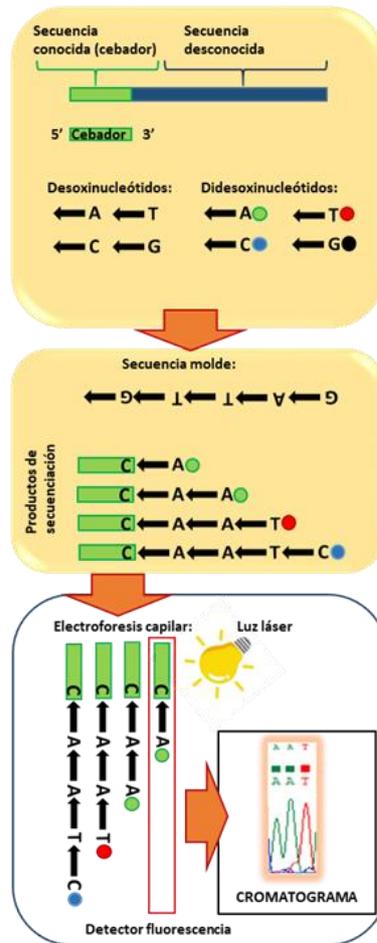
Este procedimiento se llevó a cabo en un laboratorio externo y se utilizó para secuenciar aquellos productos de PCR de la comprobación de construcción de mutantes, por lo que a continuación, se describe en que se basa este método de secuenciación.

Este método es capaz de secuenciar regiones de ADN de hasta 900 pares de bases (pb). Este tipo de secuenciación consiste en hacer muchas copias de un fragmento concreto de ADN. Para su desarrollo se requieren casi los mismos elementos que para realizar una PCR: un enzima ADN polimerasa, un cebador, los cuatro nucleótidos del ADN (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), el ADN molde (producto de la PCR) que será secuenciado. Sin embargo, ese tipo de secuenciación requiere de unas versiones de los nucleótidos o terminadores de la cadena (didesoxinucleótidos) cada una de las cuales posee un pigmento diferente. Los didesoxinucleótidos son similares a los desoxinucleótidos, pero carecen de grupo hidroxilo en el carbono 3' del anillo de azúcar, el cual permite la unión de nuevos

## MATERIAL Y MÉTODOS

nucleótidos a la cadena existente. El didesoxinucleótido al carecer de este grupo hidroxilo hace que la elongación de la cadena de ADN finalice. Además, están marcados con un pigmento de color particular dependiendo de la base nitrogenada que lo componga.

Posteriormente se procede a un proceso de desnaturalización del ADN molde y elongación tras unión de cebadores y activación del enzima ADN polimerasa como ocurre en el proceso de PCR explicado con anterioridad. Cuando este proceso termina, está prácticamente asegurado que se ha incorporado un didesoxinucleótido en cada una de las distintas posiciones de los nucleótidos que componen el ADN molde en al menos una reacción. Es decir, habrá fragmentos de diferentes longitudes que terminan respectivamente en cada una de las posiciones de los nucleótidos del ADN original. Los extremos de los fragmentos tendrán el pigmento que indica su nucleótido final. Cuando la reacción finaliza, se realiza el proceso de electroforesis capilar en gel, el cual consiste en pasar los distintos fragmentos a través de un tubo alargado y muy fino con una matriz de gel. Los fragmentos más cortos se moverán más rápido atravesando los poros del gel, mientras que los fragmentos de mayor longitud se moverán más lentamente. Cuando cada fragmento alcanza el final del tubo, una luz láser lo ilumina permitiendo la detección del pigmento asociado al didesoxinucleótido. De esta forma, se puede reconstruir la secuencia del fragmento de ADN original a partir de los distintos colores de los pigmentos registrados por el detector. Estos datos registrados en el detector dan lugar a un cromatograma con diferentes picos dependiendo de la intensidad de fluorescencia de los didesoxinucleótidos, interpretándose así la posición y el tipo de base nitrogenada que contiene la secuencia de ADN (Figura 32).



**Figura 32.** Pasos de la secuenciación tipo Sanger: amplificación, electroforesis capilar y desarrollo del cromatograma. Figura adaptada y modificada.<sup>511</sup>

Para que la secuenciación pueda llevarse a cabo en el centro externo, se remite el producto de PCR y los cebadores utilizados en cada una de las reacciones.

Secuenciación genómica masiva

Se realizó el análisis de la secuencia del genoma completo (*Whole Genome Sequencing/WGS*) mediante técnicas de secuenciación de nueva generación de los once aislados clínicos (C31, C59, C61, C74, P4, P17, P36, P39, P44, P45 y P56) utilizando el secuenciador Miseq (Illumina, San Diego, California, Estados Unidos).

El protocolo que se llevó a cabo se detalla a continuación:

1. Extraer el ADN genómico de los aislados utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Países Bajos), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
2. Resuspender el ADN en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)

## MATERIAL Y MÉTODOS

3. Determinar la concentración de ADN utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).
4. Preparar la librería con el kit de preparación de librerías de ADN Nextera XT (Illumina)
5. Secuenciación con cartucho de reactivos, V3 600 ciclos (Illumina)

Se utilizó el software CLC Genomic Workbench (Qiagen, Países Bajos) para el ensamblaje *de novo* de las distintas secuencias de Illumina. Los genomas bacterianos se anotaron utilizando el servidor de anotación RAST 2.0.<sup>512</sup> Se utilizó una base de datos que contenía secuencias de aminoácidos de tipo salvaje (*wild type/wt*) de las proteínas del sistema de reparación del ADN (DnaQ, MutH, MutL, MutM, MutS, MutT, MutY, RecA, RecF, RecO, RecR, UvrA, UvrB, UvrC, UvrD, UvrY) y de las proteínas implicadas en la resistencia a fosfomicina (Crp, CyaA, GlpT, UhpT, PtsI, UhpA, UhpB, UhpC y UhpT). Ésta se construyó con las secuencias obtenidas de la base de datos EcoCyc.<sup>513</sup> Las secuencias de nucleótidos traducidas de RAST se compararon con nuestra base de datos personalizada, utilizando el editor de alineación de secuencias Bioedit versión 5.0.7 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA). Las secuencias de aminoácidos que poseían un porcentaje de similitud inferior al 100% respecto a la base de datos se analizaron mediante Protein BLAST<sup>514</sup> y se registraron los cambios detectados. En los aislados hipermutadores C59, C61, C74, P45; y en los normomutadores, Ec3203 y Ec50406, se complementó la información del resistoma mediante la identificación de los genes de resistencia adquiridos y/o mutaciones cromosómicas a otros antimicrobianos de interés clínico utilizando una base de datos *online* de libre acceso (ResFinder 3.2, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Se estudiaron los secuenciotipos para caracterizar a estos aislados y descartar una posible relación del fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina y/o el fenotipo de hipermutación mediante la utilización de plataforma *online* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>; <http://enterobase.warwick.ac.uk>)

### **Determinación de secuenciotipo**

La determinación del secuenciotipo de los aislados se realizó mediante el análisis del *Multilocus Sequence Typing* siguiendo el esquema de *Warwick*. Para ello, se estudiaron los genomas completos obtenidos mediante secuenciación masiva en la plataforma *online* del Centro de Epidemiología Genómica (*Center for Genomic Epidemiology*; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Esta plataforma se basa en la lectura de secuencias cortas de cuatro plataformas de secuenciación, formando una base de datos para detección de los MLST que se actualiza mensualmente. El sistema realiza una comparativa de los genes conservados del esquema MLST de las secuencias sujetas a estudio con los de la base de datos mediante un método de clasificación basado en BLAST. Finalmente, asigna un secuenciotipo basado en la combinación concreta de alelos identificados en cada caso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En caso de detectar mutaciones en los alelos determinantes del MLST ausentes en las bases de datos de la plataforma, se requiere la asignación de un nuevo alelo. La solicitud del nuevo alelo y del nuevo MLST se realizó a través de la plataforma *online* Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>).

### **Southern blot**

Esta técnica permite la identificación y localización de secuencias de ADN, mediante la hibridación con sondas específicas. Este método se llevó a cabo para verificar con una segunda técnica (distinta a la PCR), la ausencia de genes de reparación del ADN (*mutS*) en aquellas cepas en las que no se detectó por métodos de secuenciación masiva ni por secuenciación de tipo *Sanger*. Para ello se realiza el siguiente protocolo que consta de varias fases:

#### 1. Fase de electroforesis en gel:

- Separar los fragmentos de ADN conforme a su tamaño exponiéndolos a un campo eléctrico utilizando directamente el producto de la PCR.
- En el gel se debe introducir:
  - un marcador de peso molecular (escalera).
  - control positivo (ADN que sabemos contiene el gen de nuestra sonda).
  - control negativo (ADN que no contiene el gen de nuestra sonda).
  - ADN de las muestras a estudiar.
- Correr el gel hasta que las bandas estén bien separadas.

#### 2. Procesamiento del gel:

- Cortar el gel por extremo superior derecho como señal de diferenciación
- Colocar el gel en una bandeja con solución de depurinación y dejarlo durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.
- Retirar solución anterior y añadir solución desnaturalizante. Dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar solución anterior y añadir solución neutralización. Dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

#### 3. Transferencia a membrana:

- Colocar en una bandeja con el tampón de solución salina-citrato al 20X (20X SSC) un cristal que se cubre con un papel de filtro plegado con la misma anchura que el gel.
- Sobre el papel de filtro se coloca el gel hacia abajo y la membrana se coloca sobre éste (gel y membrana deben ser del mismo tamaño y tener el extremo superior derecho cortado).
- Sobre la membrana se colocarán dos papeles de filtro *Whatman* del mismo tamaño que el gel o superior y sobre éstos se colocan varias toallas de papel.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Por último, se coloca un cristal y un peso de 0.5 kg para ejercer presión sobre las distintas capas y favorecer así la transferencia desde el gel a la membrana.
  - Una vez montado todo el dispositivo, se cubre con papel de aluminio la parte de papel de filtro que no está en contacto con el gel para evitar así la evaporación.
  - Dejar 16-20 horas a temperatura ambiente
4. Fijación de ácidos nucleicos a la membrana:
- Desmontar dispositivo con mucho cuidado.
  - Señalar los pocillos con un lápiz asegurándonos de que se marca la membrana.
  - Retirar el gel y poner en unas de las esquinas superiores 2µl de los controles (control positivo y sonda de hibridación).
  - Fijar los ácidos nucleicos a la membrana con radiación UV.
  - Dejar 1 hora en la estufa a 50°C
5. Realizar el protocolo de prehibridación:
- Realizar este paso a 42°C durante 2-3 horas
  - Encender el HIBRIDOGEN a 42°C
  - Añadir a un tubo de hibridación 30 mL de la solución DIG EASY Hyb.
  - Introducir la membrana con el ADN.
6. Hibridación:
- Hervir durante 5 minutos la mezcla de: 300 µl DIG Easy Hyb (marcador de ácidos nucleicos) + 5 µl de sonda marcada
  - Vaciar el tubo de hibridación y añadir 15-20 mL DIG Easy Hyb (precalentado) junto con la sonda hervida previamente.
  - Incubar toda la noche a 42 °C.
7. Lavados:
- A las 24 horas se deben realizar los distintos lavados.
  - 2 lavados de 5 minutos con SSC 2X + SDS 0.1 % (temperatura ambiente).
  - 1 lavado de 20 minutos con SSC 0.5X + SDS 0.1 % (68 °C).
8. Bloqueo:
- Descongelar una alícuota de 20 mL de solución de bloqueo 10X y añadir 180 mL de ácido maleico en el momento de su utilización para obtener 200 mL de solución de bloqueo 1X
  - Añadir 20ml de solución bloqueo y dejar 30 minutos a temperatura ambiente
9. Detección inmunológica:
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm la solución de bloqueo

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Mezclar 30 mL de solución de bloqueo con 3 µL de anticuerpos Anti-Digoxigenin-AP y dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Hacer 2 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con buffer de lavado.
- Añadir *buffer detection* y dejar durante 15 minutos.
- Envolver la membrana en una transparencia y añadir CSPD, cerrar los extremos e incubar durante 5 minutos en oscuridad.
- Quitar el exceso de CSPD con ayuda de un papel presionando sobre la transparencia y extendiendo hacia los extremos con suavidad.
- Recortar al tamaño deseado, sellar la transparencia y dejar 10-15 minutos a 37 °C.

### 10. Exposición y revelado:

- Este paso siempre se realiza en oscuridad
- Exponer la película durante 30 minutos y revelar (revelador, lavado con agua, fijador y lavado con agua).

### ❖ Preparación de sonda:

- Amplificación mediante PCR del gen que queremos utilizar como sonda.
- Purificación del producto de PCR.
- Amplificación del gen utilizando dNTPs marcados con digoxigenin utilizando el ADN purificado como molde.
- Purificación del producto de PCR para usar como sonda.

## 2.2. Métodos de Microbiología

### Preparación de los agentes antimicrobianos

Se utilizaron las directrices de CLSI<sup>247</sup> para preparar los distintos antimicrobianos de este estudio. Se prepararon alícuotas a una concentración de 4096 mg/l que se congelaron a -80°C, partiendo así de un stock general que facilita el desarrollo de los experimentos. Todos los ensayos realizados con fosfomicina fueron suplementados con glucosa-6-fosfato a una concentración de 25 mg/L que se añadió al medio con un margen máximo de 24 horas previo al ensayo.

### Estudios de sensibilidad *in vitro*

El estudio de sensibilidad a fosfomicina se realizó a todas las cepas de trabajo; sin embargo, el de sensibilidad a amikacina se determinó únicamente en los aislados clínicos que presentaban mayor frecuencia de aparición de mutantes (C59, C61, C74, P45, Ec3203 y Ec50406), los cuales se estudiaron posteriormente en los modelos de HFIM.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Dilución en agar

Se trata del método de referencia para determinación de la CMI a fosfomicina según CLSI y EUCAST.<sup>247,515</sup> Este método se encuentra estandarizado y se necesita la preparación de un inóculo bacteriano concreto de  $10^4$  UFC/punto de inoculación sobre la superficie de MHA. El agar se suplementa con glucosa-6-fosfato (25 mg/l) y se crea un gradiente de concentraciones con aumento de las diluciones en base 2.

Se prosiguió según el siguiente protocolo:

- Dispensación de las placas de MHA suplementado con glucosa-6-fosfato estableciendo un gradiente de concentraciones de 0,125 mg/L-1024 mg/L.
- Realizar un 0,5 McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/ml) en MHB de colonia fresca.
- Utilizando un replicador de Steers con puntas de 1 milímetro, inocular las placas de MHA a distintas concentraciones para obtener un inóculo final de  $\sim 10^4$ .
- Secar las placas a temperatura ambiente en el interior de cabina de bioseguridad.
- Incubar durante 16-20 horas a 37°C.
- Pasado ese tiempo se procede a la lectura y registro de la CMI observada para cada una de las cepas.

Este ensayo se realizó en los aislados C59, C61, C74, P45, Ec3203 y Ec50406, por triplicado. Se incluyó la cepa control *E. coli* ATCC25922.

### Método de disco-difusión

El procedimiento para llevar a cabo este método es exactamente igual al de difusión con tiras de gradiente (se explica en detalle en el siguiente subapartado) sustituyendo la tira por un disco impregnado con el antimicrobiano. En este trabajo se utilizaron discos de fosfomicina a una cantidad fija de 200  $\mu$ g/disco con el objetivo de realizar un cribado previo en la detección del posible fenotipo de heterorresistencia para realizar la confirmación y estudio de CMI posterior mediante el uso de tiras de gradiente.

### Método de difusión con tiras de gradiente

Los valores de CMI a fosfomicina y amikacina se calcularon mediante el sistema de difusión con tiras de gradiente (Etest® AB BIODISK, Biomerieux o Liofilchem). A partir de placas de cultivo fresco se realiza un inóculo a 0,5 McFarland en MHB que se extiende por la superficie de MHA.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente, se deposita la tira de gradiente en la superficie del agar y se incuba a 37°C durante 16-20 horas. A continuación, se procede a la lectura de la CMI, la cual se determina por la intersección de la zona inferior de la elipse de inhibición de crecimiento bacteriano con la tira de gradiente. En este trabajo se registró no solo la CMI de la población bacteriana mayoritaria, sino que, además, se tuvieron en cuenta los valores de CMI de las subpoblaciones presentes en las elipses de inhibición (definiéndose como subpoblación aquellas poblaciones bacterianas formadas por UFC individuales y con límites definidos). La cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se usó como control.

### Microdilución en caldo

La CMI de fosfomicina y amikacina se calculó mediante microdilución siguiendo la normativa de CLSI<sup>247</sup>. A partir de placas de cultivo fresco se preparó un inóculo a 0,5 McFarland en MHB. Se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One™), las cuales una vez preparadas con las diferentes concentraciones de antimicrobianos se inocularon con una dilución 1:100 del cultivo anterior. Estas placas se incubaron a 37°C durante 16-20 horas. La cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 se usó como control. Se establecieron controles de crecimiento y esterilidad del medio.

### Correlación entre los resultados de CMI a fosfomicina mediante microdilución en caldo y difusión mediante tiras de gradiente.

Para estudiar la correlación entre los valores obtenidos mediante microdilución y técnica de difusión con tiras de gradiente, se calculó el coeficiente de Pearson. Este coeficiente se trata de índice de dependencia lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas; es decir, una medida que puede utilizarse para determinar el grado de relación de dos variables cuando ambas variables sean cuantitativas y continuas. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$r_{X,Y} = \frac{\text{Cov}(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y}$$

Cov(X, Y): covarianza de (X, Y)

$\sigma(X)$ : desviación típica de "X"

$\sigma(Y)$ : desviación típica de "Y"

El índice de Pearson puede tomar valores en un rango continuo que comprende desde el -1 (correlación perfecta negativa) al +1 (correlación perfecta positiva). Cuando toma el valor de 0, indica que no existe correlación.

### **Frecuencia de aparición de mutantes**

Se determinaron por cuadruplicado las frecuencias de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina (100 mg/L) y fosfomicina (50 mg/L y 200 mg/L) para los 11 aislados clínicos y los 12 mutantes simples de delección. En base a estos resultados, las cepas de laboratorio y los aislados clínicos se clasificaron en función de la frecuencia de aparición de mutantes a la rifampicina como mutantes débiles (frecuencia de aparición de mutantes  $< 1 \times 10^7$ ) o como mutantes fuertes (frecuencia de aparición de mutantes  $\geq 1 \times 10^7$ ).<sup>516</sup> Posteriormente, se estimó el coeficiente de correlación de Pearson para medir la relación estadística entre las frecuencias de mutantes resistentes a fosfomicina y a rifampicina:

De forma adicional, se calculó la frecuencia de mutación espontánea a amikacina (32 mg/L) para los aislados clínicos C59, C61, C74, P45, Ec3203 y Ec50406 y se realizó una segunda clasificación en base a los valores de frecuencia de aparición de mutantes a fosfomicina como “normomutadores” (frecuencia de aparición de mutantes inferiores a  $1 \times 10^{-7}$ ) e hipermutadores (frecuencia de aparición de mutantes iguales o superiores a  $1 \times 10^{-7}$ ). Este ensayo se realizó por duplicado.

En todas las réplicas se incluyeron *E. coli* WT BW25113 y MG1655 como cepas control.

Para ellos se realizó el siguiente protocolo:

1. Preparar un 0,5 McFarland en LB a partir de un cultivo fresco.
2. Incubar durante 18 horas a 37°C en agitación una dilución 1:10<sup>4</sup> del 0,5 McFarland anterior.
3. Sembrar 100  $\mu$ L en placas de MHA suplementadas con las concentraciones deseadas de antimicrobiano.
4. Hacer diluciones seriadas y sembrar en placas sin antimicrobiano 100  $\mu$ L de las diluciones 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup>.
5. Incubar a 37°C durante toda la noche.
6. Contar el número de colonias en las placas sin antimicrobiano y calcular el tamaño del inóculo (UFC/ml). Reincubar las placas con presión selectiva 24 horas.
7. Contar el número de colonias en las placas con presión selectiva y calcular el número de mutantes (UFC/ml).

La frecuencia de aparición de mutantes se calculó como:

$$\text{Frecuencia de mutantes (UFC/ml)} = \frac{\text{Población en medio con antimicrobiano (ufc/ml)}}{\text{Población en medio sin antimicrobiano (ufc/ml)}}$$

### **Curvas de crecimiento**

Los aislados clínicos y las cepas mutantes simples y dobles fueron sometidas a ensayos de monitorización de crecimiento poblacional con el antimicrobiano fosfomicina utilizando un gradiente de 0,5 mg/L a 512 mg/L. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

- Inocular MHB con las cepas a estudiar e incubar durante 24 horas a 37°C en agitación.
- Inocular en placas de fondo plano de 96 pocillos con MHB suplementado con glucosa-6-fosfato (25mg/L) en un gradiente de fosfomicina de 0,5 a 512mg/L (diluciones seriadas en base 2) a una concentración bacteriana de  $5 \times 10^5$  UFC/pocillo.
- Monitorizar la D.O. a 595 nm durante 20 horas en el sistema Infinite 200PRO (Tecan Group AG, Männedorf, Suiza) a 37 °C con mediciones cada 20 minutos.

El límite de detección de la técnica fue de 0,08 (densidad celular de  $1 \times 10^8$  UFC/ml). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los porcentajes de viabilidad bacteriana de cada pozo se determinaron comparando los valores de DO a las 24 horas de los pocillos con distintas concentraciones de fosfomicina con el pocillo de control sin antimicrobiano (100% de viabilidad).

### **Estudio *in vitro* de interacción de antimicrobianos. Técnica del tablero de ajedrez**

La interacción entre fosfomicina y amikacina se estudió mediante la técnica de tablero de ajedrez. Este ensayo se realizó por triplicado utilizando los aislados C59, C61, C74, P45, Ec3203 y Ec50406. *E. coli* ATCC25922 se empleó como cepa control.

El protocolo de esta técnica se especifica a continuación:

- Rellenar todos los pocillos de la placa con 100 µL de MHB (suplementado con glucosa-6-fosfato a una concentración de 25 mg/L en los ensayos con fosfomicina), excepto el pocillo A1. La fosfomicina también se suplementará con glucosa-6 fosfato a 25 mg/L. La amikacina solo se suplementará con este compuesto en los pocillos en los que se encuentre combinada con la fosfomicina (todos excepto la fila de estudio de sensibilidad a amikacina).
- Añadir 200 µl del primer antimicrobiano, fosfomicina o amikacina, a 2x de la concentración máxima deseada en el pocillo A1 de la placa. Es decir, si queremos que la placa comience en una concentración de 128 mg/L de fosfomicina, debemos añadir 200 µl de fosfomicina a una concentración de 256 mg/L. Añadir 100 µl del mismo antimicrobiano al doble de concentración del pocillo B1 al G1.
- Diluir desde la columna 1 a la 11 de 100 µl en 100 µl realizando diluciones 1:2.
- Añadir 100 µl del segundo antimicrobiano, fosfomicina o amikacina, al doble de la concentración máxima deseada en todos los pocillos de la fila A (del pocillo A1 al A12). Es

## MATERIAL Y MÉTODOS

- decir, si queremos que la placa comience en una concentración de 64 mg/L de amikacina, debemos añadir 100 µL de fosfomicina a una concentración de 128 mg/L.
- Este antimicrobiano se diluirá hacia abajo de 100 µl en 100 µl realizando diluciones de 1:2 desde la fila A a la fila G.
  - Realizar un 0,5 McFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL) a partir de una colonia bacteriana fresca y realizar una dilución 1:10 ( $\sim 10^7$  UFC/mL).
  - Inocular 5 µl de esta dilución en cada pocillo de la placa. El inóculo bacteriano inicial será finalmente de  $5 \times 10^5$  UFC/mL por pocillo utilizando un volumen de 100 µl de MHB en placas de fondo plano de 96 pocillos.
  - El pocillo de H12 no contendrá ninguno de los dos antimicrobianos y se utilizará como control de crecimiento/viabilidad bacteriana.
  - Las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C y la densidad óptica (DO) se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm (lector de placas Infinite200 Pro).
  - Se prepararon distintas combinaciones de concentraciones de fosfomicina y amikacina en base a los valores de CMI previamente determinados por microdilución en caldo de cada uno de los aislados: C59 (fosfomicina: 0,5 mg/l-512 mg/l; amikacina: 2 mg/l-128 mg/l), C61 (fosfomicina: 1 mg/l-1024 mg/l; amikacina: 1 mg/l-64 mg/l), C74 (fosfomicina: 1 mg/l-1024 mg/l; amikacina: 1 mg/l-64 mg/l), P45 (fosfomicina: 1 mg/l-1024 mg/l; amikacina: 0,25 mg/l-16 mg/l), Ec3203 (fosfomicina: 1 mg/l-1024 mg/l; amikacina: 0,5 mg/l-32 mg/l), Ec50406 (fosfomicina: 2 mg/l-2048 mg/l; amikacina: 0,5 mg/l-32 mg/l). Para la cepa control se utilizaron las combinaciones de concentraciones de fosfomicina a 0,03 mg/l-32 mg/l con amikacina a 0,125 mg/l-8 mg/l.
  - Las interacciones entre los dos antibióticos se evaluaron mediante el índice CIF (ver fórmula en apartado 7 “Estudios *in vitro* de combinaciones terapéuticas. Técnicas y limitaciones. Técnica del tablero de ajedrez”). La correlación entre el índice CIF y el efecto de la combinación se interpretó como: índice CIF  $\leq 0,5$ : sinergia, índice CIF  $> 0,5$  a 4: no interacción e índice CIF  $> 4$ : antagonismo.<sup>501</sup>
  - Además, se analizó el grado de sinergia de los fármacos en toda la matriz teniendo en cuenta las curvas de dosis-respuesta mediante el modelo ZIP (ver apartado 7 “Estudios *in vitro* de combinaciones terapéuticas. Técnicas y limitaciones. Modelos matemáticos para estudio de interacciones de fármacos”) en base al análisis múltiple de los datos de turbidez/viabilidad bacteriana de las tres réplicas obtenidas analizados en la plataforma *online* SynergyFinder.<sup>503</sup> En este caso, dependiendo del score *delta*, las interacciones de los fármacos se consideraron como: antagonicas ( $< -10\%$ ), aditivas ( $\pm 10\%$ ), sinérgicas ( $> 10\%$ ) y no interacción (0%).

### Curvas de letalidad

Inicialmente, se evaluó la actividad de fosfomicina mediante curvas de letalidad con dos inóculos bacterianos iniciales (inóculo alto:  $1 \times 10^7$  UFC/tubo [ $5 \times 10^5$  UFC/ml en 20ml]; inóculo bajo:  $1 \times 10^5$  UFC [ $5 \times 10^3$  UFC/ml en 20ml] diferentes frente a los aislados clínicos C59, C61, C74, P36 y P45; y a las cepas mutantes de laboratorio  $\Delta glpT$ ,  $\Delta mutS$  y  $\Delta mutS-glpT$ . Este ensayo se realizó durante 24 horas a concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L (la concentración más baja en la categoría de resistencia según los puntos de corte de EUCAST)<sup>515</sup> y 307 mg/L ((concentración plasmática máxima media en humanos observada en estado estacionario después de una dosis de fosfomicina de 8g/q8h)).

Posteriormente se evaluó la actividad de fosfomicina a las mismas concentraciones incrementando el tiempo de exposición al antimicrobiano a 48 horas, partiendo de la concentración bacteriana de alto inóculo. Estas mismas condiciones se evaluaron a concentraciones de amikacina de 16 mg/L (concentración inferior de amikacina en la categoría de no sensibles según los puntos de corte de EUCAST)<sup>515</sup> y 45 mg/L (concentración plasmática máxima media en humanos en estado estacionario tras una dosis de amikacina de 15mg/kg/24h), así como frente a la combinación de ambos antimicrobianos (fosfomicina-amikacina: 64 mg/l-16 mg/l). Se utilizó un control sin antimicrobiano en todos los ensayos por cada una de las cepas.

Los ensayos de 48 horas se realizaron frente a los aislados clínicos que presentaban frecuencias de aparición de mutantes más elevadas (C59, C61, C74, P36 y P45), así como frente a los aislados clínicos heterorresistentes normomutadores (Ec3203 y Ec50406). Se utilizó la cepa ATCC 25922 como control en las distintas condiciones estudiadas.

El protocolo realizado se detalla a continuación:

- Inocular tubos de 50 mL con un volumen de 20 mL de MHB obteniendo un volumen final de alto y bajo inóculos bacteriano.
- Mantener en agitación a 37°C durante 24 o 48 horas
- Cuantificar el crecimiento bacteriano a las 0 horas, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas +/- 48 horas en MHA sin antimicrobiano (cálculo de la población bacteriana total) y con antimicrobiano (cálculo de la población viable no sensible):
  - lavaron en solución salina para evitar el efecto de arrastre
  - Diluciones
  - Volumen de siembra. Límite de detección del ensayo:  $1,3 \log_{10}$  UFC/ml.
- Cuando se observó crecimiento al finalizar las 24 o 48 horas, se seleccionaron hasta cinco colonias para evaluar las CMI de fosfomicina mediante tiras de gradiente de los respectivos antimicrobianos, tras pases sucesivos en MHA sin antimicrobiano.

### **Modelo de infección *in vitro* en cartuchos de fibra hueca (HFIM)**

Para evaluar el efecto de las dosis humanizadas de fosfomicina y amikacina solas y en combinación, se desarrollaron respectivos HFIM frente a los aislados heterorresistentes a fosfomicina hipermutadores (C59, C61, C74 y P45) y normomutadores (Ec3203 y Ec50406). Se utilizó la cepa *E. coli* ATCC2592 como control.

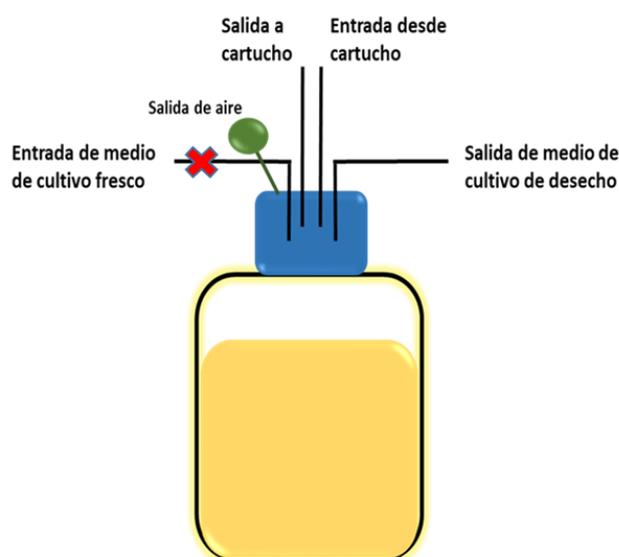
Las concentraciones y la proporción de los medicamentos *in vivo* cambian con el tiempo. Para simular mejor las condiciones cambiantes de los fármacos, se han diseñado los modelos farmacocinéticos. A continuación, se describe el procedimiento y detalles de la preparación de las distintas partes de los modelos que se realizaron en este trabajo:

- **Cartucho o biorreactor:** los cartuchos contienen miles de fibras huecas de aproximadamente 200 micras de diámetro con un tamaño de poros que permite que no penetren las bacterias en las fibras, pero al mismo tiempo favorece el paso de los fármacos y nutrientes a través de estos. Las bacterias se inoculan en el espacio exterior de las fibras, denominado espacio extracapilar. Este espacio es aquel que se encuentra fuera de las fibras y dentro de la carcasa del cartucho. El medio de cultivo procedente del compartimento central recircula continuamente a través del interior de las fibras proporcionando oxígeno y nutrientes, así como las concentraciones deseadas de fosfomicina y/o amikacina. En nuestro trabajo se utilizaron como biorreactores hemofiltros de polietersulfona (Aquamax HF03, Nikkiso, Bélgica). El espacio extracapilar de cada biorreactor se inoculó con 50 mL de suspensión bacteriana utilizando un inóculo de  $\sim 10^6$  UFC/ml y se incubó a 37°C.
- **Reservorio o compartimento central:** se trata del lugar donde se crean las condiciones necesarias a replicar en el espacio extracapilar del biorreactor (lugar de simulación de la infección bacteriana). En él se añade la fosfomicina y la amikacina con una jeringa controlada por una bomba para simular la curva de absorción del antimicrobiano a la vez que se añade medio de cultivo fresco sin antimicrobiano desde otro depósito a una velocidad determinada que permita simular la curva de absorción y eliminación. A la misma velocidad que se añade el medio fresco se elimina al compartimento de desechos el medio sobrante para mantener un volumen constante en el compartimento central. En este trabajo, se ajustaron los perfiles de tiempo-concentración de fosfomicina y amikacina para simular los perfiles observados en estudios previos en muestras de plasma humano tras la administración intravenosa de 8g/8h y 15mg/kg/24h, respectivamente, ambos administrados en una hora en infusión continua.<sup>517-520</sup> Dado que se ha observado en otros estudios que la unión a proteínas plasmáticas de la fosfomicina es insignificante y la de la amikacina oscila entre el 0% y el

## MATERIAL Y MÉTODOS

11%,<sup>517,518,520</sup> en este trabajo se asume que las concentraciones de ambos fármacos utilizadas en el HFIM constituyen la fracción no unida.

Con respecto a la preparación del compartimento central, es importante la realización de 5 puertos de entrada en el propio tapón del frasco para la entrada y salida de los tubos con distintas conexiones y longitudes ajustables. Es importante mantener el volumen constante en este compartimento, por lo que el tubo de salida al compartimento de desecho debe estar en contacto constante con el medio de cultivo. Por el contrario, el tubo de salida de aire debe evitarse su contacto con el medio de cultivo (Figura 33).



**Figura 33.** Compartimento central de HFIM realizado en frasco autoclavable para medio de cultivo. Se observan los distintos puertos de entrada y salida en el tapón: puerto de entrada de medio de cultivo fresco (en este puerto se añade el antimicrobiano: cruz de color rojo), puerto de eliminación de medio de desecho, puerto de salida al biorreactor, puerto de entrada del biorreactor y puerto de normalización de presiones o salida de aire.

- **Bombas:** Cada biorreactor requiere de una bomba peristáltica (MasterFlex L/S, ColePalmer, Vernon Hills, Estados Unidos) para añadir y retirar el medio de cultivo diluyente el medio del depósito central. La velocidad de las bombas son la clave para ajustar el modelo *in vitro* al modelo farmacocinético deseado. En este trabajo, se ajustó a un modelo farmacocinético *in vitro* de un compartimento para fosfomicina y amikacina solas y en combinación. Basándose en las simulaciones *in silico* en ADAPT, se ejecutaron los perfiles de tiempo-concentración de

## MATERIAL Y MÉTODOS

los antimicrobianos en el modelo. Previamente, se calcularon los distintos parámetros para poder ejecutar las simulaciones farmacocinéticas humanizadas en base a las características particulares de nuestro modelo:

- Para calcular la velocidad de infusión y eliminación del fármaco en el modelo *in vitro*, se ajustaron las diferentes velocidades de las bombas de fluidos teniendo en cuenta los valores séricos en humanos ( $C_{m\acute{a}x}$ ), así como la vida media ( $t_{1/2}$ ) de sendos antimicrobianos (fosfomicina  $t_{1/2}$ : 4 horas, amikacina  $t_{1/2}$ : 2 horas).<sup>517,518,520</sup>
- En un primer paso, se calculó la dosis inicial aproximada de cada uno de los fármacos necesaria para alcanzar respectivas  $C_{m\acute{a}x}$  (equivalentes a las observadas en humanos) en el compartimento central del HFIM. Es decir, si la  $C_{m\acute{a}x}$  de fosfomicina y amikacina en suero son 307 mg/l y 45 mg/l, respectivamente; se calcula la cantidad de antimicrobiano aproximada que hay que inyectar en el compartimento central para alcanzar esa misma concentración en un volumen total de 300 ml. Una vez obtenida la cantidad de antimicrobiano para alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$  en el modelo, será de referencia para las simulaciones de las curvas de concentración-tiempo en ADAPT.
- Posteriormente, para calcular el aclaramiento de cada uno de los fármacos en nuestro modelo y así simular la farmacocinética humana de eliminación de los fármacos, se tuvo en cuenta el volumen de distribución del fármaco (volumen del compartimento central) y la  $t_{1/2}$  en la siguiente fórmula:

$$Cl = \frac{\ln 2 * Vd}{t_{1/2}}$$

*Cl*: aclaramiento del fármaco

*Vd*: volumen de distribución del fármaco

$t_{1/2}$ : vida media

La dosis y velocidad de administración del fármaco con  $t_{1/2}$  más larga (fosfomicina) utilizada en el modelo combinado se calculó en base a la del fármaco de  $t_{1/2}$  más corta (amikacina).<sup>521</sup>

- A partir de los valores de aclaramiento obtenidos para cada uno de los fármacos, se obtiene la velocidad de eliminación (*kel*) en el modelo HFIM, o lo que es lo mismo, la velocidad de la bomba que introduce medio de cultivo en nuestro compartimento central para diluir el fármaco y simular la eliminación del mismo. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$kel = \frac{Cl}{Vd}$$

*kel*: constante de eliminación

*Cl*: aclaramiento del fármaco

*Vd*: volumen de distribución

- Por último, teniendo en cuenta la forma de administración de los fármacos (infusión continua en una hora), se introdujeron los datos en el programa ADAPT para obtener los distintos parámetros de nuestro modelo humanizado.
- Cálculo de velocidad de bomba de inyección: diámetro de jeringuilla y tiempo de infusión + eliminación.
- Cálculo de cantidad de fármaco según volumen de jeringuilla
- Validación del modelo: el modelo fue validado utilizando espectrometría de masas (UHPLC/MS-MS Triple-Quadrupole 6420 mass spectrometer; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) para valorar el correcto ajuste de la curva farmacocinética para cada uno de los fármacos. Este modelo farmacocinético de un solo compartimento fue posteriormente ejecutado en Pmetrics.
- Toma de muestras: se tomaron muestras de los distintos modelos en el inicio del ensayo (0 horas), a las 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h y 72 h. A continuación, se sembraron diluciones seriadas (1:10-1:10<sup>7</sup>) en placas de MHA con y sin antimicrobianos (fosfomicina a 64 mg/L o amikacina a 32 mg/L) para tener en cuenta la población bacteriana total y resistente, respectivamente. El mismo método se llevó a cabo para la combinación de ambos antimicrobianos.

## RESULTADOS

### IV. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

#### 1. Cepas de trabajo. Construcción de cepas mutantes de delección doble.

A través de la eliminación de los casetes de resistencia a kanamicina en las cepas de laboratorio de la colección KEIO junto con la técnica de transducción con el fago P1, se obtuvieron un total de 32 mutantes de delección génica doble sobre un fondo isogénico en la cepa *E. coli* BW25113 (Tabla 12):

**Tabla 12.** Cepas mutantes de laboratorio derivadas de *E. coli* BW25113 de la colección KEIO con doble delección de genes cromosómicos (genes del sistema de reparación del ADN de *E. coli*<sup>406</sup> junto con genes relacionados con la resistencia a fosfomicina<sup>146</sup>).

Cepas de <i>E. coli</i> BW25113 mutantes de delección doble				
Genes del sistema de reparación del ADN	Genes asociados con la resistencia a fosfomicina			
	$\Delta cyaA$	$\Delta glpT$	$\Delta ptsI$	$\Delta uhpT$
$\Delta dnaQ$	$\Delta dnaQ-cyaA$	$\Delta dnaQ-glpT$	$\Delta dnaQ-ptsI$	$\Delta dnaQ-uhpT$
$\Delta mutH$	$\Delta mutH-cyaA$	$\Delta mutH-glpT$	$\Delta mutH-ptsI$	$\Delta mutH-uhpT$
$\Delta mutL$	$\Delta mutL-cyaA$	$\Delta mutL-glpT$	$\Delta mutL-ptsI$	$\Delta mutL-uhpT$
$\Delta mutM$	$\Delta mutM-cyaA$	$\Delta mutM-glpT$	$\Delta mutM-ptsI$	$\Delta mutM-uhpT$
$\Delta mutS$	$\Delta mutS-cyaA$	$\Delta mutS-glpT$	$\Delta mutS-ptsI$	$\Delta mutS-uhpT$
$\Delta mutT$	$\Delta mutT-cyaA$	$\Delta mutT-glpT$	$\Delta mutT-ptsI$	$\Delta mutT-uhpT$
$\Delta mutY$	$\Delta mutY-cyaA$	$\Delta mutY-glpT$	$\Delta mutY-ptsI$	$\Delta mutY-uhpT$
$\Delta uvrD$	$\Delta uvrD-cyaA$	$\Delta uvrD-glpT$	$\Delta uvrD-ptsI$	$\Delta uvrD-uhpT$

#### 2. Sensibilidad de las cepas bacterianas a los antimicrobianos de estudio

##### A) Sensibilidad a fosfomicina

###### Cepas de laboratorio

###### - Cepas de colección:

La cepa de *E. coli* ATCC25922 obtuvo valores de CMI por microdilución en caldo y por difusión con tiras de gradiente inferiores a 4 mg/L, al igual que la cepa control *E. coli* BW25113. En esta última, los valores de CMI fueron de 2 mg/L cuando se realizó el ensayo mediante dilución en agar, coincidiendo con el valor obtenido por microdilución en caldo. En todos los casos, las cepas control se encontraron en el rango de categoría clínica considerado como sensible siguiendo los puntos de corte establecidos en material y métodos.

## RESULTADOS

En ambas cepas de control, se observaron subpoblaciones mediante el método de tiras de gradiente en el rango de concentraciones de 0,5 mg/L a 1,5 mg/L.

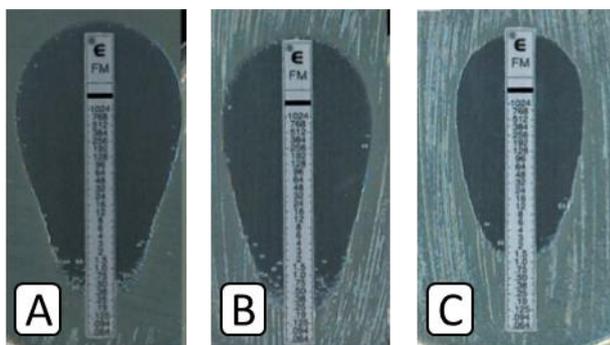
La cepa control *E. coli* ATCC25922 mostró valores de CMI de fosfomicina por los distintos métodos dentro del rango de establecido por CLSI al exponer esta cepa a este antimicrobiano.<sup>247</sup>

### - Cepas comerciales isogénicas:

#### Cepas mutantes simples

- *Mutantes con delección de genes de resistencia a fosfomicina* (Tabla 13): las cepas con mutaciones en los genes  $\Delta glpT$ ,  $\Delta cyoA$  y  $\Delta ptsI$  mostraron valores de CMI dentro del rango establecido como categoría clínica sensible por ambos métodos utilizados, con valores inferiores a 32 mg/L. Las cepas  $\Delta glpT$ ,  $\Delta ptsI$  y  $\Delta cyoA$  mostraron valores de CMI cercanos a los observados en las cepas de control en el ensayo de microdilución, con un incremento de la CMI que variaba entre una y dos diluciones ( $\log_2$ ), dependiendo del mutante. En cambio, al observar los resultados de CMI obtenidos mediante difusión con tiras de gradiente en la población principal, los mutantes  $\Delta glpT$  y  $\Delta ptsI$  mantuvieron diferencias de CMI de  $\pm 2$  diluciones ( $\log_2$ ) respecto a las cepas control; sin embargo, el mutante  $\Delta cyoA$ , presentó un incremento de 5 diluciones ( $\log_2$ ) respecto a los controles (CMI= 16 mg/L). Independientemente del método utilizado y de la inclusión o exclusión de la CMI de las subpoblaciones, los mutantes  $\Delta glpT$ ,  $\Delta ptsI$  y  $\Delta cyoA$  se clasificaron dentro de la categoría clínica de sensibles al igual que las dos cepas control utilizadas.

El fenotipo observado mediante tiras de difusión en gradiente se observa en la Figura 34.



**Figura 34.** Ensayo en tira de gradiente de fosfomicina para: **A)** *E. coli* BW25113 silvestre (*wt*), **B)**  $\Delta glpT$ , **C)**  $\Delta ptsI$ .

## RESULTADOS

- *Mutantes con delección de genes de reparación del ADN de E. coli* (Tabla 13): la mayoría de las cepas mostraron valores de CMI inferiores al punto de corte de resistencia clínica (rango de CMI: 2 mg/L-32 mg/L), exceptuando  $\Delta dnaQ$  y  $\Delta mutS$ , que obtuvieron valores de 256 mg/L y 64 mg/L, respectivamente. Estos valores de CMI descendieron cuando se realizó el ensayo de sensibilidad mediante tiras de gradiente excluyendo las subpoblaciones, siendo inferiores a 4 mg/L en todos los casos. No obstante, no se observaron subpoblaciones a concentraciones de fosfomicina superiores a 32mg/L en la mayoría de las cepas mutantes, excepto en  $\Delta dnaQ$ , cuyas subpoblaciones alcanzaron valores de CMI de hasta 512mg/L.

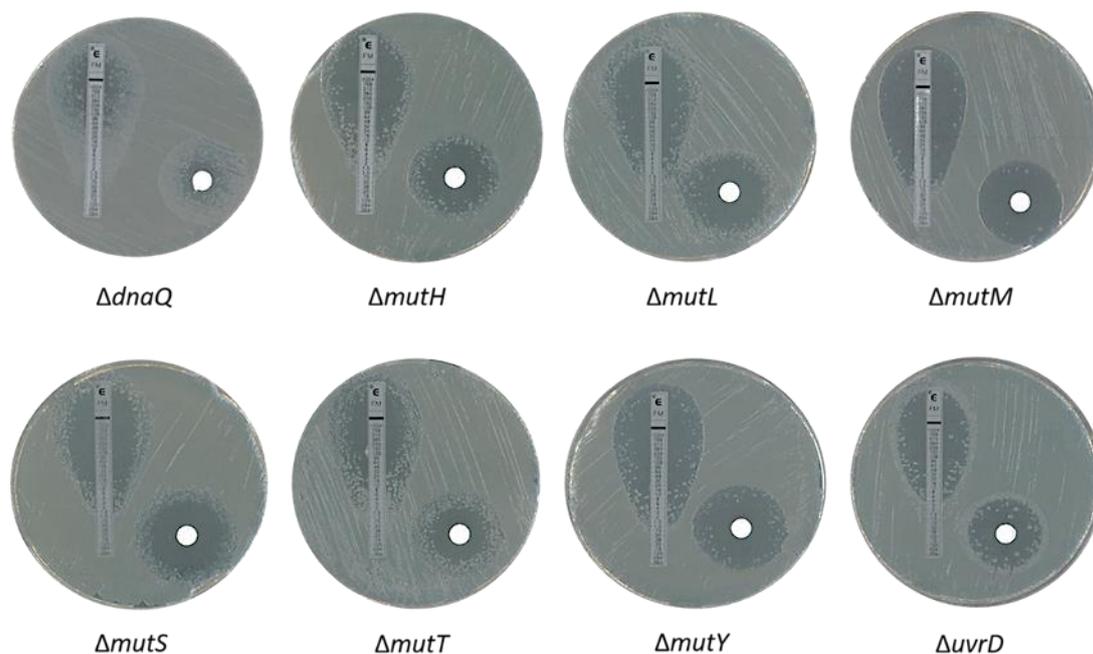
Teniendo en cuenta los puntos de corte clínico para este antimicrobiano, las cepas  $\Delta mutS$  y  $\Delta dnaQ$  fueron consideradas resistentes mediante microdilución; sin embargo, al considerar la CMI de la población principal, ambas se clasificaron como sensibles.

De forma general, estos aislados mostraron valores de CMI similares por microdilución con diferencias de  $\pm 1$  dilución ( $\log_2$ ) a las observadas para las subpoblaciones utilizando la difusión con tiras de gradiente, excepto las cepas mutantes  $\Delta mutS$  y  $\Delta mutM$ , con diferencias superiores de  $\pm 2$  y 3 diluciones ( $\log_2$ ), respectivamente.

Las categorías clínicas al considerar la CMI de las subpoblaciones coincidían con las categorías de la microdilución, excepto en el mutante  $\Delta mutS$ , cuyas subpoblaciones en la tira de gradiente no crecían a concentraciones superiores a los 16 mg/L.

Los resultados obtenidos mediante tiras de gradiente se observan en la Figura 35.

## RESULTADOS



**Figura 35.** Fenotipo de heteroresistencia a fosfomicina en ensayo de sensibilidad con tiras de gradiente y disco-difusión en cepas mutantes de deleción simple de genes de reparación del ADN.

**Tabla 13.** Valores de CMI a fosfomicina mediante microdilución y método de difusión con tiras de gradientes en cepas de *E. coli* BW25113 de colección isogénica con mutación de deleción simple para genes en relación con el sistema de reparación del ADN y con la resistencia a fosfomicina.

CMI a fosfomicina (mg/L)			
Cepas bacterianas	Microdilución (CC)	Tiras de gradiente	
		Población principal (CC)	Subpoblaciones (CC)
<b>Mutantes de deleción simple de genes de reparación del ADN</b>			
<i>ΔdnaQ</i>	256 (R)	1 (S)	512(R)
<i>ΔmutH</i>	16 (S)	2 (S)	32 (S)
<i>ΔmutL</i>	16 (S)	1 (S)	8 (S)
<i>ΔmutM</i>	2 (S)	1 (S)	16 (S)
<i>ΔmutS</i>	64 (R)	1 (S)	16 (S)
<i>ΔmutT</i>	32 (S)	1 (S)	24 (S)
<i>ΔmutY</i>	32 (S)	1 (S)	16 (S)
<i>ΔuvrD</i>	32 (S)	1 (S)	16 (S)

Continuación

## RESULTADOS

Tabla 13. Continuación

CMI a fosfomicina (mg/L)			
Cepas bacterianas	Microdilución (CC)	Tiras de gradiente	
		Población principal (CC)	Subpoblaciones (CC)
<b>Mutantes de delección simple relacionados con resistencia a fosfomicina</b>			
<i>ΔglpT</i>	4 (S) (subp. 128)	0,25 (S)	1,5 (S)
<i>ΔuhpT</i>	128 (R)	16 (S)	64(R)*
<i>ΔcyaA</i>	8 (S)	16 (S)	NP
<i>ΔptsI</i>	4 (S)	1,5 (S)	NP
<b>Cepas control</b>			
<b>ATCC25922</b>	2 (S)	0,5 (S)	1,5
<b>BW25113</b>	2 (S)	0,5 (S)	1,5

- **CC:** Categoría clínica
- **Subp. 128:** subpoblación (se observa crecimiento bacteriano a una concentración de 128 mg/l, con ausencia del mismo en el rango de concentraciones desde su valor de CMI hasta 64 mg/l. Este resultado se observó en todas las réplicas del ensayo).
- \*Crecimiento de subpoblación carente de solución de continuidad, considerándose el valor de CMI de la misma siguiendo las normas de EUCAST.
- **NP:** No presencia

### Cepas mutantes dobles

Cuando se realizó el estudio de sensibilidad de estas cepas mediante microdilución, el 81,25% (26/32) crecieron a concentraciones de fosfomicina que superaban los 32 mg/L, clasificándose dentro de la categoría clínica de resistentes (Tabla 13). Mediante tiras de gradiente, cuando se tuvo en cuenta la CMI que alcanzaron las subpoblaciones del interior de la elipse de inhibición, el 78% (25/32) de las cepas alcanzaron valores de CMI por encima del punto de corte de sensibilidad clínica. Se observaron discrepancias en la clasificación de categorías clínicas en 3 cepas mutantes: *ΔmutM-glpT*, *ΔmutM-glpT* y *ΔmutS-cyaA*.

Sin embargo, cuando se ignoraron las subpoblaciones en el método de difusión mediante tiras de gradiente, el porcentaje de cepas resistentes disminuyó hasta un 6,25% (2/32). Del mismo modo, se observó un aumento de las discrepancias entre los resultados de categoría clínica obtenidos mediante ambos métodos. En este caso, 24 de los dobles mutantes considerados dentro de la categoría de sensibles por este método, fueron considerados como resistentes mediante microdilución en caldo. En un 22% (7/32) coincidió la categoría clínica obtenida por ambos métodos incluyendo o no las subpoblaciones de la elipse de inhibición en la difusión con tira de gradiente.

## RESULTADOS

**Tabla 14.** Valores de CMI a fosfomicina mediante microdilución y método de difusión con tiras de gradientes en cepas de *E. coli* BW25113 de colección isogénica con mutaciones dobles de delección para genes en relación con el sistema de reparación del ADN y con la resistencia a fosfomicina.

CMI a fosfomicina (mg/L)							
Aislados clínicos	Microdilución (CC)	Tiras de gradiente		Aislados clínicos	Microdilución (CC)	Tiras de gradiente	
		Población Principal (CC)	Subpoblaciones			Población Principal (CC)	Subpoblaciones
<i>ΔdnaQ-glpT</i>	≥1024 (R)	4 (S)	1024 (R)	<i>ΔmutS-glpT</i>	256 (R)	1,5 (S)	128 (R)
<i>Δdna Q-uhpT</i>	512 (R)	128 (R)	1024 (R)	<i>ΔmutS-uhpT</i>	256 (R)	16 (S)	512 (R)
<i>ΔdnaQ-cyaA</i>	≥1024 (R)	3 (S)	1024 (R)	<i>ΔmutS-cyaA</i>	256 (R)	12(S)	16 (S)
<i>ΔdnaQ-ptsI</i>	≥1024 (R)	2 (S)	1024 (R)	<i>ΔmutS-ptsI</i>	512 (R)	2 (S)	512 (R)
<i>ΔmutH-glpT</i>	256 (R)	0,5 (S)	256 (R)	<i>ΔmutT- glpT</i>	256 (R)	0,5 (S)	512 (R)
<i>ΔmutH-uhpT</i>	256 (R)	16 (S)	256 (R)	<i>ΔmutT- uhpT</i>	512 (R)	16 (S)	256 (R)
<i>ΔmutH-cyaA</i>	256 (R)	1 (S)	128 (R)	<i>ΔmutT-cyaA</i>	256 (R)	12 (S)	128 (R)
<i>ΔmutH-ptsI</i>	256 (R)	1.5 (S)	512 (R)	<i>ΔmutT-ptsI</i>	512 (R)	2 (S)	192 (R)
<i>ΔmutL-glpT</i>	256 (R)	1.5 (S)	384 (R)	<i>ΔmutY- glpT</i>	256 (R)	0,75 (S)	128 (R)
<i>ΔmutL-uhpT</i>	256 (R)	16 (S)	256 (R)	<i>ΔmutY- uhpT</i>	256 (R)	64 (R)	1024 (R)
<i>ΔmutL-cyaA</i>	128 (R)	2 (S)	256 (R)	<i>ΔmutY-cyaA</i>	16 (S)	4 (S)	8 (S)
<i>ΔmutL-ptsI</i>	256 (R)	1,5 (S)	256 (R)	<i>ΔmutY-ptsI</i>	2 (S)	0,25 (S)	2 (S)
<i>ΔmutM- glpT</i>	1 (S) (subp. 128)	0,5 (S)	128 (R)	<i>ΔuvrD- glpT</i>	256 (R)	0,38 (S)	384 (R)
<i>ΔmutM- uhpT</i>	128 (R)	16 (S)	96 (R)	<i>ΔuvrD- uhpT</i>	512 (R)	12 (S)	192 (R)
<i>ΔmutM-cyaA</i>	128 (R)	1 (S)	4 (S)	<i>ΔuvrD-cyaA</i>	32 (S)	1,5 (S)	32 (S)
<i>ΔmutM-ptsI</i>	16 (S) (subp. 64)	1 (S)	2 (S)	<i>ΔuvrD-ptsI</i>	32 (S)	1 (S)	24 (S)

**CC:** Categoría clínica

**Subp. 64:** subpoblación (se observa crecimiento bacteriano a una concentración de 64 mg/L, con ausencia del mismo en el rango de concentraciones desde su valor de CMI hasta 32 mg/L. Este resultado se observó en todas las réplicas del ensayo).

**Subp. 128:** subpoblación (se observa crecimiento bacteriano a una concentración de 128 mg/L, con ausencia del mismo en el rango de concentraciones desde su valor de CMI hasta 64 mg/L. Este resultado se observó en todas las réplicas del ensayo).

## RESULTADOS



*ΔdnaQ-ΔglpT*



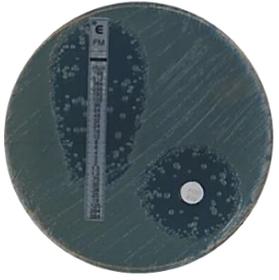
*ΔdnaQ-ΔuhpT*



*ΔdnaQ-ΔcyaA*



*ΔdnaQ-ΔptsI*



*ΔmutH-ΔglpT*



*ΔmutH-ΔuhpT*



*ΔmutH-ΔcyaA*



*ΔmutH-ΔptsI*



*ΔmutL-ΔglpT*



*ΔmutL-ΔuhpT*



*ΔmutL-ΔcyaA*



*ΔmutL-ΔptsI*



*ΔmutM-ΔglpT*



*ΔmutM-ΔuhpT*



*ΔmutM-ΔcyaA*



*ΔmutM-ΔptsI*



*ΔmutS-ΔglpT*



*ΔmutS-ΔuhpT*

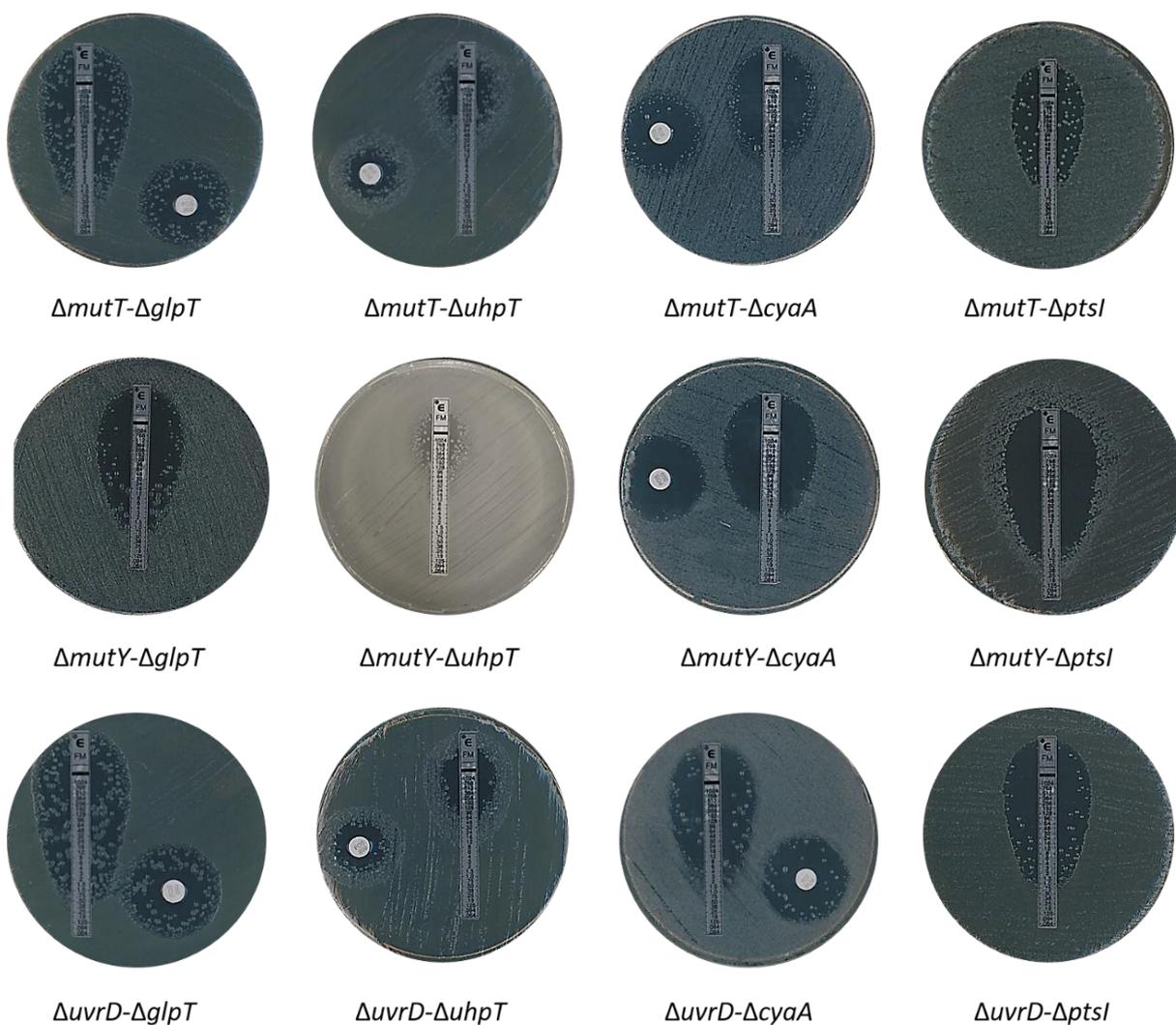


*ΔmutS-ΔcyaA*



*ΔmutS-ΔptsI*

## RESULTADOS



**Figura 36.** Fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina de cepas mutantes dobles de genes en relación con la resistencia a fosfomicina y de reparación del ADN de *E. coli* en un ensayo de difusión con tiras de gradiente ± difusión con disco.

### Cepas clínicas

#### - Aislados heterorresistentes hipermutadores

Todos los aislados clínicos considerados como mutantes fuertes según el ensayo con rifampicina (ver apartado de resultado de ensayo de frecuencia de aparición de mutantes con rifampicina) fueron sensibles mediante tiras de gradiente, observándose subpoblaciones dentro de la elipse de inhibición. En ningún aislado, las subpoblaciones lograron alcanzar valores de CMI superiores al punto de corte clínico. El rango máximo entre los valores de CMI de la población principal y los observados para las subpoblaciones se determinó en los aislados C59, C61, C74, P17 y P45 con una diferencia igual o superior a 7 diluciones ( $\log_2$ ); y la menor, en C31, P4 y las cepas control,

## RESULTADOS

con diferencias inferiores o iguales a 2 diluciones ( $\log_2$ ). El valor más elevado de CMI observado para las subpoblaciones fue de 32 mg/L, detectado en los aislados C61 y C74.

Mediante el método de microdilución, el porcentaje de aislados clínicos considerados como resistentes aumentó de un 0% con el método anterior hasta un 36% (4/11), alcanzando valores de CMI de hasta 256 mg/L en los aislados C61 y C74.

Los aislados cuya CMI a fosfomicina se realizó mediante dilución en agar (C59, C61, C74 y P45) obtuvieron valores de CMI en un rango que variaba de 32 mg/L a 128 mg/L (tabla 15). Las categorías clínicas en las que se clasificaron los aislados por este método se correlacionaron en todos los casos con las obtenidas mediante microdilución; sin embargo, únicamente el aislado C59 coincidió con la categoría obtenida mediante tiras de gradiente cuando se ignoraban las subpoblaciones dentro de la elipse de inhibición.

### - **Aislados heteroresistentes normomutadores**

En los aislados clínicos normomutadores (ver apartado de resultados de frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina), Ec3203 y Ec50406, cuando se incluyeron los valores de CMI para la población principal, se observaron 11 y 6 diluciones ( $\log_2$ ) de diferencia entre los valores de CMI obtenidos mediante tira de gradiente y microdilución, respectivamente. Los valores de CMI obtenidos mediante microdilución coincidieron con los obtenidos al incluir la CMI de las subpoblaciones.

En base a los puntos de corte clínicos, ambos aislados fueron considerados como resistentes (ver valores de CMI en tabla 15) mediante microdilución; sin embargo, al excluir las subpoblaciones de la elipse de inhibición, se clasificaron como sensibles (ver valores de CMI en tabla 15).

Ambos aislados obtuvieron valores de CMI mediante dilución en agar de 256 mg/L, coincidiendo con la categoría clínica de resistentes coincidiendo con el resultado de la microdilución.

### **Correlación entre los resultados de CMI a fosfomicina mediante microdilución en caldo y difusión mediante tiras de gradiente.**

El análisis de correlación de Pearson se realizó utilizando la herramienta informática GraphPad Prism. El cálculo de este índice identificó una asociación significativa entre los valores de CMI de fosfomicina realizados por microdilución frente a los obtenidos mediante difusión con tiras de gradiente cuando incluían los valores de CMI de las subpoblaciones presentes en la elipse de inhibición ( $r=0,78$ ; IC 95% 0,65- 0,86;  $P<0,0001$ ). Sin embargo, no se encontró relación cuando se compararon los valores de CMI obtenidos mediante microdilución frente a los valores de CMI con tiras de gradiente de la población principal (excluyendo la CMI de las subpoblaciones) ( $r=0,09$ ; IC 95% -0,17 a 0,34;  $P=0,49$ ).

## RESULTADOS

### B) Sensibilidad a amikacina

#### Cepas de laboratorio

##### - Cepas de control

La cepa utilizada para control del estudio de sensibilidad a amikacina fue *E coli* ATCC25922, la cual presentó valores de CMI de 2 mg/L mediante las dos técnicas utilizadas, lo que se consideró como sensible a este antimicrobiano. Con este valor de CMI se encontró dentro del rango de valores establecido para esta combinación de cepa-antimicrobiano según el documento de CLSI.<sup>247</sup>

#### Cepas clínicas

##### - Aislados heterorresistentes hipermutadores

Todos los aislados fueron sensibles a amikacina por ambos métodos con valores de CMI por microdilución entre 2 y 8 mg/L, y por tiras de gradiente entre 1 y 2 mg/L. Aunque se observaron diferencias de hasta 2 diluciones ( $\log_2$ ) en aislados como C59, C61 y C74; no hubo discrepancias entre la clasificación de las categorías clínicas según el método utilizado. No se observaron subpoblaciones dentro de las elipses de inhibición en ninguno de los aislados.

##### - Aislados heterorresistentes normomutadores

Ambos aislados obtuvieron valores de CMI inferiores al punto de corte por microdilución en caldo y difusión con tiras de gradiente, siendo clasificados como sensibles. En ninguno de los dos aislados se observaron subpoblaciones en el interior de las elipses de inhibición, presentando diferencias en la CMI de 1-2 diluciones ( $\log_2$ ) entre ambos métodos.

## RESULTADOS

**Tabla 15.** CMI de fosfomicina y amikacina mediante microdilución y método de difusión con tiras de gradientes en cepas clínicas de *E. coli* BW25113 heterorresistentes a fosfomicina (hipermutadoras y no hipermutadoras) y en cepas de control ATCC25922 y BW25113. CMI a fosfomicina mediante dilución en agar con G6P a 25 mg/L.

	CMI de fosfomicina				CMI de amikacina		
	Microdilución (CC)	Dilución en agar (CC)	Tiras de gradiente		Microdilución (CC)	Tiras de gradiente	
			Población principal (CC)	Subp.		Población principal (CC)	Subp.
<b>Cepas control</b>							
<b>ATCC25922</b>	2 (S)	2 (S)	0,5 (S)	1,5	2 (S)	2 (S)	NP
<b>BW25113</b>	2 (S)	NR	0,5 (S)	1,5	NR	NR	NR
<b>Aislados clínicos hipermutadores</b>							
<b>C31</b>	2 (S)	NR	1 (S)	4	NR	NR	NR
<b>C59</b>	16 (S)	32 (S)	0,125 (S)	16	8 (S)	2 (S)	NP
<b>C61</b>	256 (R)	64 (R)	0,25 (S)	32	8 (S)	2 (S)	NP
<b>C74</b>	256 (R)	128 (R)	0,25 (S)	32	8 (S)	2 (S)	NP
<b>P4</b>	1 (S)	NR	0,75 (S)	2	NR	NR	NR
<b>P17</b>	32 (S)	NR	0,06 (S)	12	NR	NR	NR
<b>P36</b>	32 (S)	NR	0,125 (S)	6	NR	NR	NR
<b>P39</b>	8 (S)	NR	0,125 (S)	12	NR	NR	NR
<b>P44</b>	64 (R)	NR	0,25 (S)	12	NR	NR	NR
<b>P45</b>	64 (R)	64 (R)	0,06 (S)	12	2 (S)	1 (S)	NP
<b>P56</b>	4 (S)	NR	0,125 (S)	1	NR	NR	NR
<b>Aislados clínicos heterorresistentes</b>							
<b>Ec3203</b>	512 (R)	256 (R)	0,25 (S)	512	4 (S)	2 (S)	NP
<b>Ec50406</b>	≥512 (R)	256 (R)	4 (S)	512	4 (S)	1 (S)	NP

**CC:** Categoría clínica

**Subp.:** subpoblación

**NR:** no realizado

**NP:** no presencia

### 3. Frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina, fosfomicina y amikacina.

La figura 37(a) muestra los resultados de la estimación de la frecuencia de mutantes a rifampicina (100 mg/L) y a fosfomicina (50 mg/L y 200 mg/L) y la figura 37(b) la correlación entre las frecuencias mutantes a rifampicina y fosfomicina. La figura 38 muestra los valores de frecuencia de aparición de mutantes de aquellos aislados a los que se les realizó este ensayo con

## RESULTADOS

el antimicrobiano, amikacina, a una concentración 32 mg/L, mostrando además los valores obtenidos para rifampicina y fosfomicina a sus respectivas concentraciones.

De forma general, las cepas con frecuencia de mutantes para rifampicina iguales o superiores a  $1 \times 10^{-7}$ , clasificadas como mutantes fuertes, mostraron una mayor probabilidad de seleccionar mutantes a fosfomicina a concentraciones más elevadas.

Todos los aislados clínicos mutantes fuertes mostraron mutantes resistentes a fosfomicina capaces de crecer a 50mg/L de fosfomicina. Además, los aislados C59, C61, C74, P44 y P45 fueron capaces de crecer hasta concentraciones de 200mg/L de fosfomicina.

Con respecto a los resultados obtenidos para las cepas de laboratorio mutantes de delección simple,  $\Delta mutH$ ,  $\Delta mutS$  o  $\Delta mutY$ , a pesar de ser mutantes fuertes por sus respectivos valores de frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina, no fueron capaces de seleccionar subpoblaciones resistentes a fosfomicina a concentraciones de 200 mg/L.

Los aislados clínicos que presentaban frecuencias de mutantes para rifampicina inferiores a  $1 \times 10^{-7}$ , no lograron seleccionar poblaciones resistentes a fosfomicina a concentraciones iguales o superiores a 50 mg/L; sin embargo, el mutante simple  $\Delta mutM$ , a pesar de mostrar un fenotipo mutante débil, similar al fenotipo de los aislados clínicos C31, P4 y P56, con frecuencias de mutantes medias para rifampicina de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  (rango DE:  $3 \times 10^{-8}$  a  $1,67 \times 10^{-8}$ ), consiguió seleccionar subpoblaciones capaces de sobrevivir en 200 mg/L de fosfomicina. De todas las cepas incluidas en este ensayo, la cepa  $\Delta dnaQ$  tuvo los valores de frecuencia de mutantes más elevados para rifampicina (media  $1,25 \times 10^{-5}$ ; DE  $1,09 \times 10^{-5}$ ). En relación con las frecuencias de mutantes para el antimicrobiano, fosfomicina, los valores más elevados para las concentraciones de 50mg/L y 200mg/L se observaron en el mutante de delección simple  $\Delta uhpT$  [ $2,51 \times 10^{-2}$  (DE  $4,99 \times 10^{-2}$ );  $1,35 \times 10^{-6}$  (DE  $7,90 \times 10^{-7}$ )] junto con  $\Delta dnaQ$  [ $5,11 \times 10^{-3}$  (DE  $9,67 \times 10^{-3}$ );  $2,10 \times 10^{-6}$  (DE  $2,11 \times 10^{-6}$ )].

Posteriormente, en el análisis de correlación de Pearson se identificó una asociación significativa entre las frecuencias de mutantes resistentes a fosfomicina y las resistentes a rifampicina: rifampicina 100mg/L frente a fosfomicina 50mg/L ( $r = 0,76$ ; IC 95% 0,48-0,9;  $P < 0,0001$ ) y rifampicina 100mg/L frente a fosfomicina 200mg/L ( $r = 0,75$ ; IC 95% 0,48- 0,89;  $P < 0,0001$ ). Las deleciones en los genes relacionados con resistencia a la fosfomicina no tuvieron ningún impacto en la frecuencia de mutantes resistentes a rifampicina.

En un análisis posterior se sumó el estudio de las distintas frecuencias de aparición de mutantes a amikacina (32 mg/L) frente a diferentes aislados clínicos heterorresistentes a fosfomicina al

## RESULTADOS

estudio de la frecuencia de rifampicina y fosfomicina (utilizando las mismas condiciones del ensayo previo). Se observó que los aislados, Ec3203y Ec50406, mostraron frecuencias de mutantes a rifampicina inferiores a  $1 \times 10^{-7}$  al igual que la cepa control ATCC25922, en base a lo cual se clasificaron como aislados normomutadores. Por el contrario, las cepas C59, C61, C74 y P45 se clasificaron como aislados hipermutadores por presentar frecuencias de mutantes a la rifampicina superiores a  $1 \times 10^{-7}$ . Por otro lado, se observaron frecuencias de mutantes resistentes a fosfomicina superiores entre los aislados normomutadores que entre los aislados hipermutadores (la frecuencia media de mutantes a fosfomicina a una concentración de 50 mg/L fue de  $7.83 \times 10^{-3}$  frente a  $3,43 \times 10^{-5}$  y con fosfomicina 200 mg/L de  $1,51 \times 10^{-5}$  frente a  $7,09 \times 10^{-8}$ , respectivamente). Las frecuencias de mutantes para amikacina a 32 mg/L fueron inferiores a  $1 \times 10^{-7}$  para todos los aislados estudiados. P45, Ec50406 y la cepa control no presentaron ninguna población bacteriana resistente a 32 mg/L de amikacina.

## RESULTADOS

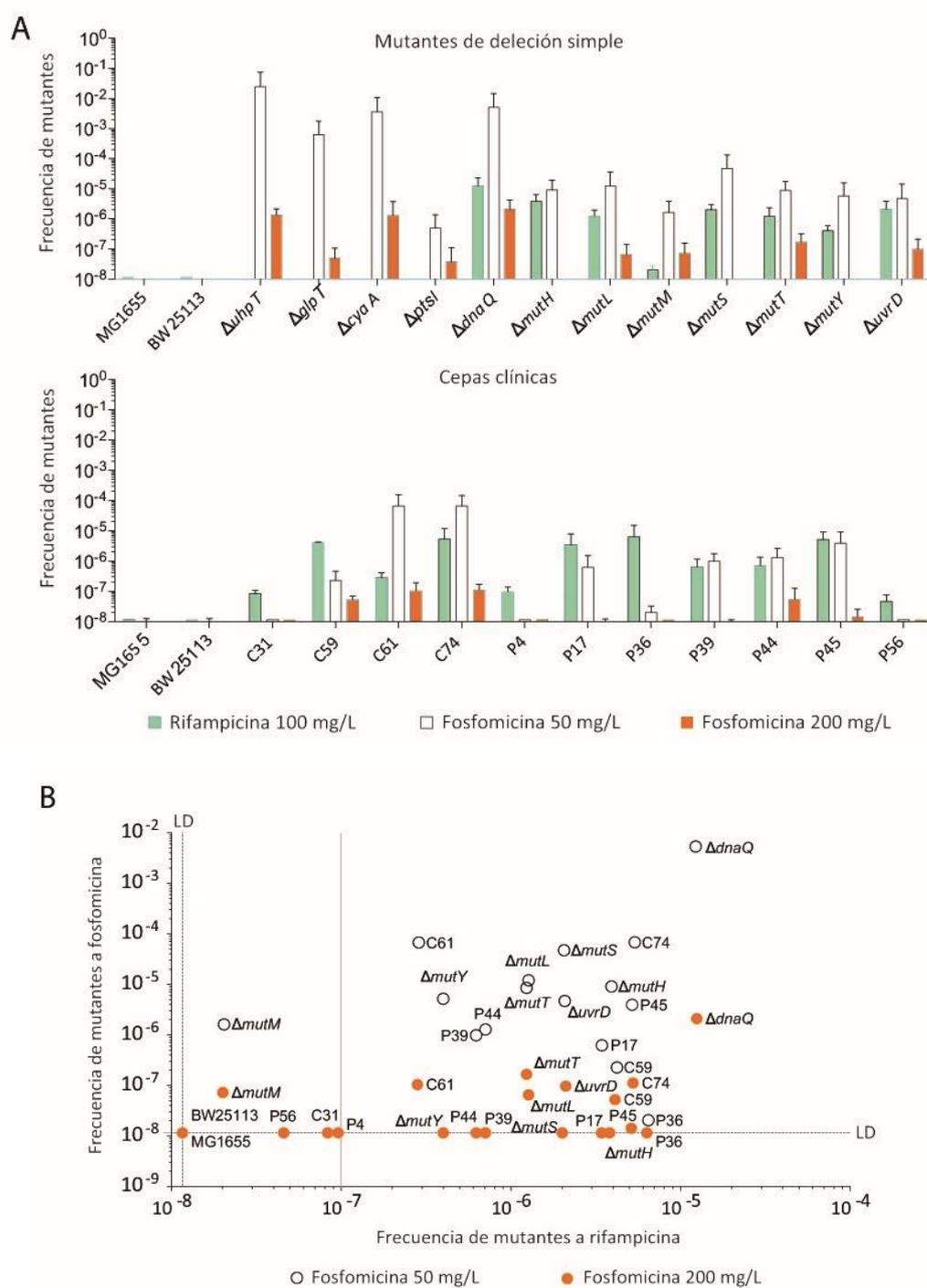
**Tabla 16.** Frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina 100 mg/L, fosfomicina 50 mg/L (concentración a la que crecen cepas no sensibles) y 200 mg/L (concentración del antimicrobiano para detectar mutaciones que afecten a más de un gen del sistema de transporte de fosfomicina) y amikacina 32 mg/L (concentración a la que crecen cepas resistentes según punto de corte de EUCAST publicado en el documento “Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0”).<sup>522</sup>

Cepas	Frecuencia de aparición de mutantes							
	Rifampicina 100 mg/L		Fosfomicina 50 mg/L		Fosfomicina 200 mg/L		Amikacina 32 mg/L	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
<b>Cepas de control</b>								
ATCC 25922	$3,75 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-8}$	$1,67 \times 10^{-7}$	$9,45 \times 10^{-8}$	$1,00 \times 10^{-8}$	0	$< 1 \times 10^{-8}$	-
BW25113	$1,16 \times 10^{-8}$	0	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
MG1655	$1,16 \times 10^{-8}$	0	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
<b>Cepas mutantes simples de genes en relación con resistencia a fosfomicina</b>								
$\Delta uhpT$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$2,51 \times 10^{-2}$	$4,99 \times 10^{-2}$	$1,35 \times 10^{-6}$	$7,90 \times 10^{-7}$	ND	ND
$\Delta glpT$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$6,34 \times 10^{-4}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-8}$	$5,77 \times 10^{-8}$	ND	ND
$\Delta cyaA$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$3,61 \times 10^{-3}$	$7,19 \times 10^{-3}$	$1,32 \times 10^{-6}$	$2,46 \times 10^{-6}$	ND	ND
$\Delta ptsI$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$5,00 \times 10^{-7}$	$8,66 \times 10^{-7}$	$3,75 \times 10^{-8}$	$7,50 \times 10^{-8}$	ND	ND
<b>Cepas mutantes simples de genes de reparación del ADN</b>								
$\Delta dnaQ$	$1,25 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-5}$	$5,11 \times 10^{-3}$	$9,67 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-6}$	ND	ND
$\Delta mutH$	$3,82 \times 10^{-6}$	$2,54 \times 10^{-6}$	$9,13 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-5}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
$\Delta mutL$	$1,27 \times 10^{-6}$	$7,15 \times 10^{-7}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-5}$	$6,54 \times 10^{-8}$	$7,55 \times 10^{-8}$	ND	ND
$\Delta mutM$	$2,01 \times 10^{-8}$	$7,64 \times 10^{-9}$	$1,65 \times 10^{-6}$	$2,18 \times 10^{-6}$	$7,29 \times 10^{-8}$	$8,59 \times 10^{-8}$	ND	ND
$\Delta mutS$	$2,01 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-6}$	$4,77 \times 10^{-5}$	$8,52 \times 10^{-5}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
$\Delta mutT$	$1,24 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-6}$	$8,86 \times 10^{-6}$	$8,85 \times 10^{-6}$	$1,67 \times 10^{-7}$	$1,56 \times 10^{-7}$	ND	ND
$\Delta mutY$	$3,99 \times 10^{-7}$	$1,92 \times 10^{-7}$	$5,76 \times 10^{-6}$	$9,96 \times 10^{-6}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
$\Delta uvrD$	$2,11 \times 10^{-6}$	$1,71 \times 10^{-6}$	$4,85 \times 10^{-6}$	$9,57 \times 10^{-6}$	$9,72 \times 10^{-8}$	$1,12 \times 10^{-7}$	ND	ND
<b>Aislados clínicos heterorresistentes a fosfomicina</b>								
C31	$8,33 \times 10^{-8}$	$2,36 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
C59	$4,12 \times 10^{-6}$	$1,63 \times 10^{-7}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$2,37 \times 10^{-7}$	$5,28 \times 10^{-8}$	$1,68 \times 10^{-8}$	$2,19 \times 10^{-8}$	$8,93 \times 10^{-9}$
C61	$2,81 \times 10^{-7}$	$1,33 \times 10^{-7}$	$6,63 \times 10^{-5}$	$9,29 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-7}$	$8,86 \times 10^{-8}$	$1,45 \times 10^{-8}$	$7,71 \times 10^{-9}$
C74	$5,25 \times 10^{-6}$	$6,72 \times 10^{-6}$	$6,66 \times 10^{-5}$	$8,40 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-7}$	$5,77 \times 10^{-8}$	$2,89 \times 10^{-8}$	$2,98 \times 10^{-8}$
P4	$9,58 \times 10^{-8}$	$4,12 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
P17	$3,43 \times 10^{-6}$	$4,58 \times 10^{-6}$	$6,20 \times 10^{-7}$	$8,77 \times 10^{-7}$	$4,02 \times 10^{-9}$	$5,68 \times 10^{-9}$	ND	ND
P36	$6,33 \times 10^{-6}$	$8,73 \times 10^{-6}$	$1,44 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
P39	$6,25 \times 10^{-7}$	$5,30 \times 10^{-7}$	$9,95 \times 10^{-7}$	$7,85 \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-9}$	$6,76 \times 10^{-9}$	ND	ND
P44	$7,08 \times 10^{-7}$	$6,48 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-6}$	$1,38 \times 10^{-6}$	$5,46 \times 10^{-8}$	$6,98 \times 10^{-8}$	ND	ND
P45	$5,13 \times 10^{-6}$	$4,07 \times 10^{-6}$	$3,88 \times 10^{-6}$	$5,48 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-8}$	$1,16 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-
P56	$4,58 \times 10^{-8}$	$2,95 \times 10^{-8}$	$< 1 \times 10^{-8}$	-	$< 1 \times 10^{-8}$	-	ND	ND
Ec3203	$1,00 \times 10^{-8}$	0	$1,54 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-2}$	$3,00 \times 10^{-5}$	$2,83 \times 10^{-5}$	$4,33 \times 10^{-8}$	$1,80 \times 10^{-9}$
Ec50406	$2,46 \times 10^{-8}$	$2,59 \times 10^{-8}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-7}$	$2,83 \times 10^{-7}$	0	0

ND: No determinada

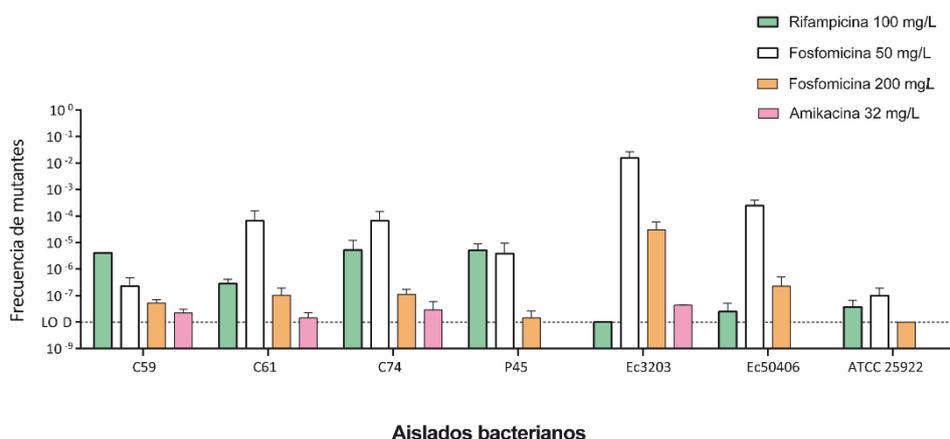
## RESULTADOS

**Figura 37.** (a) Frecuencias de mutantes para rifampicina a 100mg/L (barras negras) y fosfomicina a 50mg/L (barras blancas) y 200mg/L (barras grises). (b) Correlación entre la hipermutabilidad (frecuencia de mutantes de rifampicina a 100mg/L) y la frecuencia de mutantes de fosfomicina a 50mg/L (círculos abiertos) o 200mg/L (círculos rellenos); la línea vertical separa los mutantes débiles a la izquierda de los fuertes a la derecha. LOD, límite de detección.



## RESULTADOS

**Figura 38.** Frecuencias de mutantes para rifampicina a 100 mg/L, fosfomicina a 50 mg/L y 200 mg/L, y amikacina a 32 mg/L en los aislados resistentes a la fosfomicina y en la cepa de control, ATCC 25922. Límite de detección:  $10^{-8}$ .



#### 4. Análisis de secuenciación masiva de genes de reparación del ADN y genes asociados con resistencia a fosfomicina.

##### Aislados clínicos hipermutadores

En el análisis de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes en relación con la resistencia a fosfomicina no se observaron mutaciones en las proteínas Crp, MurA o UhpA, excepto en el aislado C61, que presentó un único polimorfismo en la secuencia de UhpA (Tabla 17). No se detectaron deleciones ni inserciones en el resto de secuencias génicas de este grupo de genes; sin embargo, se observó una gran variedad de polimorfismos, algunos de ellos, conservados entre los distintos aislados clínicos.

Con respecto al análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas implicadas en el sistema de reparación del ADN bacteriano, solo RecA y RecR mostraron secuencias iguales a la cepa control, siendo consideradas como secuencias salvajes. El resto de secuencias de este grupo presentaban en su mayoría diversos polimorfismos. Además, se observó la deleción completa del gen *mutS* en cuatro de los aislados (C59, C61, C74 y P36) y una deleción parcial en el aislado P45. Las deleciones completas fueron confirmadas en un segundo paso mediante PCR convencional y secuenciación de tipo Sanger y en un tercer paso, mediante *Southern blot* (Figura 39). P44 presentó la inserción de la secuencia IS26 en el gen *mutT*, entre los aminoácidos Ala27 y Arg28. Los aislados clínicos con el menor número de polimorfismos fueron C31, P4, P17 y P56. El aislado P4, fue el único que presentó todas las secuencias de aminoácidos de los genes estudiados para reparación del ADN, iguales a la cepa control. Con excepción del aislado P17, los aislados con menor número de polimorfismos y mutaciones

## RESULTADOS

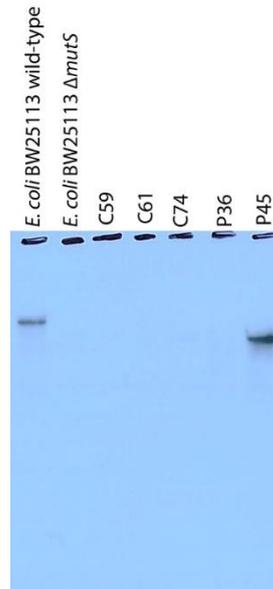
coinciden con ser aquellos con una menor frecuencia de mutantes a rifampicina (ver resultados en apartado de frecuencias de aparición de mutantes para C31, P4, y P56).

Proteínas	C31	C59	C61	C74	P4	P17	P36	P39	P44	P45	P56
<b>GlpT</b>	E448K	L297F E448K	E443Q Q444E E448K	E448K	wt	wt	E448K	L297F E448K	A402V E448K	E448K	E448K
<b>UhpT</b>	wt	wt	A355L E350Q	wt	wt	F160S	E350Q	E350Q	wt	wt	wt
<b>CyaA</b>	wt	N142S	N142S	N142	wt	wt	N142S D837E T840A	N142S	N142S N142S S356K G359E E362D I514V D837E T840A	N142S D837E T840A	N142S
<b>PtsI</b>	R367K	R367K	R367K	E282K R367K	wt	wt	R367K	R367K	A306T R367K	R367K	R367K
<b>UhpA</b>	wt	wt	P25S	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>UhpB</b>	wt	wt	P84S L85I T166I H482T	S404A	wt	wt	T75M P84S Q441H L456V G459S Q463H H482T	wt	T75M P84S Q441H G459D Q463H H482T	P84S Q441H G495S Q463H H482T	P84S Q441H G495S Q463H H482T
<b>UhpC</b>	Y18H	I108M	Y18H	T435A	wt	wt	Y18H A177S S417A	Y18H A177S I422A T435A	Y18H A177S S417A	Y18H A177S S417A	wt
<b>Crp</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>MurA</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>DnaQ</b>	wt	I222L Q233E	A200T	I222L Q233E	wt	wt	A200T I222L	I222L	A200T I222L	A101T A200T I222L	wt
<b>MutH</b>	wt	V36A	V36A	V36A	wt	S145R	V36A Q135K V170I	V36A	V36A K79Q Q135K V170I	V36A	wt
<b>MutL</b>	wt	L418P A470V A494G	N131D S350A A368F L418P S459A A494G	L418P P423T A494G	wt	wt	D129N N131D S350A A368V T377S L418P A477V A494G	A73_R74insLA L418P	N131D S350A A368V T377S P389S L418P A477V A494G	N131D P203S G281R S350A	wt
<b>MutM</b>	S98N T127A E196K	T127A	T127A A148E	T127A	S98N	T127A	T127A A193T	wt	T127A A148E	T127A	T127A
<b>MutS</b>	R19K G337E	$\Delta$ mutS	$\Delta$ mutS	$\Delta$ mutS	wt	R19K G337E	$\Delta$ mutS	G337E	A3T R19K A135T E263Q G337E T384N	M1_A9del R19K E263Q G337E T384N	P231L G337E
<b>MutT</b>	E93K S106A G109D	R89S	R89S E10-3K D114E	R89S	wt	wt	R89S L129V	R89S	A27_R28insI526	I40V R89S L129V	wt
<b>MutY</b>	wt	A217S Q272H	G101S A217S A280S	A217S	V175L S217A E241D Q272L	wt	T98A A217S	A217S Q272H	A57V T98A A217S G318D	N67S T98A A217S A280S G318D	A217S Q272H
<b>RecA</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>RecF</b>	wt	wt	wt	E194Q	wt	A134V	wt	wt	wt	wt	wt
<b>RecO</b>	wt	V123A	V123A	V123A	wt	V123A	V24I	V123A	wt	V123A	wt
<b>RecR</b>	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
<b>UvrA</b>	wt	wt	T214S R619H	wt	wt	wt	F112Y	wt	F112Y D523N E928K	F112Y	wt
<b>UvrB</b>	wt	wt	wt	G405C	wt	wt	wt	wt	D135A L281M	D434E	wt
<b>UvrC</b>	wt	wt	wt	wt	N418S	wt	wt	wt	A143V	wt	wt
<b>UvrD</b>	L559M	wt	S719T	wt	wt	R234C	S719T	Q434K	S719T	S719T	S719T
<b>UvrY</b>	M1L	wt	T45A	wt	wt	wt	T45A	M1L	T45A	T45A	M1L

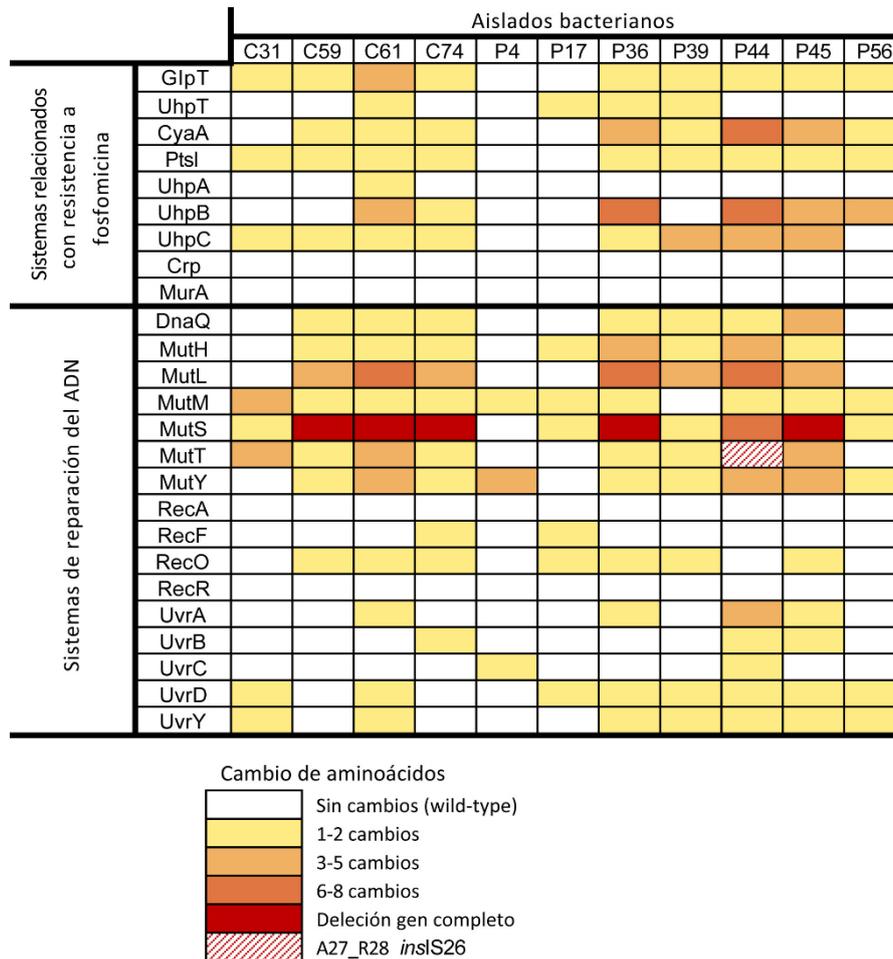
**Tabla 17.** Lista de mutaciones no sinónimas observadas en las secuencias aminoacídicas para los sistemas estudiados en los aislados clínicos (wt denota el tipo salvaje).

## RESULTADOS

**Figura 39.** Análisis de *Southern blot* del gen *mutS* en cinco aislados seleccionados por ausencia de *mutS* en el análisis de secuenciación masiva y Sanger.



**Figura 40.** Mapa de calor que muestra el número de mutaciones observadas en las proteínas relacionadas con la resistencia a la fosfomicina y el sistema de reparación del ADN en las cepas clínicas hipermutadoras.



## RESULTADOS

### Aislados clínicos normomutadores

En las tablas 18 y 19 se muestran las mutaciones observadas para los aislados normomutadores respecto a la cepa de referencia en los genes de reparación del ADN y los genes relacionados con la resistencia a fosfomicina, respectivamente. Solo se tuvieron en cuenta las mutaciones que dieron lugar a cambios en la traducción a la secuencia de aminoácidos; es decir, no se tuvieron en cuenta las mutaciones sinónimas detectadas en la secuencia de nucleótidos.

Los aislados Ec3203 y Ec50406, considerados fenotípicamente en los ensayos de frecuencia de aparición de mutantes a rifampicina como aislados normomutadores, no mostraron ninguna delección o inserción entre los genes de reparación del ADN estudiados (tabla 18); sin embargo, si se encontraron mutaciones en los genes que transcriben para los transportadores de fosfomicina. Concretamente, el gen *glpT*, se encontraba delecionado en el aislado Ec3203 y en el aislado Ec50406 presentaba la delección de un único nucleótido (1147delA) (tabla 19), provocando la alteración de la pauta de lectura de la secuencia génica.

No se encontraron cambios en la secuencia de aminoácidos en ninguno de los dos aislados normomutadores en las secuencias correspondientes a los genes *recA*, *recF*, *recR*, *uvrB* y *uvrC* (no mostrados en la tabla).

**Tabla 18.** Análisis de mutaciones no sinónimas en los genes relacionados con la reparación del ADN en aislados clínicos de *E. coli* heterorresistentes a fosfomicina y normomutadores. Las mutaciones observadas se expresan como cambios producidos en las secuencias de aminoácidos, excepto la delección de un único nucleótido observada en *glpT* en el aislado Ec50406.

Aislados clínicos de <i>E. coli</i>	Genes de reparación del ADN en <i>E. coli</i>										
	<i>dnaQ</i>	<i>mutH</i>	<i>mutL</i>	<i>mutM</i>	<i>mutS</i>	<i>mutT</i>	<i>mutY</i>	<i>recO</i>	<i>uvrA</i>	<i>uvrD</i>	<i>uvrY</i>
<b>Ec3203</b>	A200T, I222L, S238T	V36A, Q135K, V160I	D129N, N131D, A368V, A381S, L418P, A477V, A494G	T127A	A3T, R19K, E263Q, G337E, T384N, V385G	P36S, R89S, L129V	A211T, A217S, G318D	wt	F112Y, E144D	S719T	T45A
<b>Ec50406</b>	wt	wt	wt	T127A	wt	wt	wt	V123A	wt	wt	wt

## RESULTADOS

**Tabla 19.** Análisis de mutaciones no sinónimas en los genes relacionados con resistencia a fosfomicina en aislados clínicos de *E. coli* heterorresistentes a fosfomicina y normomutadores. Las mutaciones observadas se expresan como cambios producidos en las secuencias de aminoácidos

Aislados clínicos de <i>E. coli</i>	Genes asociados con resistencia a fosfomicina								
	<i>glpT</i>	<i>uhpT</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptsI</i>	<i>uhpA</i>	<i>uhpB</i>	<i>uhpC</i>	<i>crp</i>	<i>murA</i>
<b>Ec3203</b>	$\Delta glpT$	E350Q	N142S, D837E, T840A	V25I, R367K	wt	T75M, P84S, Q441H, G459D, Q463H, H482T	A51S, A177S, S417A	wt	wt
<b>Ec50406</b>	*G744A, T864C, A1147del, C1342T	wt	wt	wt	wt	wt	wt	P6T	wt

Mediante el análisis en la plataforma Resfinder en seis de los aislados clínicos heterorresistentes, cuatro hipermutadores (C59, C61, C74 y P45) y dos aislados normomutadores (Ec3203 y Ec50406) se completó la información del resistoma para los antimicrobianos que se muestran en la tabla 20. Se detectaron genes cromosómicos asociados con la resistencia a los antimicrobianos macrólidos en todos los aislados estudiados, concretamente el gen *mdf(A)*, el cual transcribe para una bomba de expulsión para múltiples fármacos, entre ellos eritromicina, rifampicina y algunos aminoglucósidos (neomicina).<sup>523</sup> El aislado Ec50406 presentó determinantes genéticos cromosómicos asociados con la resistencia a distintos antimicrobianos como las quinolonas, las sulfonamidas, las tetraciclinas, el trimetoprim y el fenicol. También se detectaron en este aislado diferentes genes que confieren resistencia a los aminoglucósidos; sin embargo, ninguno de ellos se ha relacionado con la resistencia al aminoglucósido amikacina.<sup>276</sup> En ambos aislados normomutadores se registraron varias mutaciones cromosómicas puntuales que afectan a la sensibilidad a quinolonas y a la colistina. Hay que destacar, que en los aislados hipermutadores, se detectó exclusivamente *mdfA*, pero no se detectó ningún otro determinante de resistencia para los antimicrobianos citados en la tabla.

## RESULTADOS

**Tabla 20.** Presencia de genes cromosómicos y mutaciones puntuales relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos detectados en la base de datos ResFinder (ResFinder 3.2; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Antimicrobiano	Aislados clínicos de <i>E. coli</i> heterorresistentes a fosfomicina hipermutadores y normomutadores					
	C59	C61	C74	P45	Ec3203	Ec50406
Quinolonas	ND	ND	ND	ND	Mutaciones puntuales: <i>parC</i> (p.S80I, p.E84V) <i>gyrA</i> (p.S83L, p.D87N) <i>parE</i> (p.I529L)	<i>qnrS1</i> Mutaciones puntuales: <i>gyrA</i> (p.S83L, p.D87N) <i>parC</i> (p.A56T, p.S80I)
Macrólidos	<i>mdf(A)</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>mdf(A)</i>	<i>mdf(A)</i>
Sulfonamidas	ND	ND	ND	ND	ND	<i>sul1</i>
Tetraciclinas	ND	ND	ND	ND	ND	<i>tet(B)</i>
Aminoglucósidos	ND	ND	ND	ND	ND	<i>aadA5</i> <i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i>
Betalactámicos	ND	ND	ND	ND	<i>blaTEM-1B</i>	ND
Trimetoprim	ND	ND	ND	ND	ND	<i>dfrA17</i>
Fenicol	ND	ND	ND	ND	ND	<i>catA1</i>
Colistina	ND	ND	ND	ND	Mutaciones puntuales: <i>pmrB</i> (p.V161G)	ND

ND: No detectado

### 5. Curvas de crecimiento bacteriano

En la figura 41 se muestran los resultados de los ensayos de monitorización de crecimiento bacteriano medido durante 24 horas para los mutantes simples y doble de *E. coli* isogénicos y para las cepas clínicas hipermutadoras a distintas concentraciones de fosfomicina. Este resultado se expresa como el porcentaje de bacterias viables a las 24 horas a cada concentración de fosfomicina utilizada en el ensayo.

Las cepas control, *E. coli* ATCC 25922 y BW25113, mostraron valores de CMI de 0,5 mg/L y 1 mg/L, respectivamente. En *E. coli* ATCC 25922 se detectó crecimiento de subpoblaciones a 2 mg/L en una de las réplicas del ensayo.

Con respecto a los resultados observados en este experimento para los aislados clínicos hipermutadores débiles o fuertes, más de la mitad (63,6%; 7/11), fueron capaces de crecer a

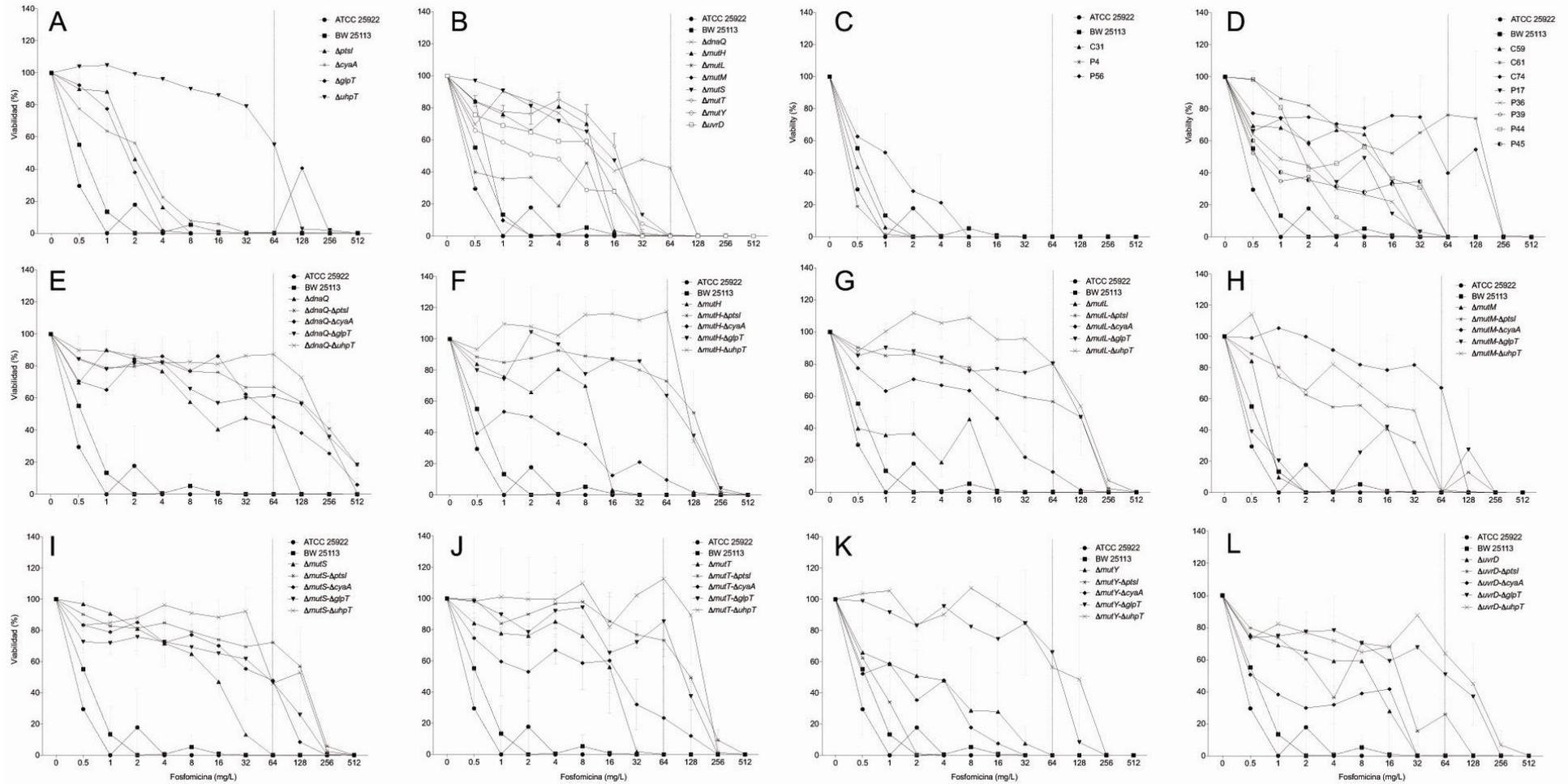
## RESULTADOS

concentraciones de fosfomicina que superaban en al menos ocho veces las concentraciones en las que sobrevivieron las cepas de control, exceptuando los aislados C31, P4, P39 y P56, cuyos valores de CMI fueron 2, 1, 8 y 4 mg/L ( $\pm 1\log_2$ ), respectivamente. Los únicos aislados que sobrevivieron a concentraciones superiores a 32 mg/L fueron C61 y C74.

Al analizar el efecto sobre las cepas mutantes isogénicas, entre todos los mutantes estudiados, exclusivamente las cepas  $\Delta uhpT$  y  $\Delta dnaQ$  sobrevivieron a concentraciones de fosfomicina superiores al punto de corte de sensibilidad clínico. La cepa mutante de delección simple,  $\Delta glpT$ , creció hasta una concentración de 2 mg/L de fosfomicina siendo incapaz de sobrevivir en el rango de concentraciones de 4 mg/L a 64 mg/L. Sin embargo, se detectó el crecimiento de una subpoblación a una concentración de fosfomicina de 128 mg/L en todas las réplicas realizadas para esta cepa mutante. Como se puede observar, la mayoría de los mutantes de delección doble (87,5%; 28/32), fueron capaces de sobrevivir a concentraciones de fosfomicina que superaban el punto de corte de sensibilidad clínica de 32 mg/L. Aquellos que no lograron crecer por encima de esta concentración de fosfomicina fueron únicamente:  $\Delta mutM-\Delta uhpT$ ,  $\Delta mutY-\Delta glpT$ ,  $\Delta mutY-\Delta cyaA$  y  $\Delta uvrD-\Delta cyaA$ .

## RESULTADOS

**Figura 41.** Análisis de la curva de crecimiento en MHB a las 24 horas en un rango de concentraciones de fosfomicina de 0,5 mg/L a 512 mg/L. (a) Cepas mutantes simples de genes asociados con resistencia a fosfomicina, (b) cepas mutantes simples de genes del sistema de reparación del ADN, (c) aislados clínicos mutantes débiles, (d) aislados clínicos mutantes fuertes y (e-l) cepas mutantes dobles de genes asociados con resistencia a fosfomicina y del sistema de reparación del ADN. Las líneas verticales indican el punto de corte de sensibilidad clínica a la fosfomicina.



## RESULTADOS

### 6. Estudio *in vitro* de interacción de antimicrobianos. Técnica del tablero de ajedrez

Según los resultados obtenidos para el índice CIF (expresado con el valor de la media  $\pm$  la desviación estándar [DE]), se observaron valores compatibles con una interacción de tipo sinérgico entre los antimicrobianos fosfomicina y amikacina para los aislados C59 ( $0,22 \pm 0,08$ ), C61 ( $0,14 \pm 0,02$ ), C74 ( $0,22 \pm 0,07$ ), P45 ( $0,23 \pm 0,04$ ), Ec3203 ( $0,33 \pm 0,14$ ), and Ec50406 ( $0,50 \pm 0,01$ ). Sin embargo, no se encontró interacción de tipo sinérgico para la cepa control ATCC 25922 ( $0,63 \pm 0,22$ ) (Tabla 21).

**Tabla 21.** Índice CIF para la combinación de fosfomicina y amikacina (media  $\pm$  DE) y puntuaciones de interacción farmacológica obtenidas mediante el modelo ZIP (ZIP score [IC del 95%] y puntuaciones del área de mayor sinergia [rangos de concentración del fármaco de las áreas más sinérgicas]) calculadas por el modelo ZIP, realizando tres réplicas por aislado.

Microorganismos	Índice CIF	ZIP score (%)	Puntuaciones/scores del área de mayor sinergia (rango de concentraciones de fosfomicina/amikacina [mg/L])
<b>C59</b>	0,22 $\pm$ 0,08 (Sinergia)	7,19 $\pm$ 0,74 (Aditivo)	50,07% (0,5-2;2-8)
<b>C61</b>	0,14 $\pm$ 0,02 (Sinergia)	6,57 $\pm$ 1,31 (Aditivo)	31,36% (1-4;1-4)
<b>C74</b>	0,22 $\pm$ 0,07 (Sinergia)	14,33 $\pm$ 1,79 (Sinergia)	58,06% (2-8;1-4)
<b>P45</b>	0,23 $\pm$ 0,04 (Sinergia)	4,52 $\pm$ 2,84 (Aditivo)	35,61% (1-4;0,25-1)
<b>Ec3203</b>	0,33 $\pm$ 0,14 (Sinergia)	19,76 $\pm$ 2,65 (Sinergia)	51,61% (32-128;0,5-2)
<b>Ec50406</b>	0,5 $\pm$ 0,01 (Sinergia)	7,56 $\pm$ 2,54 (Aditivo)	28,46% (4-16;0,5-2)
<b>ATCC 25922</b>	0,63 $\pm$ 0,22 (No interacción)	5,33 $\pm$ 2,06 (Aditivo)	22,01% (0,125-0,5;0,25-1)

Las puntuaciones obtenidas mediante el modelo matemático ZIP se expresan mediante el valor promedio del ZIP score obtenido para las matrices completas, teniendo en cuenta las diferentes curvas de dosis-respuesta para cada combinación de concentraciones por aislado (Figura 42). Estos valores, clasificaron las combinaciones de fosfomicina y amikacina como una interacción de tipo aditivo en los aislados C59, C61, P45 y Ec50406 y en la cepa de control ATCC 25922, con scores que variaban entre un 4,5% y un 7,5%. En los aislados C74 y Ec3203, el score ZIP fue de

## RESULTADOS

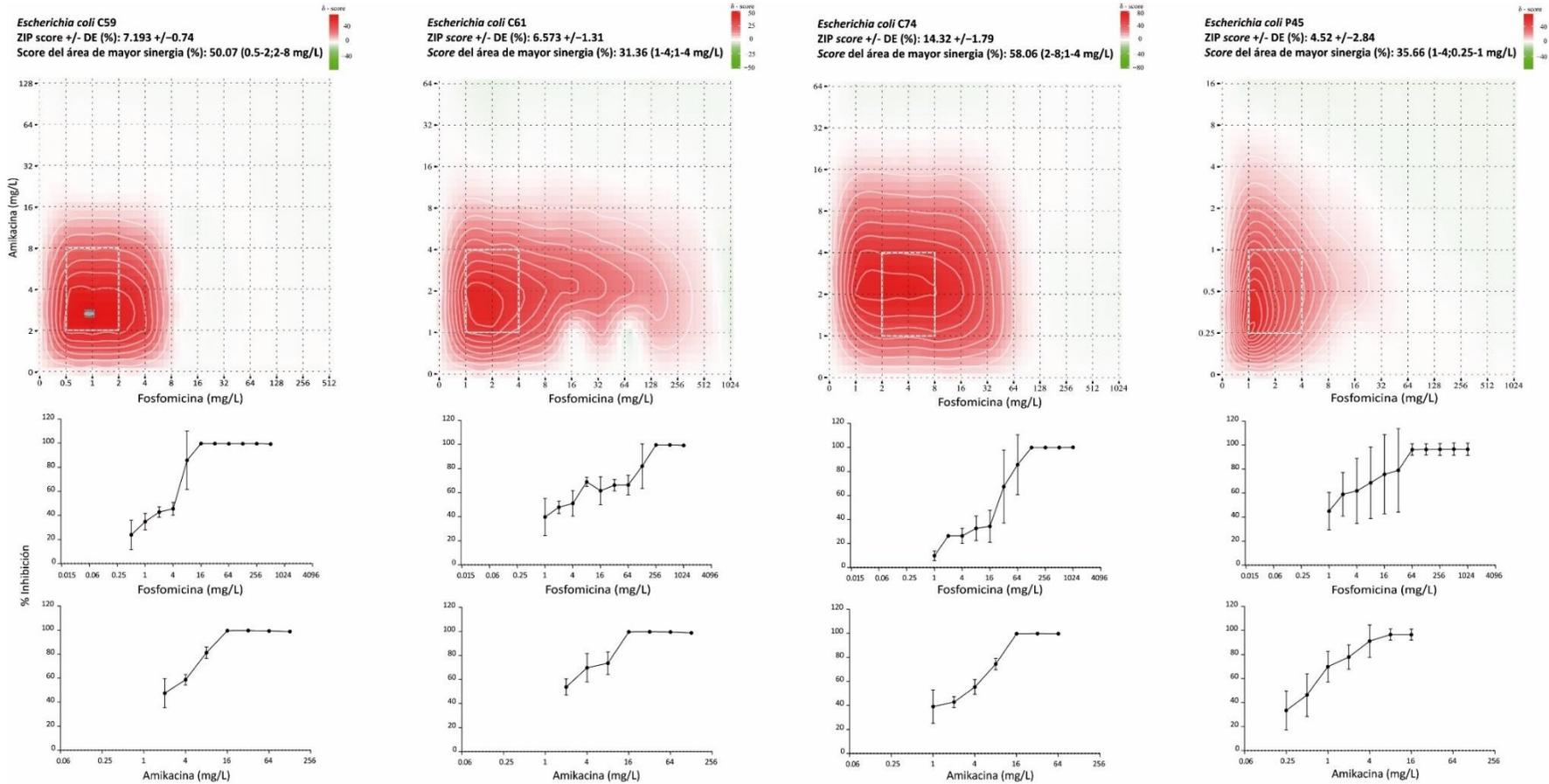
14,33% y 19,76%, respectivamente, lo que según este modelo clasifica a esta combinación como una interacción de tipo sinérgico en estos aislados. En ninguna de las réplicas de este ensayo realizadas para cada uno de los aislados, se obtuvieron puntuaciones ZIP antagónicas (Figura 42 y tabla 21).

Los *scores* ZIP obtenidos en las áreas de mayor sinergia de cada matriz con combinaciones de distintas concentraciones de amikacina y fosfomicina fueron superiores al 15% para todos los aislados. Las zonas dentro de la matriz con los *scores* más elevados se observaron a concentraciones de amikacina inferiores a 8 mg/L (rango: 0,25 mg/L-8 mg/L) en combinación con concentraciones de fosfomicina inferiores a 16 mg/L (rango: 0,125 mg/L-16 mg/L). No obstante, esto no se observó para el aislado Ec3203, en el cual, las concentraciones de fosfomicina con mayor efecto sinérgico fueron superiores a las del resto de aislados (rango: 32 mg/L-128 mg/L). Los *scores* más elevados de las áreas de mayor sinergia de las matrices se observaron en los aislados C59 y Ec3203, con valores superiores al 50%. Estos valores se observaron en rangos de concentración de fosfomicina de 0,5 mg/L a 2 mg/L y 32 mg/L a 128 mg/L combinados con concentraciones de amikacina de 2 a 8 mg/L y de 0,5 mg/L a 2 mg/L, en los aislados C59 y Ec3203, respectivamente. Los ZIP *scores* y las puntuaciones/*scores* del área mayor sinergia obtenidas para cada aislado se muestran en la tabla 21 y en la figura 42.

## RESULTADOS

**Figura 42.** Análisis de la interacción entre fosfomicina y amikacina mediante tableros de ajedrez. Las puntuaciones de las interacciones de los fármacos se representan con el *score*  $\delta$  en los mapas de calor obtenidos del análisis de la matriz mediante el modelo matemático ZIP a diferentes rangos de concentración de fosfomicina y amikacina. La media de la matriz completa de tres réplicas se expresan como ZIP *score*  $\pm$  DE. Las áreas de color rojo y verde representan sinergia y el antagonismo, respectivamente. Los rectángulos blancos muestran el área de mayor sinergia. Bajo cada mapa de calor se muestran las curvas dosis-respuesta para fosfomicina y amikacina (media  $\pm$  DE).

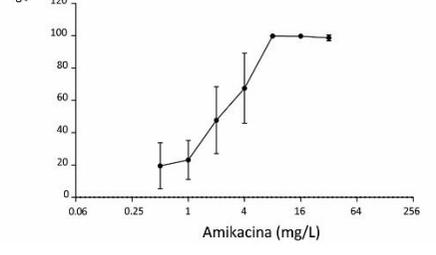
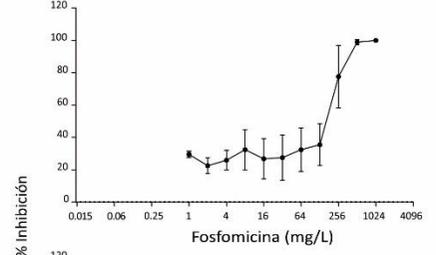
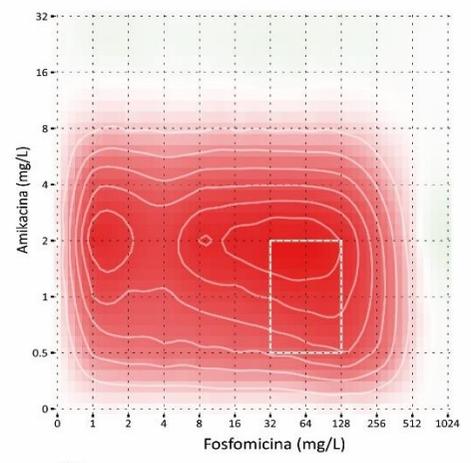
A) Aislados *E.coli* C59, C61, C74 y P45.



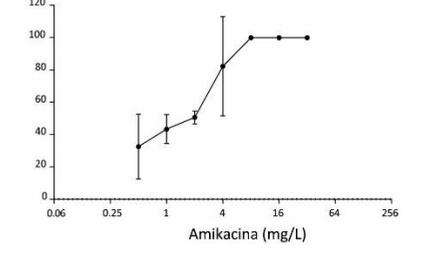
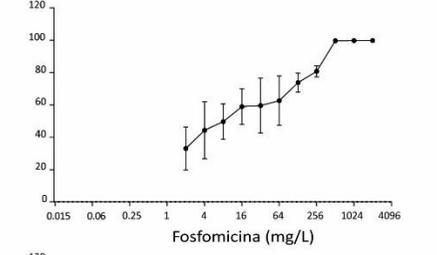
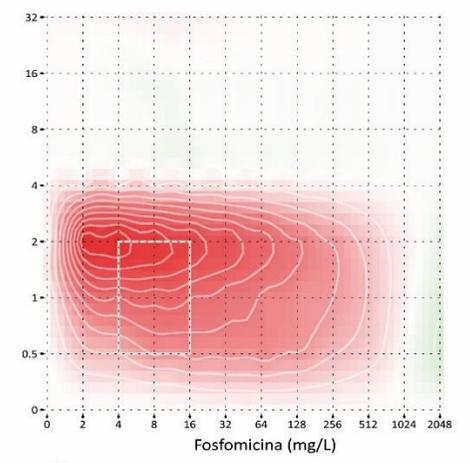
# RESULTADOS

## B) Aislados *E.coli* 3203, 50406, ATCC 25922.

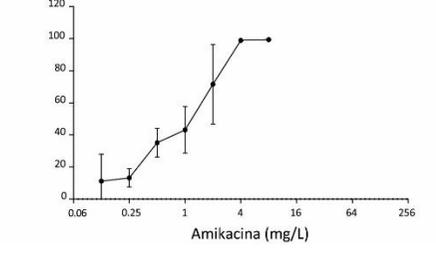
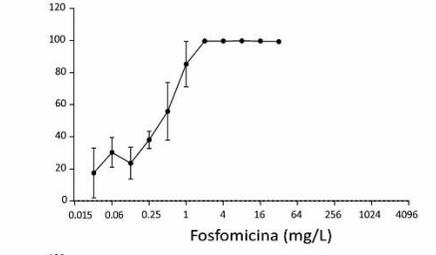
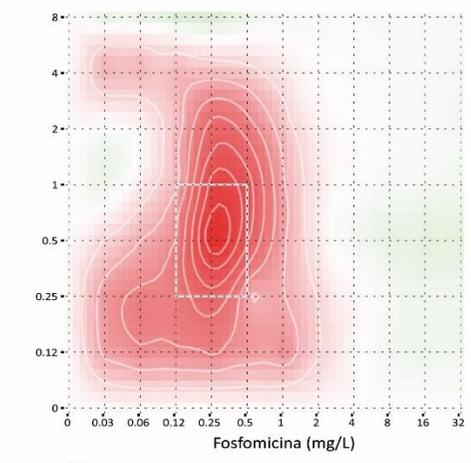
***Escherichia coli* 3203**  
 ZIP score +/- DE (%): 19.76 +/-2.65  
 Score del área de mayor sinergia (%): 51.61 (32-128;0.5-2 mg/L)



***Escherichia coli* 50406**  
 ZIP score +/- DE (%): 7.56 +/-2.54  
 Score del área de mayor sinergia (%): 28.46 (4-16;0.5-2 mg/L)



***Escherichia coli* ATCC 25922**  
 ZIP score +/- DE (%): 5.33 +/-2.06  
 Score del área de mayor sinergia (%): 22.02 (0.125-0.5;0.25-1 mg/L)



## RESULTADOS

### 7. Curvas de letalidad con fosfomicina y amikacina a diferentes concentraciones

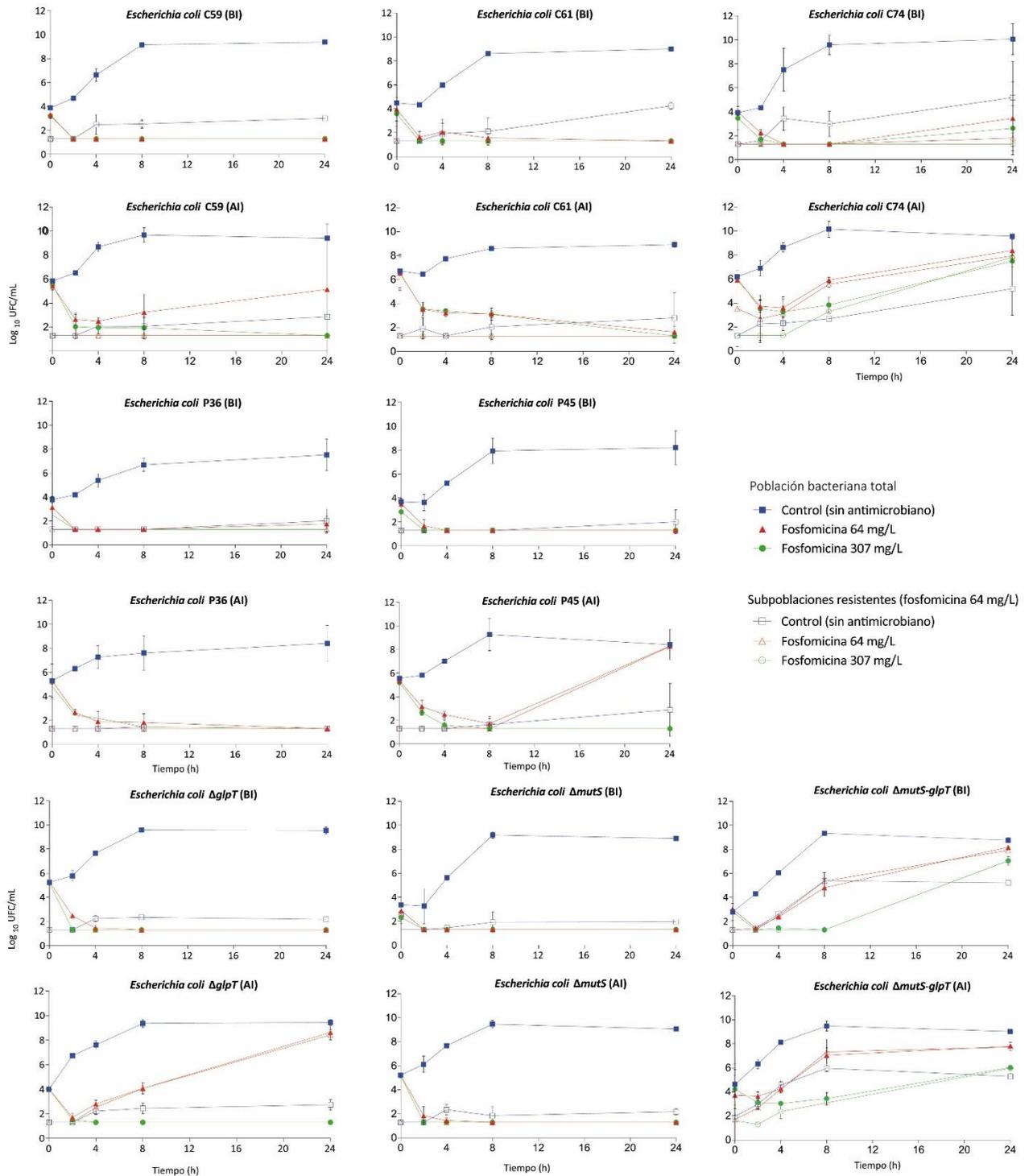
#### Curvas de letalidad de 24 horas con fosfomicina en aislados clínicos hipermutadores y cepas mutantes de laboratorio de *E. coli* para genes asociados con resistencia a fosfomicina y reparación del ADN

Los resultados de los ensayos de las curvas de letalidad de 24 horas para fosfomicina en los aislados clínicos hipermutadores y las cepas mutantes isogénicas utilizando inóculos bacterianos diferentes (bajo inóculo [BI]:  $5 \times 10^3$  UFC/mL, alto inóculo [AI]:  $5 \times 10^5$  UFC/mL) se muestran en la Figura 43.

Utilizando la concentración bacteriana de BI, ninguna de las cepas fue capaz de sobrevivir a concentraciones de fosfomicina superiores a 32 mg/L (punto de corte de resistencia clínica), exceptuando el aislado clínico hipermutador C74 y la cepa de laboratorio de delección doble,  $\Delta mutS-\Delta glpT$ . Por otro lado, cuando se utilizaron las concentraciones iniciales de AI en estos ensayos, el porcentaje de cepas que sobrevivieron tras 24 horas de exposición a concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L, se incrementó de un 12,5% (1/8) a un 50% (4/8). Sin embargo, incluso utilizando concentraciones bacterianas iniciales elevadas, exclusivamente el aislado C74 y la cepa de delección doble,  $\Delta mutS-\Delta glpT$ , superaron la exposición a la concentración máxima de fosfomicina utilizada en este ensayo de 307 mg/L (concentración sérica máxima en humanos a una dosis intravenosa de 8g/8h). Este fenómeno se debe al recrecimiento de subpoblaciones seleccionadas resistentes que a su vez son capaces de sobrevivir a concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L. Los valores de CMI mediante difusión con tiras de gradiente de fosfomicina para los aislados bacterianos que sobrevivieron a concentraciones de 64 mg/L y 307 mg/L de este antimicrobiano, fueron superiores a 128 mg/L.

## RESULTADOS

**Figura 43.** Curvas de letalidad para los aislados clínicos de *E. coli* (C59, C61, C74, P36, P45) y los mutantes de delección simple  $\Delta glpT$  y  $\Delta mutS$  y el doble  $\Delta glpT$ - $mutS$ , a 64 y 307 mg/L de fosfomicina y concentraciones bacterianas iniciales de  $5 \times 10^3$  (BI) y  $5 \times 10^5$  UFC/mL (AI).



## RESULTADOS

### Curvas de letalidad de 48 horas de fosfomicina y amikacina y su combinación en aislados de *E. coli* clínicos heterorresistentes a fosfomicina, hipermutadores y normomutadores

Los ensayos de letalidad con fosfomicina y amikacina en este grupo de aislados (hipermutadores: C59, C61, C74 y P45; normomutadores: Ec3203 y Ec50406) se muestran en las Figuras 44, 45 y 46.

Las curvas de letalidad con fosfomicina mostraron que todos los aislados hipermutadores eran capaces de sobrevivir tras 48 horas de exposición a concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de 307 mg/L solo se detectaron subpoblaciones resistentes a fosfomicina en los aislados C74 y P45. Si se observan los resultados obtenidos para los aislados clínicos normomutadores, Ec3203 y Ec50406, tanto a 64 mg/L como a 307 mg/L de fosfomicina, se detectaron subpoblaciones resistentes capaces de sobrevivir bajo estas condiciones. La cepa control, ATCC 25922, no sobrevivió bajo ninguna de las concentraciones de fosfomicina probadas en este ensayo (Figura 44). Todos los aislados que crecieron tras 48 horas de exposición a cualquiera de las concentraciones de fosfomicina utilizadas en las curvas de letalidad, presentaron valores de CMI a este antimicrobiano mediante difusión con tiras de gradiente iguales o superiores a 1024 mg/L.

Con respecto a los ensayos de letalidad con el antimicrobiano amikacina (Figura 45), casi todos los aislados sobrevivieron a concentraciones de 16 mg/L (concentración de punto de corte de resistencia clínica), excepto P45 y Ec50406. Sin embargo, ninguno de los aislados sobrevivió a la máxima concentración de amikacina testada (45 mg/L: concentración sérica máxima en humanos a una dosis intravenosa de 15 mg/kg/día). La cepa control, ATCC 25922, logró sobrevivir tras 48 horas de exposición a 16 mg/L de amikacina. Los valores de CMI testados mediante difusión con tiras de gradiente de amikacina en los aislados que sobrevivieron tras 48 horas con amikacina fueron iguales o superiores a 16 mg/L.

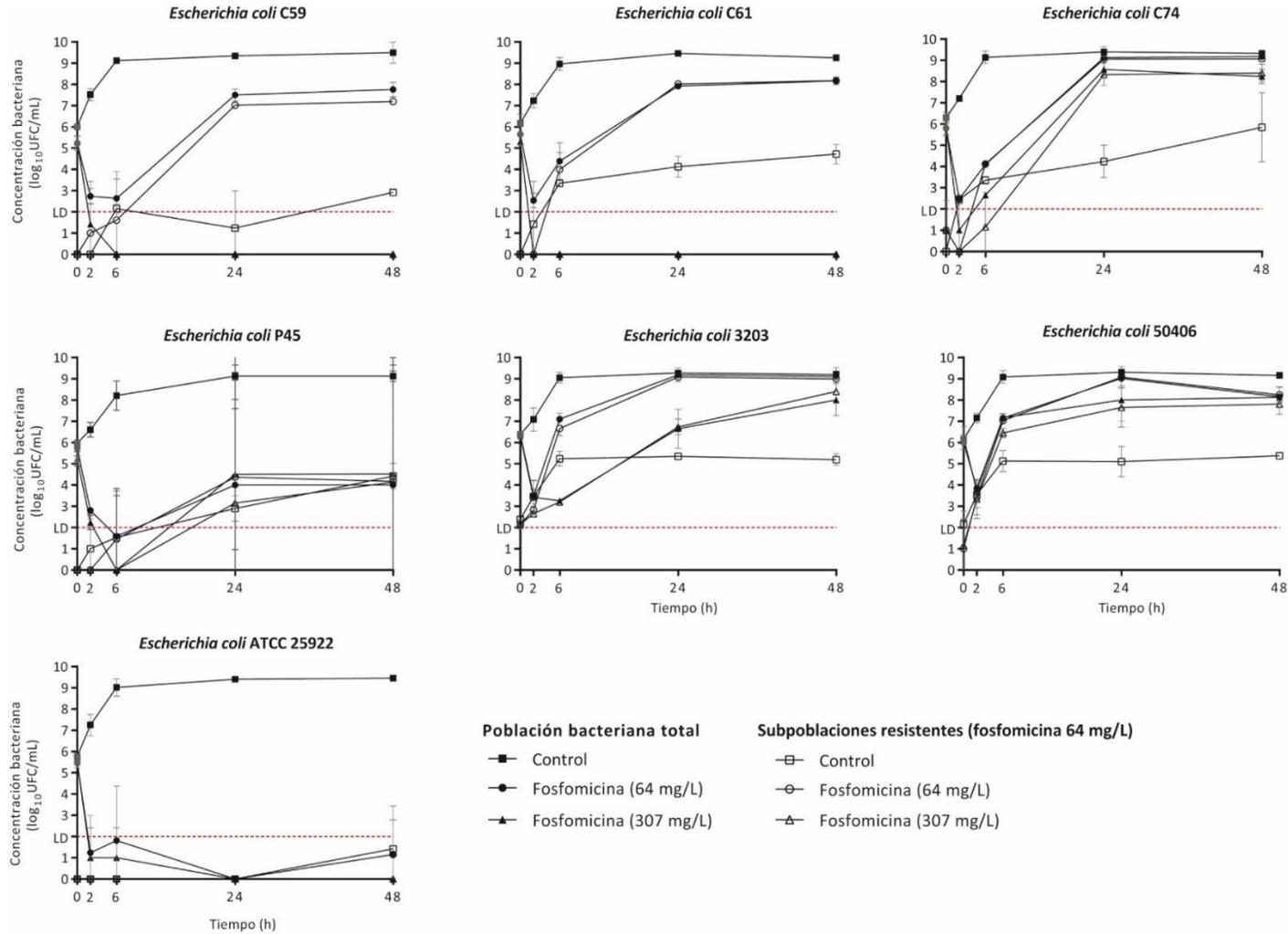
En los experimentos de letalidad con ambos fármacos combinados utilizando las concentraciones máximas séricas observadas en humanos (fosfomicina 307 mg/L + amikacina 45 mg/L) a dosis intravenosas de fosfomicina y amikacina de 8g/8h y 15 mg/kg/día, respectivamente; no se observó crecimiento tras las primeras 6 horas de exposición a los antimicrobianos en ninguno de los aislados bacterianos (ni hipermutadores ni normomutadores), incluyendo la cepa control, (Figura 46). Adicionalmente, se detectaron en todos los aislados, subpoblaciones resistentes que crecían bajo concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L en el control sin antimicrobianos a las 48 horas del ensayo. En

## RESULTADOS

contraposición, no se detectaron subpoblaciones resistentes a amikacina en las curvas de control sin antimicrobianos.

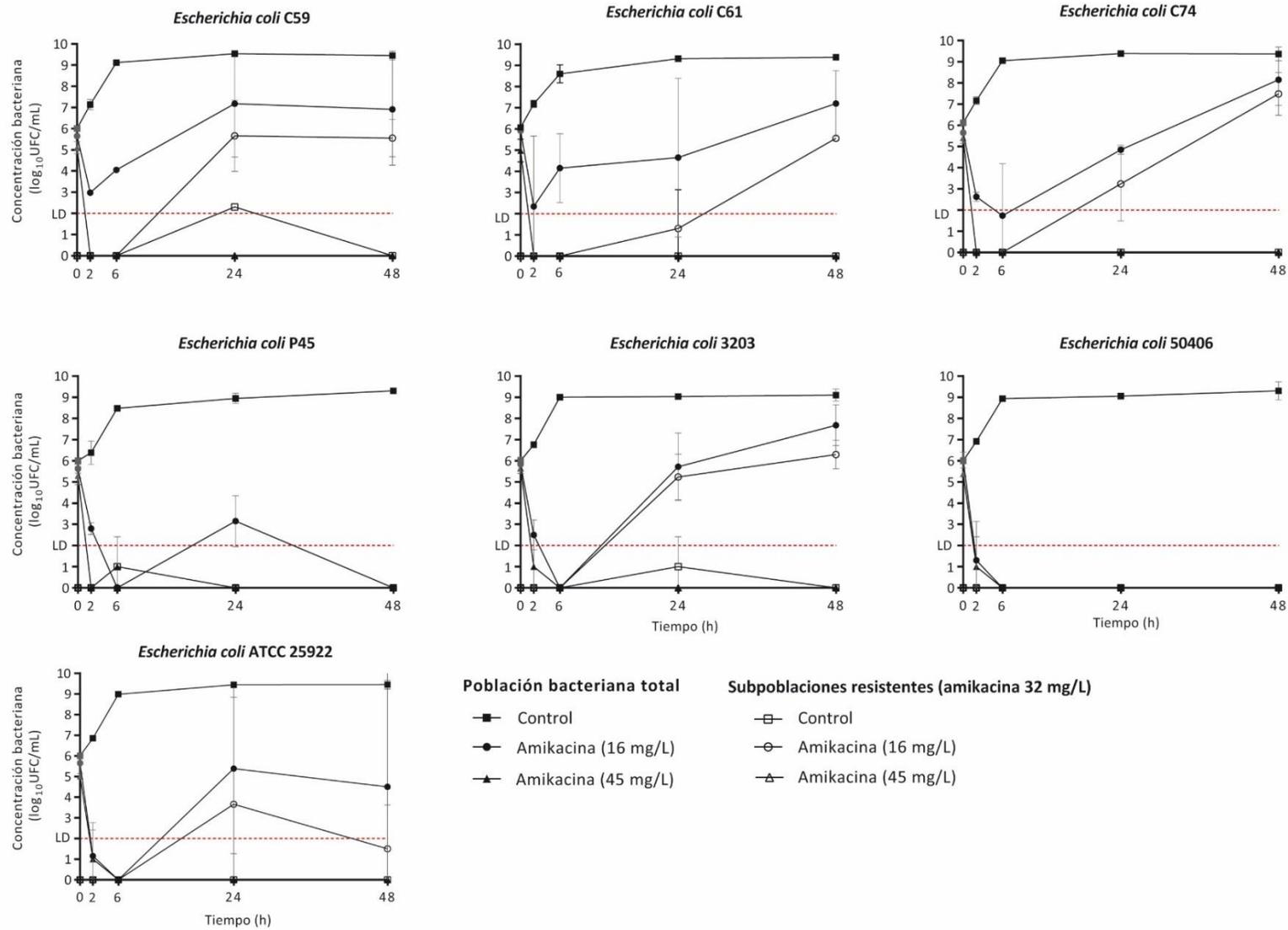
## RESULTADOS

**Figura 44.** Curvas de letalidad utilizando fosfomicina (64 mg/L y 307 mg/L) con aislados de *E. coli* con fenotipo heterorresistente a fosfomicina y con la cepa control, *E. coli* ATCC 25922. Los símbolos rellenos indican el total de bacterias y los símbolos vacíos y medio vacíos corresponden a poblaciones bacterianas resistentes. El límite de detección (LD) se estableció en  $2\log_{10}$  UFC/mL.



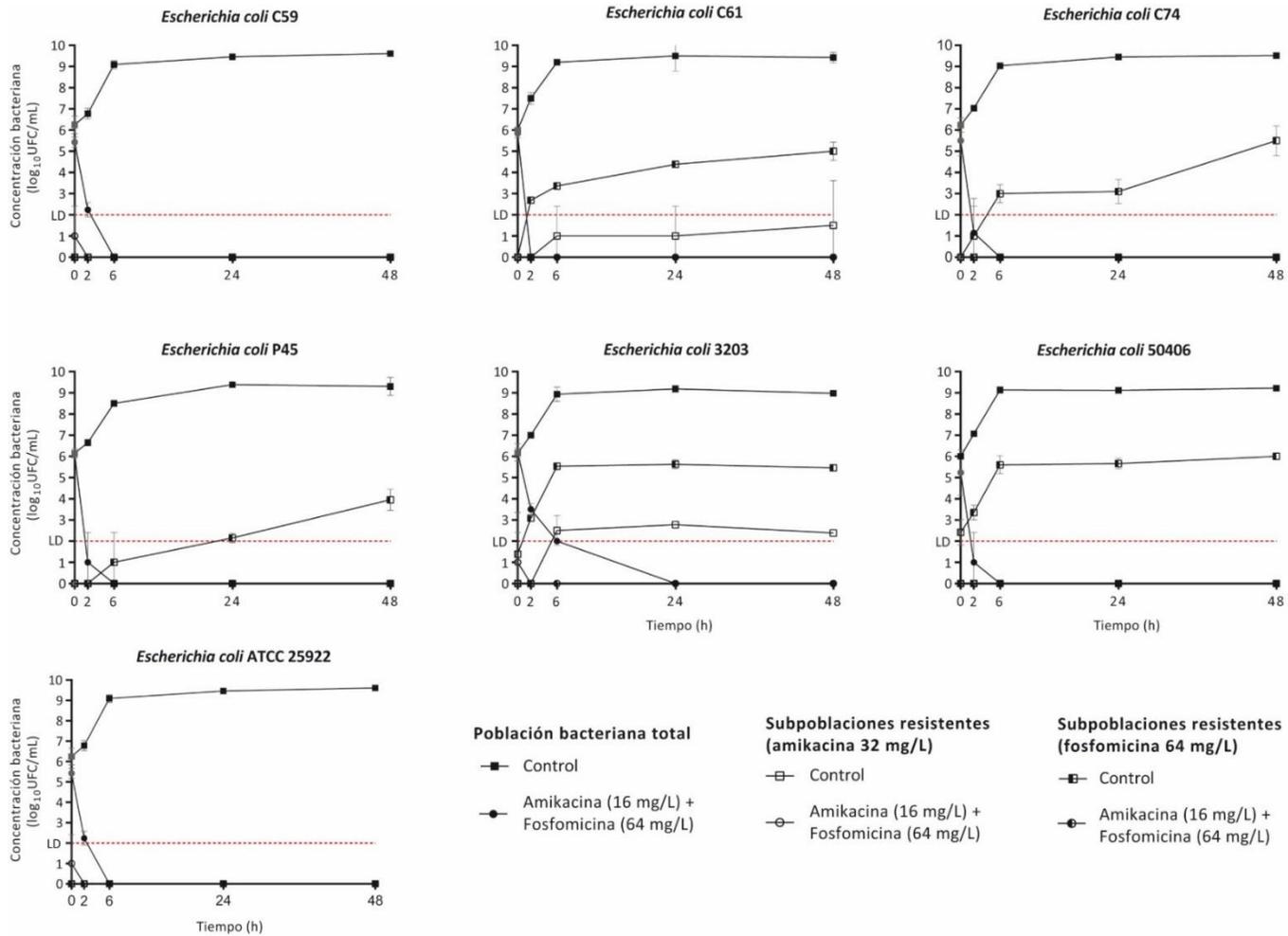
## RESULTADOS

**Figura 45.** Curvas de letalidad utilizando amikacina (16 mg/L y 45 mg/L) con aislados de *E. coli* con fenotipo heterorresistente a fosfomicina y con la cepa control, *E. coli* ATCC 25922. Los símbolos rellenos indican el total de bacterias y los símbolos vacíos y medio vacíos corresponden a poblaciones bacterianas resistentes. El límite de detección (LD) se estableció en  $2\log_{10}$  UFC/mL.



## RESULTADOS

**Figura 46.** Curvas de letalidad utilizando fosfomicina y amikacina en combinación (concentraciones de 64 mg / L de fosfomicina y 16 mg / L de amikacina) con aislados de *E. coli* con fenotipo heterorresistente a fosfomicina y con la cepa control *E. coli* ATCC 25922. Los símbolos rellenos indican el total de bacterias y los símbolos vacíos y medio vacíos corresponden a poblaciones bacterianas resistentes. El límite de detección (LD) se estableció en  $2\log_{10}$  UFC/mL.



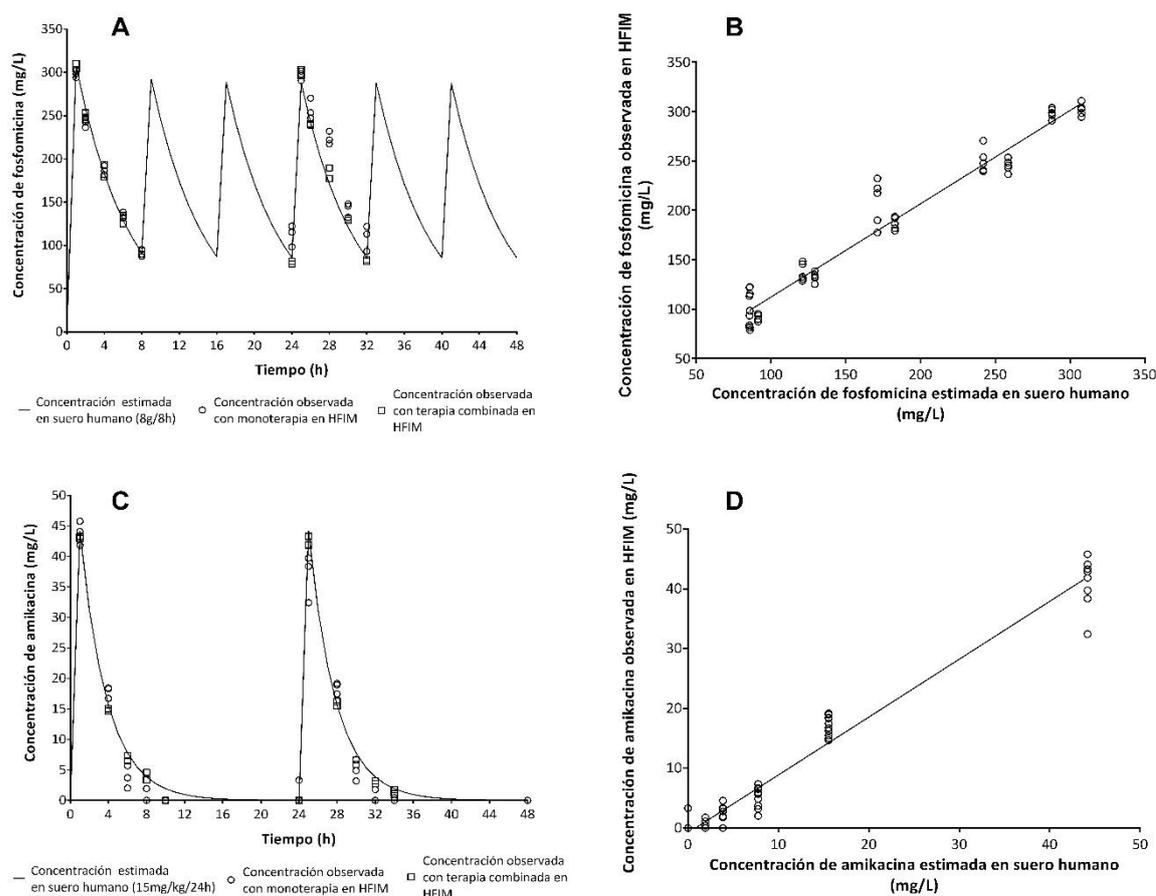
## RESULTADOS

### 8. Modelo de infección *in vitro* en cartuchos de fibra hueca (*Hollow-fiber Infection Model / HFIM*)

#### Farmacocinética de fosfomicina y amikacina en el HFIM

Las concentraciones observadas de fosfomicina y amikacina en el modelo de HFIM tras las dosis de fosfomicina (8g/8h) y amikacina (15 mg/kg/24h) frente a las concentraciones predichas, se muestran en la Figura 47A y C. Las correlaciones entre los perfiles farmacocinéticos predichos y observados de fosfomicina y amikacina en este modelo se muestran en la Fig. 47B y D para fosfomicina ( $R^2 = 0,96$ ; intercepción: 17939 [IC 95%, 7,14-28,78]; pendiente: 1,06 [IC 95%, 0,889-0,99]) y amikacina ( $R^2 = 0,97$ ; intercepción: 20,81 [IC 95%, 21,64-0,01]; pendiente: 0,97 [IC 95%, 0,93 a 1,01]).

**Figura 47. A y C.** Perfiles farmacocinéticos del HFIM tras la administración en monoterapia y en combinación de fosfomicina a una dosis de 8g/8h y amikacina a 15mg/kg/24h en 48 horas. La línea continua muestra las concentraciones previstas para los fármacos y los símbolos, las concentraciones observadas en el modelo. **B y D.** Gráfico de dispersión que muestra las concentraciones de antimicrobianos observadas frente a las previstas. Los círculos y la línea continua representan los puntos de las concentraciones individuales estimadas en suero humano/observadas y la regresión lineal de valores estimados en suero humano/observados, respectivamente.



## RESULTADOS

### Fosfomicina y amikacina en monoterapia

La pauta de fosfomicina en monoterapia (8g/8h [24 g/día]) no logró erradicar los cultivos bacterianos de todos los aislados clínicos a pesar de sus valores de CMI para este antimicrobiano (ver Tabla 15). Mientras que los aislados clínicos normomutadores, Ec3203 y Ec50406, mostraron una disminución de la concentración bacteriana en las primeras 8 horas de exposición a fosfomicina en monoterapia inferior a  $1 \log_{10}$  UFC/mL, los aislados hipermutadores experimentaron una reducción mayor de la carga bacteriana (1 a  $5 \log_{10}$  UFC/mL). Sin embargo, tanto los aislados hipermutadores como los normomutadores mostraron un rápido crecimiento de subpoblaciones bacterianas resistentes a fosfomicina durante las primeras 24 horas de tratamiento (Figura 48, cuadrado naranja). La presencia de subpoblaciones resistentes a fosfomicina también se observó en los modelos de HFIM de control sin tratamiento durante las primeras 24 horas. El tratamiento con fosfomicina fue rápidamente bactericida solo frente a la cepa control ATCC 25922, en la que no se detectó crecimiento bacteriano más allá de las primeras 2 horas del ensayo.

La monoterapia con amikacina (15 mg/kg/24h) tampoco logró erradicar la carga bacteriana en el HFIM (Figura 48, triángulo verde). Se observó una gran disminución de la concentración bacteriana con reducciones del inóculo bacteriano que oscilaban de 2 a  $5 \log_{10}$  UFC/mL, aproximadamente. Sin embargo, todos los aislados independientemente de los valores de CMI al antimicrobiano (ver valores de CMI a amikacina en Tabla 15), incluyendo la cepa control, sobrevivieron al tratamiento con este antibiótico después de la aparición de poblaciones resistentes. Se detectaron subpoblaciones resistentes a la amikacina estables capaces de crecer a concentraciones de 32 mg/L en todos los aislados, excepto en Ec50406 y en la cepa control. En nuestro modelo con amikacina en monoterapia, el recrecimiento bacteriano se detectó en las primeras 24 horas en los aislados estudiados, excepto en la cepa control en la que este recrecimiento se detectó de forma más tardía, a las 48 horas del ensayo.

Los aislados que crecieron en las placas de MHA suplementado con amikacina y fosfomicina a las 72 horas del ensayo presentaron resistencia estable, demostrando valores de CMI mediante tiras con gradiente de difusión iguales o superiores a 1024 mg/L para fosfomicina y 16 mg/L para amikacina.

### Combinación fosfomicina-amikacina

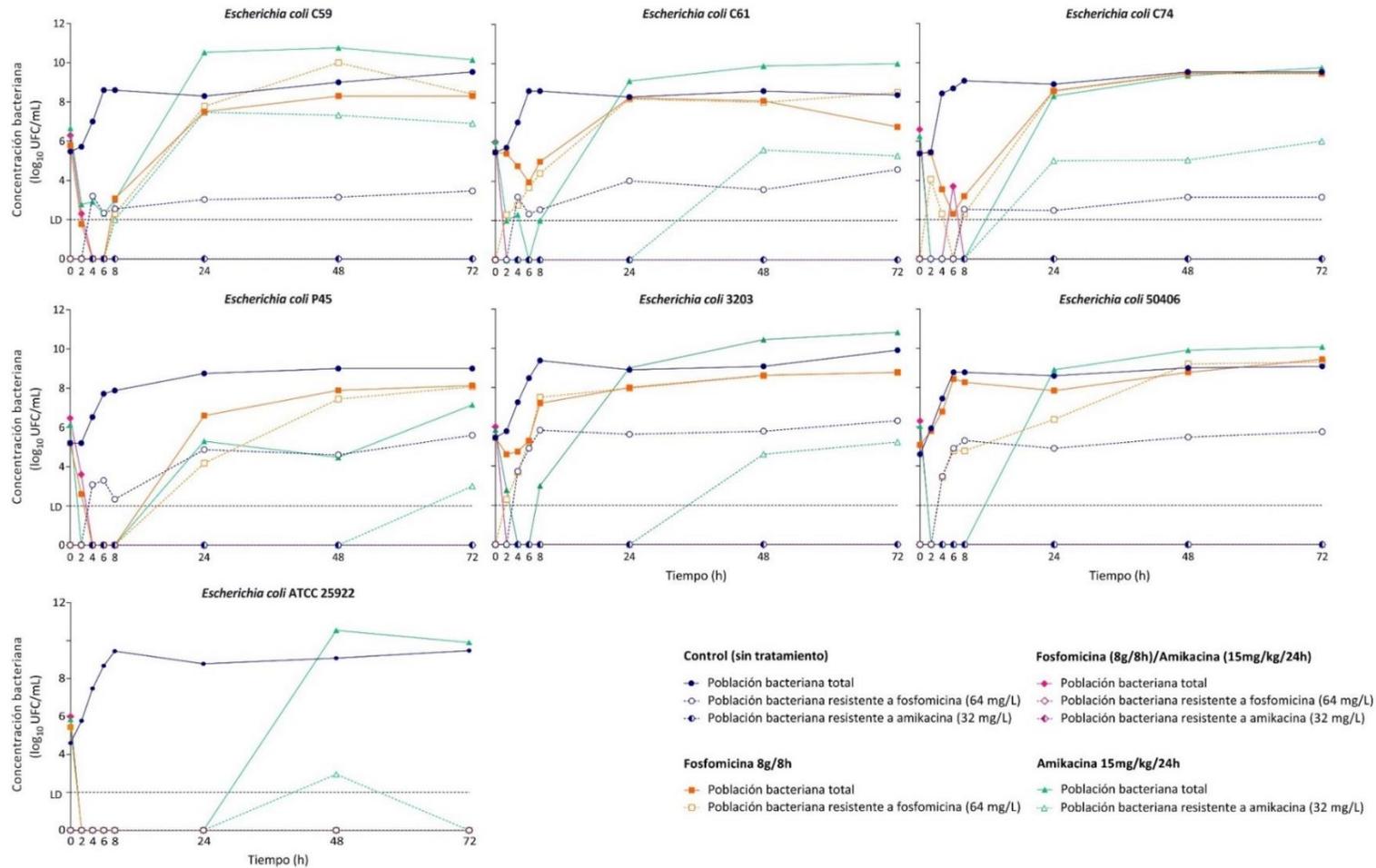
La combinación de fosfomicina con amikacina produjo una rápida erradicación de los cultivos bacterianos (Figura 48, rombo rosa). Se observó una reducción igual o superior a  $5 \log_{10}$  UFC/mL en todos los aislados en las primeras 8 horas del ensayo sin detectarse recrecimiento bacteriano

## RESULTADOS

durante el resto del experimento. Además, no se detectaron poblaciones resistentes a fosfomicina ni a amikacina en ninguno de los aislados sometidos al ensayo en combinación. No se detectaron diferencias en la eficacia del tratamiento combinado entre las cepas heterorresistentes a fosfomicina, normomutadoras frente a hipermutadoras.

## RESULTADOS

**Figura 48.** HFIM de aislados de *E. coli* con fenotipo heterorresistente a fosfomicina y de la cepa control ATCC 25922 en una simulación de tratamiento en monoterapia con fosfomicina a una dosis de 8g/8h, amikacina a 15 mg/kg/24h, y del tratamiento combinado de fosfomicina (8g/8h) y amikacina (15 mg/kg/24h). El límite de detección (LD) de la técnica se estableció en 2 log<sub>10</sub> UFC/mL.



## DISCUSIÓN GENERAL

### V. DISCUSIÓN GENERAL

El progresivo incremento de la resistencia a los antimicrobianos se trata de un problema de salud pública al que la ciencia intenta dar solución con la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, ya sea mediante la creación de moléculas novedosas o con el rescate de viejos antimicrobianos, que han logrado mantenerse activos y producir menor impacto en la resistencia a lo largo de estos años. La fosfomicina es un antimicrobiano que se descubrió hace más de 50 años y que aún hoy en día presenta actividad frente a bacterias con múltiples mecanismos de resistencia.<sup>165-168</sup> Consecuencia de ello, este antibiótico forma parte de las posibles opciones del arsenal terapéutico utilizado frente a las infecciones por bacterias multirresistentes, siendo aprobado para uso sistémico por la EMA.<sup>127</sup>

Teniendo en cuenta la relevancia que este antimicrobiano toma como potencial uso como tratamiento sistémico de las infecciones por bacterias multirresistentes en la actualidad, es primordial evaluar sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como las implicaciones que pudieran tener los distintos mecanismos de resistencia en el éxito o fracaso terapéutico. Esto va a permitir conocer y predecir la eficacia del fármaco de una forma más adecuada e individualizada, así como una planificación más ajustada del régimen terapéutico en base a las características particulares del paciente, el microorganismo y el fármaco.

A pesar de la disponibilidad de este fármaco desde hace varias décadas, su uso como tratamiento intravenoso no ha tenido gran éxito hasta hace tan solo unos pocos años debido a la disponibilidad de otros agentes antimicrobianos ampliamente distribuidos con buen nivel de tolerancia que permanecían siendo efectivos. Uno de los factores limitantes en el uso de este fármaco de forma más extendida y generalizada en la práctica clínica, han sido las peculiaridades y controversias que presenta en la realización e interpretación del estudio de sensibilidad, pieza clave en la predicción del éxito o fracaso terapéutico de un antimicrobiano. Los comités CLSI y EUCAST, establecen que el método de referencia para estipular la sensibilidad o resistencia a fosfomicina es la dilución en agar con suplemento de G6P (25 mg/L). Este procedimiento es inviable para su desarrollo en la rutina diaria del laboratorio de Microbiología Clínica, lo que ha provocado el uso de metodología alternativa mejor adaptada, más sencilla y rápida (disco-difusión, microdilución en caldo, tiras de gradiente...). Esta adaptación en la metodología distinta al método de referencia ha originado datos de sensibilidad discrepantes dependiendo de la metodología usada,<sup>368</sup> lo cual produce incertidumbre en la extrapolación de los resultados a la clínica. Esto ha podido contribuir en cierto modo en la generación de cierta desconfianza para uso de este fármaco como tratamiento sistémico de primera línea.

## DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de sensibilidad a este antimicrobiano mediante disco-difusión, es una de las técnicas que se utilizan como alternativa, el cual está normalizado por ambos comités. Sin embargo, el análisis y medición de los halos de inhibición que aparecen con los discos de fosfomicina, pueden llegar a ser controvertidos y difíciles de interpretar. El crecimiento de colonias o subpoblaciones dentro de la zona de inhibición es un fenómeno que aparece con frecuencia en el estudio de sensibilidad a este antimicrobiano de distintas especies bacterianas, lo que suma una mayor incertidumbre en el estudio de sensibilidad a este fármaco.<sup>166</sup> En el documento oficial de EUCAST publicado anualmente con los puntos de corte de sensibilidad clínica, establece un apartado específico en el que presenta varios ejemplos con imágenes sobre cómo realizar la lectura adecuada de los halos de inhibición en caso de que aparezca colonias bacterianas en su interior,<sup>255</sup> presente desde el año 2017. Estas recomendaciones no están basadas en ningún estudio científico en el que se demuestre la posible implicación de estas subpoblaciones con sensibilidad disminuida a fosfomicina en el éxito o fracaso clínico del fármaco. De forma general, estas colonias o subpoblaciones, se definen como heterorresistencia bacteriana; es decir, se trata de una población bacteriana con sensibilidad heterogénea a un antimicrobiano en la que está presente una subpoblación o subpoblaciones con sensibilidad reducida al antimicrobiano con respecto a la sensibilidad que presenta la población bacteriana mayoritaria. La heterorresistencia a fosfomicina es un fenotipo común, el cual se puede observar igualmente en el estudio de sensibilidad mediante tiras de gradiente.<sup>166,338</sup>

No obstante, la densidad y dispersión de las subpoblaciones varía dependiendo del aislado estudiado, desconociéndose la etiología subyacente. En un estudio recientemente publicado por Nicoloff y colaboradores, encuentran que la causa más frecuente de heterorresistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram negativas se debe a un fenómeno mutacional producido por mutaciones en tándem que generan amplificación génica.<sup>336</sup> Sin embargo, este estudio no demuestra que este tipo de mecanismo esté implicado de forma particular en el fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina. De forma genérica, la heterorresistencia bacteriana a los antimicrobianos se produce por diferentes mecanismos de tipo mutacional. Se han descrito diversos genes implicados, dependiendo del antimicrobiano y la especie bacteriana, aunque también se han observado mecanismos bacterianos de tipo fisiológico que pueden provocar la expresión heterogénea de determinados genes en la población bacteriana general, jugando un papel importante en la adaptación y supervivencia de la bacteria.<sup>356</sup> Hasta la fecha no se ha asociado la mutación de un gen específico como causa única de este fenotipo heterorresistente a los antimicrobianos; sin embargo, mutaciones que afecten a los genes encargados de generar la maquinaria de reparación del ADN podrían estar implicados en un fenotipo de “panheterorresistencia”; es decir, una capacidad aumentada de presentar mutaciones en la replicación de una población bacteriana daría lugar a la generación de subpoblaciones mutantes que

## DISCUSIÓN GENERAL

podrían presentar mecanismos de resistencia a distintos antimicrobianos, poniéndose de manifiesto en los distintos medios selectivos.

En el primero de nuestros trabajos, se demostró que el fenotipo heterogéneo de sensibilidad a fosfomicina, así como los diferentes grados de densidad y resistencia de subpoblaciones, pueden explicarse por la combinación de dos factores: una elevada frecuencia de mutantes en la población bacteriana junto con alteraciones en los genes relacionados con la resistencia a fosfomicina. Este estudio fue realizado sobre una colección de cepas isogénicas de laboratorio y aislados clínicos de *E. coli*. La elevada frecuencia de mutación determinada por alteraciones en genes de reparación del ADN justifica la tendencia a producir con mayor probabilidad un fenotipo poblacional heterogéneo, en el que, dependiendo de la función específica de la proteína de reparación afectada, puede dar lugar a bacterias con fenotipos hipermutadores fuertes o débiles y, por consiguiente, a una mayor densidad y/o heterogeneidad de subpoblaciones con diferente sensibilidad y respuesta al antimicrobiano.<sup>402</sup> El hecho de que no toda la población bacteriana presente la misma respuesta al antimicrobiano va a depender del momento exacto en el que se produzca la mutación que afecte a la disminución de la sensibilidad al antimicrobiano. Basado en el trabajo de Salvador E. Luria y Max Delbrück publicado a mitad del siglo XX,<sup>448</sup> si la mutación se produjese en las primeras fases de división de la UFC afectando a las primeras generaciones bacterianas, la población resultante será prácticamente homogénea y con sensibilidad disminuida. Sin embargo, si estas mutaciones se producen en las últimas generaciones, coexistirán dos poblaciones distintas, una población mayoritaria sensible acompañada de una subpoblación minoritaria con sensibilidad disminuida.

En segundo lugar, la presencia de mutaciones subyacentes en los genes relacionados con resistencia a fosfomicina; que por sí mismos, no son capaces de producir resistencia clínica en un solo paso (excepto en el caso de alteraciones en el sistema de transporte de la G6P), favorece a su vez que existiendo un fondo hipermutador subyacente, se pueda seleccionar con mayor probabilidad una segunda mutación produciendo una resistencia a fosfomicina de mayor nivel. En *E. coli*, y probablemente en otros Enterobacterales, la resistencia a fosfomicina aumenta escalonadamente mediante la adquisición de mutaciones en los genes asociados con la resistencia a fosfomicina.<sup>367</sup> En aquellas cepas con frecuencia de aparición de mutantes inferiores a  $4 \times 10^{-7}$ , consideradas como "normomutadoras"<sup>516</sup> se observa en este trabajo, cómo los valores de CMI a fosfomicina aumentan de forma homogénea. Con respecto a las cepas que no presentaban mutaciones en los genes asociados con la resistencia a la fosfomicina, pero eran "hipermutadoras débiles o fuertes", mostraban un mayor número de subpoblaciones, aunque con crecimiento limitado a concentraciones de fosfomicina de 64 mg/L, consideradas como resistentes según el punto de corte clínico de EUCAST.<sup>255</sup> Esto se observó en las cepas de laboratorio que presentaban delecionados los genes que transcriben para proteínas

## DISCUSIÓN GENERAL

involucradas en el sistema de reparación de emparejamiento erróneo de bases del ADN mediante metilación directa (*mutHLS*), el sistema de reparación específico de residuos de guanina oxidados (*mutT*, *mutM* y *mutY*) y el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*uvrD*). La única excepción fue la cepa mutante de delección del gen *dnaQ*, el cual transcribe para la subunidad épsilon de la ADN polimerasa III, la cual participa en la actividad exonucleasa en dirección 3'-5', reconociendo y reparando aquellos errores producidos durante la replicación del ADN. Debido a la alta frecuencia de aparición de mutantes de esta cepa, se observaron subpoblaciones capaces de sobrevivir a concentraciones superiores a 64 mg/L de fosfomicina, lo que se explicaría por la acumulación de mutaciones en más de un gen relacionado con la resistencia a este antimicrobiano. Por lo tanto, bajo un fenotipo “hipermutador”, ya sea débil o fuerte, un único evento mutacional afectaría a alguno de los genes relacionados con la resistencia a fosfomicina y, como se había demostrado en trabajos previos, los valores de CMI más elevados se observarían cuando las mutaciones afectan a cualquiera de los componentes del transportador de G6P,<sup>367</sup> con la excepción de aquellos aislados que presenten mutaciones en la subunidad épsilon de la ADN polimerasa III debido a su tan elevada frecuencia de mutantes, lo que facilita la generación de subpoblaciones mutantes con alta resistencia a fosfomicina por acumulación de eventos mutacionales, que probablemente al azar afecten a varios genes en relación con la resistencia a fosfomicina.

Poseer un fenotipo y/o genotipo hipermutador junto con la presencia de ciertas mutaciones en los genes de resistencia relacionados con la fosfomicina, especialmente en aquellos genes que presentan un bajo impacto sobre la CMI, como es el caso de los genes que transcriben para las proteínas GIpT y PtsI, es responsable de los diferentes fenotipos de heterorresistencia a fosfomicina. La densidad de las subpoblaciones se encuentra en relación con la frecuencia de mutantes de la bacteria; lo cual puede deberse a la capacidad o facilidad de adquirir mutaciones de la propia bacteria pudiendo estar originado por defectos o carencia del sistema de reparación del ADN. Este fenómeno se explicó parcialmente en el trabajo publicado por Ellington y colaboradores,<sup>524</sup> en el que relacionaron los fenotipos bacterianos mutadores con una mayor tendencia a presentar resistencia a fosfomicina. Por otro lado, aunque algunos genes relacionados con la actividad de fosfomicina podrían causar un aumento de la sensibilidad, como sería el caso en el que se produjese una sobreexpresión en los transportadores del antimicrobiano, no podemos descartar la posibilidad de que la amplificación transitoria o estable de otros genes bacterianos, como describen Nicoloff y colaboradores en su trabajo, pueda ser otra fuente de la respuesta heterogénea a este antimicrobiano.<sup>334</sup>

Además, la imprecisión o la escasa concordancia de los resultados de sensibilidad obtenidos en los diferentes métodos de estudio de sensibilidad a fosfomicina, se han asociado previamente con el uso de diferentes concentraciones bacterianas iniciales implícito en cada ensayo. Esta variación

## DISCUSIÓN GENERAL

puede explicarse por producirse una selección aleatoria de subpoblaciones mutantes resistentes ya presentes en el inóculo bacteriano inicial. A mayor inóculo bacteriano inicial, mayor probabilidad de presencia de subpoblaciones mutantes preexistentes.<sup>256,368</sup> Los métodos de estudio de sensibilidad realizados en caldo, con frecuencia no permiten diferenciar la presencia de subpoblaciones bacterianas heterorresistentes de aquellas bacterias con una población con sensibilidad homogénea. Por lo tanto, es probable que los métodos que utilizan el medio de agar, como la técnica de disco-difusión o la tira de gradiente, sean más eficaces en el cribado para detección de subpoblaciones bacterianas, ya que las subpoblaciones minoritarias no enmascaran a la población sensible. En este trabajo se realizaron las pruebas de sensibilidad a fosfomicina mediante microdilución en caldo y tiras de gradiente para realzar la importancia de incluir a las subpoblaciones en la interpretación de los valores de CMI, conociendo que ninguno de los dos ensayos son el método de referencia; sin embargo, se utilizan de forma rutinaria en el laboratorio de Microbiología Clínica para estudio de sensibilidad a fosfomicina.

El estudio de sensibilidad a fosfomicina mediante tiras de gradiente es un método ha favorecido el trabajo de observación de la variabilidad y densidad de la resistencia heterogénea a fosfomicina de las bacterias del ensayo. Los valores de CMI de fosfomicina obtenidos mediante microdilución en caldo realmente podrían ser más representativos de la sensibilidad de la población bacteriana en conjunto y no solo de la población mayoritaria debido a que favorece el crecimiento en caldo de subpoblaciones resistentes. Sin embargo, los resultados de este método son a veces difícil de interpretar por la presencia de pocillos salteados que pueden deberse al crecimiento de subpoblaciones o posibles contaminaciones. Es importante destacar que en nuestro estudio se ha observado que las subpoblaciones muestran una resistencia de tipo estable, lo cual podría estar implicado en posibles fracasos terapéuticos, especialmente en aquellos casos con elevado inóculo bacteriano debido a que el número total de subpoblaciones presentes sería más elevado. De ahí que las directrices de EUCAST sobre ignorar las colonias que aparecen dentro de los halos de inhibición cuando se realiza el estudio de sensibilidad mediante ensayos de disco-difusión deben ser interpretadas con cierta precaución.

Una de las limitaciones de este trabajo es el hecho de focalizar la etiología de los distintos fenotipos de heterorresistencia a fosfomicina básicamente por la combinación de dos tipos de mecanismos, los relacionados con la resistencia a fosfomicina y aquellos en relación con la hipermutación bacteriana. No obstante, no se pueden descartar otras causas distintas. En nuestra colección de mutantes de laboratorio, el genotipo se correlacionaba con el fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina, así como con la variabilidad de subpoblaciones esperada. Sin embargo, en los aislados clínicos heterorresistentes a fosfomicina, no siempre se encontró esta correlación en el estudio genético de resistencia a fosfomicina o de hipermutación realizado mediante

## DISCUSIÓN GENERAL

técnicas de secuenciación masiva. Hay que resaltar, que se detectaron diferentes polimorfismos en los genes estudiados cuya repercusión funcional se desconoce y que se conservaban entre distintos aislados. El análisis específico de los genes relacionados con la resistencia a fosfomicina y sistemas de reparación del ADN se realizó de aquellos que presentan una mayor relevancia. Distintas vías del metabolismo bacteriano podrían estar implicadas en la sensibilidad a este antimicrobiano y el arsenal proteico que contribuye en la reparación del ADN es verdaderamente extenso; por lo tanto, resulta verdaderamente complicado estudiar de forma detallada todos los genes que influyen de forma directa o indirecta en sendos fenómenos.

Con respecto al estudio de la actividad *in vitro* del antimicrobiano frente a los aislados con fenotipo heterorresistente e hipermutadores realizado mediante curvas de letalidad, se utilizaron dos concentraciones de fosfomicina distintas, relevantes desde un punto de vista clínico, correspondientes al punto de corte de resistencia según EUCAST y a la concentración máxima del fármaco en plasma, respectivamente. Se observó actividad del antimicrobiano con ambas concentraciones cuando se utilizaron inóculos bacterianos bajos ( $1 \times 10^5$  UFC totales;  $5 \times 10^3$  UFC/mL en 20 mL) frente a todas las cepas estudiadas en el ensayo, excepto frente a la cepa de laboratorio doble mutante de delección  $\Delta mutS-\Delta glpT$  y en el aislado *E. coli* C74. El mutante simple  $\Delta glpT$  (sistema de captación de *E. coli* para glicerol-3-fosfato, que interviene en la internalización de fosfomicina en la bacteria)<sup>146,525</sup> no sobrevivió a la acción del antimicrobiano cuando se utilizaron inóculos bajos; sin embargo, creció a 64 mg/L en el ensayo realizado con alto inóculo ( $1 \times 10^7$  UFC ( $5 \times 10^5$  UFC/mL en 20mL), como se había observado en trabajos previos.<sup>367</sup> Curiosamente, el mutante simple hipermutador  $\Delta mutS$  (componente del complejo MutHLS) no sobrevivió a la actividad del antimicrobiano en condiciones de bajo ni alto inóculo. Sin embargo, el mutante que combinaba ambas mutaciones sobrevivió tanto con bajo como con alto inóculo a ambas concentraciones de fosfomicina, lo que explica el papel que pueden ejercer las subpoblaciones con sensibilidad disminuida a fosfomicina de esta cepa con fenotipo heterorresistente e hipermutadora, en la supervivencia a altas concentraciones del antimicrobiano. Lógicamente, en esta cepa doble mutante de delección hipermutadora con el gen *glpT* delecionado, se ve favorecida la aparición de subpoblaciones al azar que presenten mutaciones en un segundo gen relacionado, por ejemplo, con el transporte de fosfomicina como *uhpT*, lo que les capacita para sobrevivir por encima del punto de corte de resistencia clínica e incluso a la  $C_{m\acute{a}x}$  sérica. Probablemente, las bacterias hipermutadoras, de forma general generan subpoblaciones con sensibilidad disminuida a cualquier antimicrobiano o incluso con características metabólicas distintas que las diferencian de la población mayoritaria y que somos capaces de observarlas separadas del resto al exponerlas a un medio selectivo. En el caso de la mutante simple de delección  $\Delta mutS$  no se generaron subpoblaciones que sobreviviesen a 64 mg/L ni a 307 mg/L, lo que muy probablemente sucediera debido a la ausencia de

## DISCUSIÓN GENERAL

subpoblaciones mutantes para el sistema de transporte de G6P. El hecho de que el aislado clínico EcC74 sobreviviese bajo las mismas condiciones que el doble mutante  $\Delta mutS-\Delta glpT$  es difícil de explicar, ya que en el análisis genético de este aislado solo se encontró delección completa del gen *mutS* y se esperaba que se comportase como los otros aislados con genotipo y fenotipo similares, como es el caso del aislado EcC61; es decir, de forma semejante al mutante simple  $\Delta mutS$ . Verdaderamente desconocemos la implicación que los diversos polimorfismos genéticos encontrados en estos aislados pudieran tener en el funcionamiento correcto de las proteínas para las que transcriben y en la aparición de subpoblaciones con sensibilidad disminuida a fosfomicina, lo que podría explicar las diferencias observada en este ensayo entre los distintos aislados. Por otro lado, teniendo en cuenta el hecho de que las mutaciones en estos aislados hipermutadores se producen de forma azarosa, muy probablemente estas diferencias disminuirían en el caso de realizar un mayor número de repeticiones del ensayo. Además, hay que tener en consideración, que la actividad de la fosfomicina en este ensayo puede estar sobreestimada. El efecto que ejercen las concentraciones estáticas de este antimicrobiano puede no reflejar el efecto real bajo condiciones dinámicas del antimicrobiano en base a la farmacocinética humana.<sup>266</sup>

En definitiva, una elevada mutabilidad bacteriana podría definir el origen y variabilidad observados en el fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina. Por consiguiente, las subpoblaciones observadas en los estudios de sensibilidad a fosfomicina en aislados hipermutadores deben tenerse en cuenta, no solo como posible fuente de fracaso terapéutico de la fosfomicina, sino también para el resto de antimicrobianos. Teniendo en cuenta el trabajo publicado por LeClerc y colaboradores, la incidencia del fenómeno de hipermutación en bacterias como *E. coli*, no es un dato desdeñable.<sup>398</sup> Los mecanismos de defensa del huésped o la propia presión que ejerce el tratamiento con antimicrobianos pueden producir estados de estrés en la bacteria favoreciendo la aparición de mutantes bacterianas. El hecho de observar un fenotipo de heterorresistencia en el estudio de sensibilidad a un antimicrobiano de un aislado clínico nos debe alertar de la posibilidad de encontrarnos ante un microorganismo hipermutador o con una elevada frecuencia de generación de mutantes, lo cual puede tener consecuencias a la hora de plantear una estrategia terapéutica apropiada. Un planteamiento posible para el tratamiento de infecciones por aislados heterorresistentes y/o hipermutadores sería el hecho de realizar una terapia combinada para evitar la selección de subpoblaciones resistentes al fármaco usado en monoterapia.

La importancia clínica de estos resultados para el tratamiento de las infecciones causadas por subpoblaciones heterorresistentes debe ser evaluada en mayor profundidad. Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la fosfomicina deben tenerse en cuenta en el estudio de sensibilidad a este fármaco.

## DISCUSIÓN GENERAL

En este sentido el segundo estudio evaluó la actividad de fosfomicina sola y en combinación con amikacina frente a aislados clínicos y comensales de *E. coli*, cuatro hipermutadores (pertenecientes al primer trabajo de la presente tesis doctoral) y dos normomutadores, todos ellos con fenotipo de heterorresistencia a la fosfomicina. Para evaluar dicha actividad se realizaron diversos ensayos; pero la principal aportación de este estudio respecto al anterior es sin duda la utilización del modelo dinámico de infección *in vitro* en cartuchos con fibra hueca o lo que se denomina en término anglosajón como HFIM. En este modelo, se evaluó el efecto de dosis humanizadas de fosfomicina sódica y amikacina en monoterapia y en combinación, teniendo en cuenta los valores de FC/FD humanos, en un modelo de infección sistémica utilizando un HFIM. Estos modelos presentan una ventaja fundamental, y es que permiten simular con precisión la FC/FD de los antimicrobianos en el cuerpo humano.<sup>504</sup> Además, los ensayos con este modelo son reproducibles, permiten el estudio de diferentes drogas al mismo tiempo con distintos perfiles FC/FD, así como la toma de muestras repetidas en las distintas fases de crecimiento bacteriano.

Se realizó la caracterización de los aislados del segundo estudio analizando la sensibilidad a los dos antimicrobianos, la frecuencia de aparición de mutantes (rifampicina, fosfomicina y amikacina) y completando el análisis genético (centrado en los genes en relación con la resistencia a la fosfomicina y en los genes de reparación del ADN) en aquellos que aislados que no habían sido estudiados en el primer estudio. En el análisis genético realizado a los aislados normomutadores, no se detectaron deleciones ni inserciones en los genes investigados del sistema de reparación del ADN, solo polimorfismos de impacto desconocido. No obstante, estos aislados presentaron mutaciones en *GlpT*, hallazgo que explicaría en parte el comportamiento de los aislados en presencia de fosfomicina, ya que se ha demostrado que una frecuencia aumentada de mutantes espontáneos resistentes a fosfomicina en este tipo de cepas. Como se ha comentado en el estudio anterior, en el mutante de laboratorio  $\Delta glpT$ , pueden aparecer mutaciones en otros genes relacionados con resistencia a fosfomicina, lo que predispone a la bacteria a seleccionar subpoblaciones resistentes a este antimicrobiano en sucesos mutacionales consecutivos y escalonados. No obstante, la inactivación de la proteína *GlpT* por sí sola, no explica el fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina observado en estos aislados clínicos normomutadores, por lo que deben intervenir factores adicionales que desconocemos. Además, el número de subpoblaciones y el alcance de la CMI de las mismas de los aislados normomutadores, observada en los ensayos de sensibilidad con tiras de gradiente, supera lo observado en la mayoría de aislados hipermutadores, exceptuando en aquellos  $\Delta dnaQ$ . Sin embargo, ninguno de ellos presentaba mutaciones de deleción o inserción en este gen, más allá de polimorfismos genéticos en el aislado Ec3203.

## DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que todos los aislados, tanto hipermutadores como normomutadores, presentaron valores de CMI a fosfomicina inferiores a 8 mg/L en el estudio de sensibilidad mediante tiras de gradiente (sin tener en cuenta la CMI de las subpoblaciones presentes en el interior de la zona de inhibición), el régimen de tratamiento con fosfomicina en monoterapia a las dosis máximas aprobadas por la EMA de 8g/8h,<sup>518</sup> no logró erradicar el crecimiento bacteriano en el modelo dinámico de infección. Surgieron subpoblaciones resistentes a fosfomicina en todos los ensayos, las cuales presentaban valores de CMI a fosfomicina altamente resistentes ( $\geq 1024$  mg/L), siendo consideradas como estables. La monoterapia con fosfomicina solo tuvo éxito frente a la cepa de control ATCC 25922, al igual que se había observado en estudios previos.<sup>450</sup> Esto demuestra que a pesar de lo observado en los ensayos realizados mediante curvas de letalidad, en los que la mayoría de los aislados no sobrevivían al efecto de la fosfomicina, bajo condiciones que simulan la FC y la FD humana en el tratamiento sistémico en monoterapia con fosfomicina, estos aislados heterorresistentes sobrevivirían al efecto del fármaco. En el estudio realizado por Abbott y colaboradores, en el que evalúan la exposición de altas y bajas concentraciones de fosfomicina urinaria (en base al tratamiento oral) mediante un modelo dinámico *in vitro* de infección vesical frente a 16 aislados clínicos de Enterobacterias (8 *E. coli*, 4 *E. cloacae* y 4 *K. pneumoniae*), demostraron que los factores que mejor parecían predecir el recrecimiento bacteriano eran la presencia de una heterorresistencia de alto nivel, así como la especie bacteriana.<sup>387</sup> Aunque este estudio difiere del nuestro, dado que simula un modelo de infección urinaria vesical y evalúa el tratamiento oral con fosfomicina-trometamol, los resultados observados apoyan a los obtenidos en nuestro trabajo.

En un segundo paso, se decidió evaluar el posible efecto que podría tener la amikacina sobre estos aislados si se combinaba con la fosfomicina. La selección de amikacina en el tratamiento combinado con fosfomicina se realizó debido a que se trata de un antimicrobiano que activo frente a bacterias multirresistentes, está catalogado como antimicrobiano de acceso según la clasificación AWaRe de la OMS<sup>470</sup> y su uso sistémico en monoterapia está limitado al tratamiento de infecciones urinarias. Se usa de forma extensa como parte de tratamientos combinados para infecciones graves causadas por bacilos aerobios Gram negativos.<sup>127</sup> Su forma de administración intravenosa en una única dosis diaria, facilita su posible combinación con otras drogas.<sup>477</sup>

Previo al estudio del efecto combinado de ambos fármacos, se evaluó la actividad de la amikacina en monoterapia teniendo en cuenta la FC/FD de este antimicrobiano administrado en una dosificación de 15mg/kg/24h. A pesar de que todos los aislados eran sensibles a este fármaco, independientemente de la metodología utilizada (tiras de gradiente o microdilución en caldo), todos sobrevivieron al tratamiento con amikacina en monoterapia en el modelo dinámico de infección *in vitro*. Además, en los aislados EcC59, EcC61, EcC74, EcP45 y Ec3203 se detectaron subpoblaciones

## DISCUSIÓN GENERAL

estables resistentes a amikacina que podían explicar la supervivencia al tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, curiosamente, el aislado Ec50406 y la cepa de control fueron capaces de sobrevivir a la monoterapia con amikacina, pero en ninguno de los aislados se detectó la presencia de subpoblaciones resistentes, ni en los controles sin antimicrobiano ni en el ensayo con amikacina. La supervivencia bajo monoterapia con amikacina de ambas cepas en ausencia de subpoblaciones resistentes podría explicarse por un fenómeno de tolerancia o persistencia, el cual permitiría la supervivencia de la población bacteriana gracias a la presencia de variantes fenotípicas no mutantes o gracias a fenómenos epigenéticos no heredables. Este efecto ha sido previamente observado con distintos antimicrobianos incluyendo en aminoglucósidos.<sup>492,526</sup>

Varios estudios de FC/FD han demostrado que la fosfomicina en monoterapia podría no ser efectiva incluso en el tratamiento frente a bacilos Gram negativos sensibles a la fosfomicina según los valores de CMI,<sup>450,527-529</sup> sin embargo, ha demostrado eficacia en el tratamiento combinado con diferentes antimicrobianos (incluyendo la amikacina) frente a aislados clínicos de diversas especies bacterianas como *E. coli*, *K. pneumoniae* o *P. aeruginosa* resistente a múltiples antimicrobianos.<sup>460,492,527,530</sup> A pesar de tratarse de especies bacterianas y exposiciones antimicrobianas diferentes, nuestros resultados concuerdan con los observados previamente en el trabajo realizado por Sime y colaboradores también llevado a cabo en HFIM, en el que observaron que la combinación de amikacina y fosfomicina (empleada como tratamiento en aerosol) consiguió eliminar eficazmente el crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* resistentes a amikacina.<sup>492</sup>

Como es bien conocido, la amikacina presenta numerosos efectos adversos, entre los que destaca su elevada nefrotoxicidad. Su administración una vez al día combinada con un fármaco seguro y con escasos efectos adversos como la fosfomicina sódica permitiría disminuir la duración del tratamiento o incluso las dosis empleadas, contribuyendo a reducir la toxicidad del tratamiento antimicrobiano, así como el impacto ecológico del mismo. A pesar de las diferencias metodológicas, los resultados de los ensayos de tablero de ajedrez y de las curvas de letalidad realizados con distintas combinaciones de fosfomicina y amikacina, mostraron valores sinérgicos a concentraciones inferiores a las máximas séricas en cada uno de los aislados. Esto apoyaría la posibilidad de emplear dosis inferiores a las utilizadas en monoterapia al realizar el tratamiento combinado con ambos fármacos, lo que podría ser motivo de estudio de trabajos futuros con HFIM en los que se pruebe el efecto de combinar dosis inferiores de los dos fármacos frente a este tipo de bacterias.

Este segundo estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, aquellas derivadas de la propia metodología empleada. Aunque el modelo HFIM permite simular la FC/FD humana teniendo

## DISCUSIÓN GENERAL

en cuenta las velocidades de absorción y eliminación del fármaco, carece de la respuesta inmunitaria característica del huésped al igual que el resto de los modelos *in vitro*. De todas formas, el HFIM es altamente predictivo de los resultados microbiológicos clínicos, ya que se trata del mejor modelo *in vitro* para la evaluación de la concentración antimicrobiana que previene de la aparición de resistencias. En nuestro estudio, se observa como ninguno de los aislados sobrevive a la  $C_{\text{máx}}$  sérica correspondiente a la dosis de 15 mg/kg/día; sin embargo, en el modelo dinámico HFIM, utilizando la misma dosis, todos los aislados, que además se clasificaron como sensibles en base a los estudios de tira de gradiente y microdilución en caldo, sobrevivieron. Esto indica que los ensayos estáticos podrían presentar ciertas limitaciones a la hora de predecir la actividad de los antimicrobianos.

Además, el efecto del antimicrobiano sobre la bacteria se puede estudiar durante largos periodos, permitiendo evaluar lo que ocurriría por ejemplo en un tratamiento antimicrobiano prolongado o analizar bacterias de crecimiento lento.<sup>504</sup>

Otra de las limitaciones del estudio realizado en HFIM es que únicamente se evaluó la combinación de una dosis fija de fosfomicina y amikacina, lo que imposibilita descartar la posibilidad de la aparición de mutantes resistentes con la posible utilización de dosificaciones inferiores de ambos fármacos.

Los resultados de la segunda parte de la tesis doctoral demuestran que puede haber un riesgo de fracaso terapéutico en el tratamiento de infecciones por *E. coli* hipermutador o normomutador, heterorresistente a fosfomicina, utilizando fosfomicina en monoterapia. A pesar de monoterapia a dosis humanizadas en el modelo estudiado fue ineficaz incluso frente a la cepa control *E. coli* ATCC 25922. Los resultados de este estudio respaldan la utilización de fosfomicina-amikacina en combinación por su capacidad para disminuir rápidamente la carga bacteriana y prevenir así la aparición de subpoblaciones resistentes a sendos antimicrobianos.

## CONCLUSIONES

### VII. CONCLUSIONES

1. El origen del fenotipo de heterorresistencia a fosfomicina pueden explicarse parcialmente por una elevada frecuencia de aparición de mutantes en combinación con la presencia de mecanismos de resistencia de bajo nivel a este antimicrobiano.
2. El grado de la frecuencia de aparición de mutantes se correlaciona con la variabilidad en la proporción y CMI de las subpoblaciones heterorresistentes a fosfomicina en aislados de *E. coli*, teniendo un mayor impacto en aquellos aislados con alteraciones en genes relacionados con resistencia a fosfomicina.
3. El estudio de sensibilidad a fosfomicina mediante tiras de gradiente es un método eficaz para observar la variabilidad y el gradiente de heterorresistencia a este antimicrobiano, siendo el ensayo mediante microdilución más representativo de la sensibilidad de la población bacteriana general.
4. Los resultados de los ensayos realizados en los modelos de infección *in vitro* en HFIM con aislados de *E. coli* heterorresistente a fosfomicina demuestran que puede existir un riesgo de fracaso terapéutico con el uso de amikacina (15 mg/kg/24h) o fosfomicina (8g/8h) en monoterapia.
5. El estudio *in vitro* en HFIM demuestra que la terapia combinada de fosfomicina (8g/8h) y amikacina 15 mg/kg/24h, es eficaz frente a aislados de *E. coli* heterorresistente a fosfomicina, tanto normomutadores como hipermutadores, disminuyendo rápidamente la carga bacteriana y previniendo la aparición de subpoblaciones resistentes.

## BIBLIOGRAFÍA

### VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem Pharmacol* 2017; **133**: 4–19.
2. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol* 2010; **1**: 134.
3. Services U. D of H and H. *Antibiotic resistance threats in the United States*. 2019.
4. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS One* 2012; **7**: 34953.
5. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, *et al.* The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv* 2015; **1**.
6. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 445–53.
7. Fajardo A, Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11**: 161–7.
8. Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* 2009; **11**: 2970–88.
9. Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: What's new? *Curr Opin Microbiol* 2014; **21**: 45–50.
10. Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, *et al.* Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* 2014; **509**: 612–6.
11. Nesme J, Simonet P. The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol* 2015; **17**: 913–30.
12. Nesme J, Cécillon S, Delmont TO, Monier JM, Vogel TM, Simonet P. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 2014; **24**: 1096–100.
13. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. 2018.
14. Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations.
15. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 287–92.
16. Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, *et al.* The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens.
17. ABRAHAM. EP, CHAIN. E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* 1940.
18. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* 1996; **12**: 9–16.

## BIBLIOGRAFÍA

19. Hiltunen T, Virta M, Anna-Liisa L. Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2017; **372**.
20. Baquero F, Tedim AP, Coque TM, *et al*. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. 2013.
21. Donguy F. *ESAC-NET report 2018*.
22. Hendriksen RS, Munk P, Njage P, *et al*. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 2019; **10**: 1–12.
23. Wang F, Han W, Chen S, *et al*. Fifteen-Year Application of Manure and Chemical Fertilizers Differently Impacts Soil ARGs and Microbial Community Structure. *Front Microbiol* 2020; **11**.
24. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268–81.
25. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, *et al*. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clin Infect Dis* 2018; **67**: 1803–14.
26. O'NEILL J. *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED BY JIM O'NEILL*. 2016.
27. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis* 2014; **20**: 1170–5.
28. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, *et al*. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**: 56–66.
29. O'NEILL J. *Review on Antibiotic resistance. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014.
30. ECDC. *Technical report. The bacterial challenge: time to react*. 2009.
31. Sally C Davies, \*Tom Fowler, John Watson, David M Livermore DW. Annual Report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance Published. *Lancet* 2013; **381**: 1606–1069.
32. Daneman N, Bronskill SE, Gruneir A, *et al*. Variability in antibiotic use across nursing homes and the risk of antibiotic-related adverse outcomes for individual residents. *JAMA Intern Med* 2015; **175**: 1331–9.
33. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, *et al*. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**: E3463–70.
34. World Health Organization. *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*. 2018.
35. WHO. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial

## BIBLIOGRAFÍA

- Resistance. 2015. Available at: [www.paprika-annecy.com](http://www.paprika-annecy.com). Accessed May 4, 2020.
36. Organization WH. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Who* 2015: 36.
37. Anon. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net>. Accessed May 13, 2020.
38. Anon. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR). 2020.
39. Anon. OPS/OMS | Plataforma de Análisis de ReLAVRA. Available at: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=15319:amr-dashboard-description&Itemid=40388&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15319:amr-dashboard-description&Itemid=40388&lang=es). Accessed May 14, 2020.
40. WHO. Emerging antimicrobial resistance reporting framework. 2018.
41. WHO. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. 2016-2017*. 2017.
42. WHO. *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. Early implementation. 2017-2018*. 2019.
43. Anon. WHO | UN Interagency Coordination Group (IACG) on Antimicrobial Resistance. *WHO* 2020.
44. Ecdc. *Surveillance of antimicrobial resistance*. 2018.
45. WHO. *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*. 2017.
46. Anon. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Available at: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. Accessed May 13, 2020.
47. Galani I, Karaiskos I, Karantani I, *et al*. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Eurosurveillance* 2018; **23**: 1700775.
48. Sociedad Española de Medicina Preventiva SP e H. ESTUDIO EPINE-EPPS 2016. Informe global de España Resumen provisional. 2016; **2016**: 31.
49. AEMPS. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. 2014: 37.
50. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**: 298–304.
51. Payne C. COVID-19 in Africa. *Nat Hum Behav* 2020: 1–2.
52. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am* 2016; **30**: 377–90.
53. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; **27**: 128–42.
54. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **35**: 736–55.

## BIBLIOGRAFÍA

55. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 565–91.
56. Willems RJL, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: High-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **35**: 872–900.
57. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1–12.
58. Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, *et al.* Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2016; **110**: 377–80.
59. The World Health Organization (WHO). The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. *WHO Publ* 2014: 1–119.
60. Storr J, Twyman A, Zingg W, *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: New WHO evidence-based recommendations. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017; **6**.
61. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, *et al.* ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. 2014.
62. Knight GM, Clarkson M, De Silva TI. Potential impact of influenza vaccine roll-out on antibiotic use in Africa. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 2197–200.
63. Bürgmann H, Frigon D, Gaze WH, *et al.* Water and sanitation: An essential battlefront in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Ecol* 2018; **94**: 1–14.
64. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, *et al.* Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. *Clin Infect Dis* 2007; **44**: 159–77.
65. Jesús Rodríguez-Bañoa,\*, José Ramón Paño-Pardob,\*, Luis Alvarez-Rochac, Ángel Asensiod, Esther Calboe, Emilia Cercenadof, José Miguel Cisnerosg, Javier Coboh, Olga Delgado i, José Garnacho-Monteroj, Santiago Grauk, Juan Pablo Horcajada l, Ana Hornerom, RSJ y RS, A. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**.
66. Bhrigu K Lahkar. The Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs. 2019; **23**: 2019.
67. Davey P, Brown E, Charani E, *et al.* Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients ( Review ) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst Rev* 2013.
68. Schuts EC, Hulscher MEJL, Mouton JW, *et al.* Current evidence on hospital antimicrobial stewardship objectives: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 847–56.
69. OECD. *Stemming the Superbug Tide*. 2018.

## BIBLIOGRAFÍA

70. WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Who* 2017: 7.
71. AEMPS. Plan Nacional Resistencia Antibióticos. Línea estratégica II. Programas de optimización de uso de antibióticos (PROA).
72. Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. JUNTA DE ANDALUCIA. Programa PIRASOA: Programa integral de prevención, control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, y uso apropiado de los antimicrobianos. 2014: 25.
73. Anon. VALUE-Dx | IMI Innovative Medicines Initiative. Available at: <https://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/value-dx>. Accessed June 1, 2020.
74. MOORE PR, EVENSON A. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem* 1946; **165**: 437–41.
75. Ruíz AAB. Fourth report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals. 2020; **3**: 54–67.
76. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *et al*. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 161–8.
77. Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* 2017; **33**: 2413–5.
78. Mulo D, Ward MJ, Pedersen AB, Fèvre EM, Woolhouse MEJ, Van Bunnik BAD. Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. *Foodborne Pathog Dis* 2018; **15**: 467–74.
79. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, *et al*. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Heal* 2017; **1**: e316–27.
80. World Health Organization. *WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals*. 2017.
81. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, *et al*. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. *Science (80- )* 2019; **365**.
82. European Commission. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council on additives for use in animal nutrition. *Off J Eur Communities* 2003; **268**: 29–43.
83. Medicines Agency E. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017*.
84. Parlamento Europeo CDLUE. REGLAMENTO (UE) 2019/6 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. *D Of la Unión Eur* 2019; **2018**: 43–163.
85. FDA. Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. <https://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM588085>.

## BIBLIOGRAFÍA

pdf. 2017.

86. CVM, Fda, DS. *2018 Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals*. 2018.

87. Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 1102–3.

88. Laxminarayan R, Van Boeckel T, Frost I, *et al*. The Lancet Infectious Diseases Commission on antimicrobial resistance: 6 years later. *Lancet Infect Dis* 2020; **20**: e51–60.

89. Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, *et al*. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science (80- )* 2017; **357**: 1350–2.

90. WHO. *World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision*. World Health Organization; 2019.

91. Fao. Supporting the food and agriculture sectors in implementing the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance to minimize the impact of antimicrobial resistance.

92. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 371–87.

93. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. *No time to wait: securing the future from drug-resistant infections report to the secretary-general of the United Nations*. 2019.

94. Singer AC, Kirchhelle C, Roberts AP. (Inter)nationalising the antibiotic research and development pipeline. *Lancet Infect Dis* 2020; **20**: e54–62.

95. Kmietowicz Z. New antibiotics: NHS will test ‘pay for usefulness’ model to stimulate research. *BMJ* 2019; **366**: l4610.

96. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al*. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 318–27.

97. The World Health Organization (WHO). *2019 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT an analysis of the antibacterial clinical development pipeline*. 2019.

98. World Health Organization. *Antibacterial agents in preclinical development: an open access database*. 2019.

99. The Pew Charitable Trust. *Tracking the Global Pipeline of Antibiotics in Development*, April 2020. 2020: 2018–9.

100. Niu G, Li W. Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance. *Trends Biochem Sci* 2019; **44**: 961–72.

101. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, *et al*. Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. *Lancet* 2016; **387**: 168–75.

102. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, *et al*. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 239–51.

## BIBLIOGRAFÍA

103. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 423–35.
104. Yang JH, Bening SC, Collins JJ. Antibiotic efficacy — context matters. *Curr Opin Microbiol* 2017; **39**: 73–80.
105. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**.
106. Dickey SW, C Cheung GY, Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Publ Gr* 2017; **16**.
107. E Kaufmann SH, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. 2017.
108. Tomich AD, Klontz EH, Deredge D, *et al*. Small-molecule inhibitor of FosA expands fosfomycin activity to multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**.
109. Blanco P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Martínez JL, Alcalde-Rico M. The development of efflux pump inhibitors to treat Gram-negative infections. *Expert Opin Drug Discov* 2018; **13**: 919–31.
110. Savage PB. Multidrug-resistant bacteria: Overcoming antibiotic permeability barriers of Gram-negative bacteria. *Ann Med* 2001; **33**: 167–71.
111. Reens AL, Crooks AL, Su CC, *et al*. A cell-based infection assay identifies efflux pump modulators that reduce bacterial intracellular load. *PLoS Pathog* 2018; **14**.
112. Caetano L, Antunes M, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB, Finlay CBB. Quorum sensing in bacterial virulence.
113. Stokes JM, Lopatkin AJ, Lobritz MA, Collins JJ. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metab* 2019; **30**: 251–9.
114. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathog* 2014; **10**.
115. Kottur J, Nair DT. Reactive Oxygen Species Play an Important Role in the Bactericidal Activity of Quinolone Antibiotics. *Angew Chemie Int Ed* 2016; **55**: 2397–400.
116. Recacha E, Machuca J, Díaz-Díaz S, *et al*. Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 66–73.
117. Recacha E, Machuca J, Díaz de Alba P, *et al*. Quinolone resistance reversion by targeting the SOS response. *MBio* 2017; **8**.
118. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science (80- )* 2012; **336**: 315–9.
119. Golkar Z, Bagasra O, Gene Pace D. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries* 2014; **8**: 129–36.

## BIBLIOGRAFÍA

120. Santacroce L, Charitos IA, Bottalico L. A successful history: probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019; **17**: 635–45.
121. Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* 2019; **4**: 565–77.
122. Theuretzbacher U, Van Bambeke F V., Cantón R, *et al.* Reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2177–81.
123. Monaco M, Giani T, Raffone M, *et al.* Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014 Network EuSCAPE-Italy 5 , H Grundmann 6 , A Pantosti ([annalisa.pantosti@iss.it](mailto:annalisa.pantosti@iss.it)).
124. Dinh A, Salomon J, Bru JP, Bernard L. Fosfomycin: Efficacy against infections caused by multidrug-resistant bacteria. *Scand J Infect Dis* 2012; **44**: 182–9.
125. Vardakas KZ, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomycin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **47**: 269–85.
126. Mouton JW, Ambrose PG, Canton R, *et al.* Conserving antibiotics for the future: New ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resist Updat* 2011; **14**: 107–17.
127. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The ‘Old’ and the ‘New’ antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Front Public Heal* 2019; **7**: 151.
128. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options. *Front Microbiol* 2019; **10**: 80.
129. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science (80- )* 1969; **166**: 122–3.
130. Shoji I, Kato T, Hino H, *et al.* PRODUCTION OF FOSFOMYCIN (PHOSPHONOMYCIN) BY PSEUDOMONAS SYRINGAE.
131. KATAYAMA N, TSUBOTANI S, NOZAKI Y, HARADA S, ONO H. Fosfadecin and fosfocytocin, new nucleotide antibiotics produced by bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* 1990; **43**: 238–46.
132. Cao Y, Peng Q, Li S, Deng Z, Gao J. The intriguing biology and chemistry of fosfomycin: the only marketed phosphonate antibiotic. 2019.
133. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. THE MECHANISM OF ACTION OF FOSFOMYCIN (PHOSPHONOMYCIN). *Ann N Y Acad Sci* 1974; **235**: 364–86.
134. Andrews JM, Baquero F, Beltran JM, *et al.* International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother* 1983; **12**: 357–61.
135. Anon. [Improvement of the Therapeutic Efficacy of Fosfomycin by Addition of glucose-6-phosphate in the Treatment of Intraperitoneally Infected Mice (Author’s Transl)] - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6999793/>. Accessed June 7, 2020.

## BIBLIOGRAFÍA

136. Bergan T. Degree of absorption, pharmacokinetics of fosfomicin trometamol and duration of urinary antibacterial activity. *Infection* 1990; **18**: S65–9.
137. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, *et al.* International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases.
138. Medicines Agency E. *Recommendations to restrict use of fosfomicin antibiotics*. 2020.
139. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomicin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 43–50.
140. Anon. Nabriva Therapeutics Resubmits New Drug Application for Intravenous CONTEPO™ (fosfomicin) for Injection Nasdaq:NBRV. Available at: <https://www.globenewswire.com/news-release/2019/12/20/1963355/0/en/Nabriva-Therapeutics-Resubmits-New-Drug-Application-for-Intravenous-CONTEPO-fosfomicin-for-Injection.html>. Accessed June 8, 2020.
141. Aghamali M, Sedighi M, Bialvaei AZ, *et al.* Fosfomicin: Mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *J Med Microbiol* 2019; **68**: 11–25.
142. Pérez DS, Tapia MO, Soraci AL. Fosfomicin: Uses and potentialities in veterinary medicine. *Open Vet J* 2014; **4**: 26–43.
143. Gobernado M. Fosfomicina. *Antibiotics* 2013; **2**: 217–36.
144. Ambudkar S V., Larson TJ, Maloney PC. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of Escherichia coli. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9083–6.
145. Marger MD, Saier MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 13–20.
146. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A, *et al.* Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics* 2013; **2**: 217–36.
147. Skarzynski T, Mistry A, Wonacott A, Hutchinson SE, Kelly VA, Duncan K. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomicin. *Structure* 1996; **4**: 1465–74.
148. Eschenburg S, Priestman M, Schönbrunn E. Evidence that the fosfomicin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) is essential for product release. *J Biol Chem* 2005; **280**: 3757–63.
149. Marquardt JL, Brown ED, Walsh CT, *et al.* Kinetics, Stoichiometry, and Identification of the Reactive Thiolate in the Inactivation of UDP-GlcNAc Enolpyruvyl Transferase by the Antibiotic Fosfomicin. *Biochemistry* 1994; **33**: 10646–51.

## BIBLIOGRAFÍA

150. Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; **177**: 4194–7.
151. Villar HE, Jugo MB, Macan A, Visser M, Hidalgo M, Maccallini GC. Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male outpatients in Argentina. *J Infect Dev Ctries* 2014; **8**: 699–704.
152. Khan IU, Mirza IA, Ikram A, Ali S, Hussain A, Ghafoor T. In vitro activity of fosfomycin tromethamine against extended spectrum beta-lactamase producing urinary tract bacteria. *J Coll Physicians Surg Pakistan* 2014; **24**: 914–7.
153. Maraki S, Vardakas KZ, Mavromanolaki VE, et al. In vitro susceptibility and resistance phenotypes in contemporary *Citrobacter* isolates in a University Hospital in Crete, Greece. *Infect Dis (Auckl)* 2017; **49**: 532–9.
154. Falagas ME, Kastoris AC, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI. Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli: a systematic review of microbiological, animal and clinical studies. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 111–20.
155. Gutierrez Martin CB, Rodriguez Ferri EF. In vitro susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 1993; **279**: 387–93.
156. Reparaz J, Fernandez C. Sensitivity of *Vibrio* spp. to fosfomycin. *Chemotherapy* 1977; **23**: 58–62.
157. Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Hernández E, Picazo JJ. Aumento significativo de la resistencia a fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos (2005-2009-2011). *Rev Esp Quimioter* 2013; **26**: 43–6.
158. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ, Vardakasa KZ. Fosfomycin. 2016:321–47.
159. Jiang Y, Shen P, Wei Z, et al. Dissemination of a clone carrying a fosA3-harboring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **45**: 66–70.
160. Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of *mcr-1* among *Escherichia coli* clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 5623–4.
161. Sastry S, Clarke LG, Alrowais H, Query AM, Shutt KA, Doi Y. Clinical appraisal of fosfomycin in the era of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7355–61.
162. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes. Version 3.2. 2020.
163. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, et al. Widespread fosfomycin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal fosA gene. *MBio* 2017; **8**.

## BIBLIOGRAFÍA

164. Kresken M, Körber-Irrgang B, Biedenbach DJ, *et al.* Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. *Clin Microbiol Infect* 2016; **22**: 63.e1-63.e5.
165. Schmiemann G, Gágyor I, Hummers-Pradier E, Bleidorn J. Resistance profiles of urinary tract infections in general practice - An observational study. *BMC Urol* 2012; **12**: 33.
166. Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG. Fosfomicin susceptibility in carbapenem-resistant enterobacteriaceae from Germany. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 1893–7.
167. Martin D, Fougnot S, Grobost F, *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J Infect* 2016; **72**: 201–6.
168. Meier S, Weber R, Zbinden R, Ruef C, Hasse B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: An increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection* 2011; **39**: 333–40.
169. Oteo J, Orden B, Bautista V, *et al.* CTX-M-15-producing urinary Escherichia coli O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 712–7.
170. Oteo J, nica Bautista V, Lara N, *et al.* Parallel increase in community use of fosfomicin and resistance to fosfomicin in extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli.
171. Betrán A, Cortés AM, López C. *Evaluation of antibiotic resistance of Escherichia coli in urinary tract infections in Primary Care Barbastro Sector (Huesca)*. 2015.
172. Treviño M, Losada I, Fernández-Pérez B, Coira A, Peña-Rodríguez MF, Hervada X. Surveillance of antimicrobial susceptibility of Escherichia coli producing urinary tract infections in Galicia (Spain). *Rev Esp Quimioter* 2016; **29**: 86–90.
173. Briongos-Figuero LS, Gómez-Traveso T, Bachiller-Luque P, *et al.* Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *Int J Clin Pract* 2012; **66**: 891–6.
174. Cao XL, Shen H, Xu YY, *et al.* High prevalence of fosfomicin resistance gene fosA3 in blaCTX-M-harboring Escherichia coli from urine in a Chinese tertiary hospital during 2010-2014. *Epidemiol Infect* 2017; **145**: 818–24.
175. Ho PL, Chan J, Lo WU, *et al.* Dissemination of plasmid-mediated fosfomicin resistance fosA3 among multidrug-resistant Escherichia coli from livestock and other animals. *J Appl Microbiol* 2013; **114**: 695–702.
176. Ho PL, Chan J, Lo WU, *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of plasmidmediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary Escherichia coli isolates. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 1707–13.
177. Sato N, Kawamura K, Nakane K, Wachino JI, Arakawa Y. First detection of fosfomicin resistance

## BIBLIOGRAFÍA

- gene fosa3 in CTX-M-Producing escherichia coli isolates from healthy individuals in Japan. *Microb Drug Resist* 2013; **19**: 477–82.
178. Alrowais H, McElheny CL, Spychala CN, *et al.* Fosfomicin resistance in Escherichia coli, Pennsylvania, USA. *Emerg Infect Dis* 2015; **21**: 2045–7.
179. Benzerara Y, Gallah S, Hommeril B, *et al.* Emergence of plasmid-mediated fosfomicin-resistance genes among Escherichia coli isolates, France. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**: 1564–7.
180. Johnson JR, Drawz SM, Porter S, Kuskowski MA. Susceptibility to alternative oral antimicrobial agents in relation to sequence type ST131 status and coresistance phenotype among recent Escherichia coli Isolates from U.S. Veterans. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4856–60.
181. Linsenmeyer K, Strymish J, Weir S, Berg G, Brecher S, Gupta K. Activity of fosfomicin against extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing uropathogens in patients in the community and hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 1134–6.
182. Kopacz J, Mariano N, Colon-Urban R, *et al.* Identification of Extended-Spectrum-Lactamase-Positive Klebsiella pneumoniae Urinary Tract Isolates Harboring KPC and CTX-M-Lactamases in Nonhospitalized Patients. 2013.
183. Lewis DA, Gumede LYE, Van der Hoven LA, *et al.* Antimicrobial susceptibility of organisms causing community-acquired urinary tract infections in Gauteng Province, South Africa. *South African Med J* 2013; **103**: 377–81.
184. Randrianirina F, Soares JL, Carod JF, *et al.* Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in Antananarivo, Madagascar. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 309–12.
185. Tansarli GS, Athanasiou S, Falagas ME. Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of Enterobacteriaceae Causing Urinary Tract Infections in Africa. 2013.
186. López Díaz MC, Ríos E, Rodríguez-Avial I, Simaluiza RJ, Picazo JJ, Culebras E. In-vitro activity of several antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates expressing aminoglycoside-modifying enzymes: potency of plazomicin alone and in combination with other agents. *Int J Antimicrob Agents* 2017; **50**: 191–6.
187. Wu D, Chen Y, Sun L, Qu T, Wang H, Yu Y. Prevalence of fosfomicin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from patients in a University Hospital in China from 2013 to 2015. *Jpn J Infect Dis* 2018; **71**: 312–4.
188. Guo Y, Tomich AD, McElheny CL, *et al.* High-level fosfomicin resistance in vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Emerg Infect Dis* 2017; **23**: 1902–4.
189. Tang HJ, Chen CC, Zhang CC, *et al.* In vitro efficacy of fosfomicin-based combinations against clinical vancomycin-resistant Enterococcus isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **77**: 254–7.
190. Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Kapaskelis A, Samonis G. Antimicrobial

## BIBLIOGRAFÍA

- susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 497–9.
191. McCoy AJ, Sandlin RC, Maurelli AT. In vitro and in vivo functional activity of Chlamydia MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J Bacteriol* 2003; **185**: 1218–28.
192. De Smet KAL, Kempseell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomicin resistance of recombinant MurA from Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology* 1999; **145**: 3177–84.
193. Kumar S, Parvathi A, Hernandez RL, Cadle KM, Varela MF. Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from Vibrio fischeri that confers high fosfomicin resistance in Escherichia coli. *Arch Microbiol* 2009; **191**: 425–9.
194. Gisin J, Schneider A, Nägele B, Borisova M, Mayer C. A cell wall recycling shortcut that bypasses peptidoglycan de novo biosynthesis. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 491–3.
195. Borisova M, Gisin J, Mayer C. Blocking peptidoglycan recycling in Pseudomonas aeruginosa attenuates intrinsic resistance to fosfomicin. In: *Microbial Drug Resistance*. Vol 20. Mary Ann Liebert Inc., 2014; 231–7.
196. Scotti M, Lacharme-Lora L, Wagner M, Chico-Calero I, Losito P, Vázquez-Boland JA. Coexpression of virulence and fosfomicin susceptibility in Listeria: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. 2006.
197. Li X, Quan J, Yang Y, *et al.* Abrp, a new gene, confers reduced susceptibility to tetracycline, glycylcine, chloramphenicol and fosfomicin classes in acinetobacter baumannii. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; **35**: 1371–5.
198. Boos W. Binding protein-dependent ABC transport system for glycerol 3-phosphate of Escherichia coli. *Methods Enzymol* 1998; **292**: 40–51.
199. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, *et al.* Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of Escherichia coli. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 333–7.
200. Grimm H. In vitro investigations with fosfomicin on mueller-hinton agar with and without glucose-6-phosphate. *Infection* 1979; **7**: 256–9.
201. Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomicin transporter in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 2009; **191**: 6968–74.
202. Lloyd AD, Kadner RJ. Topology of the Escherichia coli uhpT sugar-phosphate transporter analyzed by using TnpHoA fusions. *J Bacteriol* 1990; **172**: 1688–93.
203. Kadner RJ, Shattuck-Eidens DM. Genetic control of the hexose phosphate transport system of Escherichia coli: mapping of deletion and insertion mutations in the uhp region. *J Bacteriol* 1983; **155**:

## BIBLIOGRAFÍA

1052.

204. Eiglmeier K, Boos W, Cole ST. Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the glycerol-3-phosphate transport protein with components of the hexose-6-phosphate transport system. *Mol Microbiol* 1987; **1**: 251–8.
205. Chen Q, Kadner RJ. Effect of altered spacing between *uhpT* promoter elements on transcription activation. *J Bacteriol* 2000; **182**: 4430–6.
206. Island MD, Kadner RJ. Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. *J Bacteriol* 1993; **175**: 5028–34.
207. Merkel TJ, Nelson DM, Brauer CL, Kadner RJ. Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* gene. *J Bacteriol* 1992; **174**: 2763–70.
208. Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 613–24.
209. Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science (80- )* 2003; **301**: 616–20.
210. Lemieux MJ, Huang Y, Wang D-N. The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 2004; **14**: 405–12.
211. Santoro A, Cappello AR, Madeo M, Martello E, Iacopetta D, Dolce V. Interaction of fosfomycin with the Glycerol 3-phosphate Transporter of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2011; **1810**: 1323–9.
212. Yang B, Larson TJ. Multiple promoters are responsible for transcription of the *glpEGR* operon of *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1998; **1396**: 114–26.
213. Cozzaeelli,-/ NR, Freedberq~ WB, Lin ECC. *Genetic Control of the L-a-Glycerophosphate System in Escherichia coli*. 1968.
214. Wong KK, Kwan HS. Transcription of *glpT* of *Escherichia coli* K12 is regulated by anaerobiosis and *fnr*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **94**: 15–8.
215. Lin ECC. Glycerol Dissimilation and its Regulation in Bacteria. 1976; **30**.
216. Xavier KB, Kossmann M, Santos H, Boos W. Kinetic analysis by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of internal P(i) during the uptake of sn-glycerol-3-phosphate by the *pho* regulon-dependent Ugp system and the *glp* regulon-dependent GlpT system. *J Bacteriol* 1995; **177**: 699–704.
217. Sakamoto Y, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M. Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (*cya*) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; **67**: 2030–3.
218. Ohkoshi Y, Sato T, Suzuki Y, *et al*. Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli* Clinical Isolates. 2017.
219. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of

## BIBLIOGRAFÍA

- fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2850–8.
220. Venkateswaran PS, Wu HC. Isolation and Characterization of a Phosphonomycin-Resistant Mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1972; **110**: 935–44.
221. Couce A, Briales A, Rodríguez-Rojas A, Costas C, Pascual Á, Blázquez J. Genomewide overexpression screen for fosfomycin resistance in *Escherichia coli*: Mura confers clinical resistance at low fitness cost. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2767–9.
222. Fu Z, Ma Y, Chen C, *et al*. Prevalence of fosfomycin resistance and mutations in *murA*, *glpT*, and *uhpT* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood and cerebrospinal fluid samples. *Front Microbiol* 2016; **6**.
223. Rigsby RE, Fillgrove KL, Beihoffer LA, Armstrong RN. Fosfomycin resistance proteins: A nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol* 2005; **401**: 367–79.
224. Mendoza C, Garcia JM, Llana J, Mendez FJ, Hardisson C, Ortiz JM. Plasmid-determined resistance to fosfomycin in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**: 215–9.
225. Navas J, Leon J, Arroyo M, Garcia Lobo JM. Nucleotide sequence and intracellular location of the product of the fosfomycin resistance gene from transposon Tn2921. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 2016–8.
226. Bernat BA, Timothy Laughlin L, Armstrong RN. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry* 1997; **36**: 3050–5.
227. Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN. Elucidation of a monovalent cation dependence and characterization of the divalent cation binding site of the fosfomycin resistance protein (FosA). *Biochemistry* 1999; **38**: 7462–9.
228. Beharry Z, Palzkill T. Functional analysis of active site residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 17786–91.
229. Ito R, Pacey MP, Mettus RT, Sluis-Cremer N, Doi Y. Origin of the plasmid-mediated fosfomycin resistance gene *fosA3*.
230. Hou J, Yang X, Zeng Z, *et al*. Detection of the plasmid-encoded fosfomycin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin.
231. Hou J, Huang X, Deng Y, *et al*. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M  $\beta$ -lactamase genes and *rmtB* carried on *incFII* plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2135–8.
232. Nakamura G, Wachino JI, Sato N, *et al*. Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 3175–9.

## BIBLIOGRAFÍA

233. Ma Y, Xu X, Guo Q, Wang P, Wang W, Wang M. Characterization of fosA5, A new plasmid-mediated fosfomicin resistance gene in Escherichia coli. *Lett Appl Microbiol* 2015; **60**: 259–64.
234. Guo Q, Tomich AD, McElheny CL, *et al.* Glutathione-S-transferase FosA6 of Klebsiella pneumoniae origin conferring fosfomicin resistance in ESBL-producing Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2460–5.
235. Wachino JI, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y. Prevalence of fosfomicin resistance among CTX-M-producing Escherichia coli clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomicin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3061–4.
236. Wang Y, Lo WU, Lai EL, Chow KH, Ho PL. Complete sequence of the multidrug-resistant Incl/M plasmid pIMP623 cocarrying blaIMP-34 and fosC2 in an Enterobacter cloacae strain associated with medical travel to China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5854–6.
237. Cao M, Bernat BA, Wang Z, Armstrong RN, Helmann JD. FosB, a cysteine-dependent fosfomicin resistance protein under the control of  $\sigma^W$ , an extracytoplasmic-function  $\sigma$  factor in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* 2001; **183**: 2380–3.
238. Butcher BG, Helmann JD. Identification of Bacillus subtilis  $\sigma^W$ -dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by Bacilli. *Mol Microbiol* 2006; **60**: 765–82.
239. Qu TT, Shi KR, Ji JS, *et al.* Fosfomicin resistance among vancomycin-resistant enterococci owing to transfer of a plasmid harbouring the fosB gene. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **43**: 361–5.
240. Etienne J. Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomicin resistance gene fosB. *FEMS Microbiol Lett* 1991; **84**: 119–22.
241. Fillgrove KL, Pakhomova S, Newcomer ME, Armstrong RN. Mechanistic Diversity of Fosfomicin Resistance in Pathogenic Microorganisms. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 15730–1.
242. Fillgrove KL, Pakhomova S, Schaab MR, Newcomer ME, Armstrong RN. Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomicin resistance protein, FosX, from Listeria monocytogenes. *Biochemistry* 2007; **46**: 8110–20.
243. Kobayashi S, Kuzuyama T, Seto H. Characterization of the fomA and fomB gene products from Streptomyces wedmorensis, which confer fosfomicin resistance on Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 647–50.
244. Wu YJ, Zheng QC, Zhang JL, *et al.* Fosfomicin induced structural change in fosfomicin resistance kinases FomA: Molecular dynamics and molecular docking studies. *J Mol Model* 2014; **20**: 1–11.
245. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48**: 1–4.
246. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493–6.
247. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI Supplement*

## BIBLIOGRAFÍA

M100. (Wayne P, ed.); 2019.

248. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 8.0 January. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Diseases* 2020; **0**: 1–21.

249. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 7.0. 2020.

250. Bolmström A, Arvidson, S., Ericsson, M., and Karlson A. *A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms*. Washington, D.C.; 1988.

251. Brown DF BL. Evaluation of the E Test, a Novel Method of Quantifying Antimicrobial Activity. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**: 185–90.

252. International Organization for Standardization. ISO - ISO 20776-1:2019 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents again. 2019.

253. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 11th Edition. 2018; **2**: 287.

254. Anon. File:MIC estimation agar dilution technique.jpg - Wikimedia Commons. Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MIC\\_estimation\\_agar\\_dilution\\_technique.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MIC_estimation_agar_dilution_technique.jpg). Accessed June 14, 2020.

255. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020: 0–77.

256. Díez-Aguilar M, Morosini MIM-I, del Campo R, *et al*. In Vitro activity of fosfomycin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 spanish hospitals: Establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5701–3.

257. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 391–408.

258. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, *et al*. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 145–8.

259. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. MIC distributions and epidemiological cut-off value (ECOFF) setting, EUCAST SOP 10.0. 2017.

260. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cutoff values.

261. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST: New and revised ECOFFs.

## BIBLIOGRAFÍA

262. Martínez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol* 2014; **11**: 33–9.
263. Kahlmeter GEC on AST. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. 2019.
264. Asín-Prieto E, Rodríguez-Gascón A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother* 2015; **21**: 319–29.
265. Asín E, Isla A, Canut A, Rodríguez Gascón A. Comparison of antimicrobial pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoints with EUCAST and CLSI clinical breakpoints for Gram-positive bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **40**: 313–22.
266. Merino-Bohórquez V, Docobo-Pérez F, Sojo J, *et al.* Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of fosfomicin in non-critically ill patients with bacteremic urinary infection caused by multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2018; **24**: 1177–83.
267. Rodríguez-Gascón A, Canut-Blasco A. Deciphering pharmacokinetics and pharmacodynamics of fosfomicin. *Rev Esp Quimioter* 2019; **32**: 19–24.
268. Kahlmeter G, Brown DFJ. Harmonization of antimicrobial breakpoints in Europe - Can it be achieved? *Clin Microbiol News* 2004; **26**: 187–92.
269. Kahlmeter G. Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Ups J Med Sci* 2014; **119**: 78–86.
270. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Implementation of EUCAST guidelines*. 2019.
271. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *EUCAST Statutes*.
272. Pullens B, van Bentem PP. Intratympanic gentamicin for Ménière's disease or syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2011.
273. Schroeder R. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 2000; **19**: 1–9.
274. Jorgensen JH. PMA. CKC. FG. LML. RSS. WDW ed. *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology; 2015.
275. Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, Fujisawa K ichi. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 1972; **25**: 695–708.
276. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010; **13**: 151–71.
277. Eljaaly K, Alharbi A, Alshehri S, *et al.* Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs* 2019; **79**: 243–69.
278. Blaser JBRDMJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed.; 2019.
279. Halstenson CE, Wong MO, Herman CS, *et al.* Effect of concomitant administration of piperacillin on the dispositions of isepamicin and gentamicin in patients with end-stage renal disease. *Antimicrob*

## BIBLIOGRAFÍA

*Agents Chemother* 1992; **36**: 1832–6.

280. Anon. Amikacin | C22H43N5O13 - PubChem. Available at:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37768>. Accessed August 3, 2020.

281. Radigan EA, Gilchrist NA, Miller MA. Management of aminoglycosides in the intensive care unit. *J Intensive Care Med* 2010; **25**: 327–42.

282. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005; **105**: 477–97.

283. Kondo J, François B, Russell RJM, Murray JB, Westhof E. Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with amikacin containing the  $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroxybutyryl (haba) group. *Biochimie* 2006; **88**: 1027–31.

284. Russell RJM, Murray JB, Lentzen G, Haddad J, Mobashery S. The complex of a designer antibiotic with a model aminoacyl site of the 30S ribosomal subunit revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 3410–1.

285. Possoz C, Newmark J, Sorto N, Sherratt DJ, Tolmasky ME. Sublethal concentrations of the aminoglycoside amikacin interfere with cell division without affecting chromosome dynamics. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 252–6.

286. G D Wright, A M Berghuis SM. Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. *Adv Exp Med Biol* 1998; **456**: 27–69.

287. Lanvers-Kaminsky C, Zehnhoff-Dinnesen A, Parfitt R, Ciarimboli G. *Drug-induced ototoxicity: Mechanisms, Pharmacogenetics, and protective strategies*. Nature Publishing Group; 2017:491–500.

288. Wargo KA, Edwards JD. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *J Pharm Pract* 2014; **27**: 573–7.

289. Singh YN, Marshall IG, Harvey AL. *SOME EFFECTS OF THE AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC AMIKACIN ON NEUROMUSCULAR AND AUTONOMIC TRANSMISSION*. 1978.

290. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules* 2017; **22**: 2267.

291. Moore RD, Smith CR, Lipsky JJ, Mellits ED, Lietman PS. Risk factors for nephrotoxicity in patients treated with aminoglycosides. *Ann Intern Med* 1984; **100**: 352–7.

292. Chamberlain G, Needham P. The absorption of antibiotics from the bladder. *J Urol* 1976; **116**: 172–3.

293. Bertino JS, Booker LA, Franck PA, Jenkins PL, Franck KR, Nafziger AN. Incidence of and significant risk factors for aminoglycoside-associated nephrotoxicity in patients dosed by using individualized pharmacokinetic monitoring. *J Infect Dis* 1993; **167**: 173–9.

294. Lepper PM, Held TK, Schneider EM, Bölke E, Gerlach H, Trautmann M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 2002; **28**: 824–33.

295. Liu JY, Wang F, Der, Ho MW, *et al*. In vitro activity of aminoglycosides against clinical isolates of

## BIBLIOGRAFÍA

- Acinetobacter baumannii complex and other nonfermentative Gram-negative bacilli causing healthcare-associated bloodstream infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2016; **49**: 918–23.
296. Zhanel GG, Lawson CD, Zelenitsky S, *et al.* Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 459–73.
297. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. 2012.
298. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 801–9.
299. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 586–9.
300. Bryan LE, Kowand SK, Van den Elzen HM. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; **15**: 7–13.
301. Dijkstra JA, Van der Laan T, Akkerman OW, *et al.* In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Amikacin, kanamycin, and capreomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**.
302. Heidarieh P, Mirsaeidi M, Hashemzadeh M, *et al.* In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Nontuberculous *Mycobacteria* in Iran. *Microb Drug Resist* 2016; **22**: 172–8.
303. Maurin M, Raoult D. MINIREVIEW Use of Aminoglycosides in Treatment of Infections Due to Intracellular Bacteria. 2001; **45**: 2977–86.
304. Peddie BA, Chambers ST. Effects of betaines and urine on the antibacterial activity of aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 1993; **31**: 481–8.
305. Fantin B, Ebert S, Leggett J, Vogelmann B, Craig WA. Factors affecting duration of in-vivo postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**: 829–36.
306. Stankowicz MS, Ibrahim J, Brown DL. Once-daily aminoglycoside dosing: An update on current literature. *Am J Heal Pharm* 2015; **72**: 1357–64.
307. Moellering RC, Weinberg AN. Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of 14 C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest* 1971; **50**: 2580–4.
308. Iannini PB, Ehret J, Eickhoff TC. Effects of ampicillin amikacin and ampicillin rifampin on enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; **9**: 448–51.
309. Ida T, Okamoto R, Nonoyama M, Irinoda K, Kurazono M, Inoue M. Antagonism between Aminoglycosides and-Lactams in a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate Involves Induction of an Aminoglycoside-Modifying Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1516–21.

## BIBLIOGRAFÍA

310. Marsot A, Guilhaumou R, Riff C, Blin • Olivier. Amikacin in Critically Ill Patients: A Review of Population Pharmacokinetic Studies. *Clin Pharmacokinet* 2017; **56**: 127–38.
311. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *JMCP* 2012; **87**: 403–7.
312. Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 4443–51.
313. Walkty A, Adam H, Baxter M, *et al.* In vitro activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011-2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 2554–63.
314. Doi Y, Wachino J-I, Ichi, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016; **30**: 523–37.
315. Vetting MW, Luiz LP, Yu M, *et al.* Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 2005; **433**: 212–26.
316. Hotta K, Sunada A, Ishikawa J, Mizuno S, Ikeda Y, Kondo S. *The Novel Enzymatic 3''-N-Acetylation of Arbekacin by an Aminoglycoside 3-N-Acetyltransferase of Streptomyces Origin and the Resulting Activity* • ð.
317. Rather PN, Munayyer H, Mann PA, Hare RS, Miller GH, Shaw KJ. Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: Identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins. *J Bacteriol* 1992; **174**: 3196–203.
318. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. 2009; **22**: 664–89.
319. Revuelta J, Vacas T, Torrado M, *et al.* NMR-based analysis of aminoglycoside recognition by the resistance enzyme ANT(4'): The pattern of OH/NH<sup>3+</sup> substitution determines the preferred antibiotic binding mode and is critical for drug inactivation. *J Am Chem Soc* 2008; **130**: 5086–103.
320. Wright GD. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 1999; **4**: d9.
321. Gaynes R, Groisman E, Nelson E, Casadaban M, Lerner SA. *Isolation, Characterization, and Cloning of a Plasmid-Borne Gene Encoding a Phosphotransferase That Confers High-Level Amikacin Resistance in Enteric Bacilli*. 1988.
322. Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2015; **6**.
323. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* 2012; **3**: 421–569.
324. Cao S, Huseby DL, Brandis G, Hughes D. Alternative evolutionary pathways for drug-resistant small colony variant mutants in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 2017; **8**.

## BIBLIOGRAFÍA

325. Cooksey RC, Morlock GP, Mcqueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1186–8.
326. Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. Mistranslation of Membrane Proteins and Two-Component System Activation Trigger Antibiotic-Mediated Cell Death. *Cell* 2008; **135**: 679–90.
327. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Amikacin Rationale for the EUCAST clinical breakpoints, version 2.0*. 2020.
328. Roger C, Nucci B, Molinari N, *et al*. Standard dosing of amikacin and gentamicin in critically ill patients results in variable and subtherapeutic concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 21–7.
329. De Montmollin E, Bouadma L, Gault N, *et al*. Predictors of insufficient amikacin peak concentration in critically ill patients receiving a 25 mg/kg total body weight regimen. *Intensive Care Med* 2014; **40**: 998–1005.
330. Brasseur A, Hites M, Roisin S, *et al*. A high-dose aminoglycoside regimen combined with renal replacement therapy for the treatment of MDR pathogens: A proof-of-concept study. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1386–94.
331. Burdet C, Pajot O, Couffignal C, *et al*. Population pharmacokinetics of single-dose amikacin in critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Eur J Clin Pharmacol* 2015; **71**: 75–83.
332. Kato H, Hagihara M, Hirai J, *et al*. Evaluation of Amikacin Pharmacokinetics and Pharmacodynamics for Optimal Initial Dosing Regimen. *Drugs R D* 2017; **17**: 177–87.
333. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015; **28**: 191–207.
334. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol* 2019.
335. Barin J, Martins AF, Heineck BL, Barth AL, Zavascki AP. Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; **12**: 15.
336. Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, Andersson DI. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat Microbiol* 2019; **4**: 504–14.
337. Hermes DM, Pormann Pitt C, Lutz L, *et al*. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 1184–9.
338. Lucas AE, Ito R, Mustapha MM, *et al*. Frequency and Mechanisms of Spontaneous Fosfomycin Nonsusceptibility Observed upon Disk Diffusion Testing of *Escherichia coli*. American Society for

## BIBLIOGRAFÍA

Microbiology; 2017.

339. Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates de Lencastre H, ed. *PLoS One* 2015; **10**: e0136082.

340. Chung M, Keun Kim C, Conceiçã T, Aires-De-Sousa M, De Lencastre H, Tomasz A. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa.

341. Nunes APF, Schuenck RP, Bastos CCR, *et al.* Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. *Brazilian J Infect Dis* 2007; **11**: 345–50.

342. Okado JB, Avaca-Crusca JS, Oliveira AL, Dabul ANG, Camargo ILB da C. Daptomycin and vancomycin heteroresistance revealed among CC5-SCC*mecII* MRSA clone and in vitro evaluation of treatment alternatives. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; **14**: 209–16.

343. Band VI, Hufnagel DA, Jaggavarapu S, *et al.* Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nat Microbiol* 2019; **4**: 1627–35.

344. Cherkaoui A, Diene SM, Renzoni A, *et al.* Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation. *Clin Microbiol Infect* 2017; **23**: 118.e9-118.e19.

345. Tato M, Morosini M, García L, Albertí S, Coque MT, Cantón R. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: Consequences for routine susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4089–93.

346. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, *et al.* Characteristics of Meropenem Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Clinical Isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2601–4.

347. Sun JD, Huang SF, Yang SS, Pu SL, Zhang CM, Zhang LP. Impact of carbapenem heteroresistance among clinical isolates of invasive *Escherichia coli* in Chongqing, southwestern China. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 469.e1-469.e10.

348. Juhász E, Iván M, Pintér E, Pongrácz J, Kristóf K. Colistin resistance among blood culture isolates at a tertiary care centre in Hungary. *J Glob Antimicrob Resist* 2017; **11**: 167–70.

349. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, *et al.* Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect* 2009; **58**: 138–44.

350. Poudyal A, Howden BP, Bell JM, *et al.* In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

351. Engel H, Gutiérrez-Fernández J, Flückiger C, *et al.* Heteroresistance to fosfomicin is predominant

## BIBLIOGRAFÍA

in streptococcus pneumoniae and depends on the murA1 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2801–8.

352. Walsh CC, Mcintosh MP, Peleg AY, Kirkpatrick CM, Bergen PJ. In vitro pharmacodynamics of fosfomycin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

353. Campos ACC, Andrade NL, Couto N, *et al.* Characterization of fosfomycin heteroresistance among MDR *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 2020.

354. Zheng C, Li S, Luo Z, *et al.* Mixed infections and rifampin heteroresistance among mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 2138–47.

355. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in *helicobacter pylori* infection. *Drug Des Devel Ther* 2017; **11**: 2209–20.

356. Sánchez-Romero MA, Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 355–60.

357. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 2016; **14**: 320–30.

358. Machado D, Antunes J, Simões A, *et al.* Contribution of efflux to colistin heteroresistance in a multidrug resistant *acinetobacter baumannii* clinical isolate. *J Med Microbiol* 2018; **67**: 740–9.

359. He J, Jia X, Yang S, *et al.* Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2018; **51**: 413–21.

360. Fernández Cuenca F, Sánchez MDCG, Caballero-Moyano FJ, *et al.* Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol 39. Elsevier, 2012; 472–7.

361. Hjort K, Nicoloff H, Andersson DI. Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2016; **102**: 274–89.

362. Reams AB, Kofoed E, Savageau M, Roth JR. Duplication frequency in a population of *Salmonella enterica* rapidly approaches steady state with or without recombination. *Genetics* 2010; **184**: 1077–94.

363. Adler M, Anjum M, Berg OG, Andersson DI, Sandegren L. High fitness costs and instability of gene duplications reduce rates of evolution of new genes by duplication-divergence mechanisms. *Mol Biol Evol* 2014; **31**: 1526–35.

364. Schechter LM, Creely DP, Garner CD, *et al.* Extensive gene amplification as a mechanism for piperacillin- Tazobactam resistance in *Escherichia coli*. *MBio* 2018; **9**.

## BIBLIOGRAFÍA

365. Anderson SE, Sherman EX, Weiss DS, Rather PN. Aminoglycoside Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *mSphere* 2018; **3**.
366. Pettersson ME, Sun S, Andersson DI, Berg OG. Evolution of new gene functions: simulation and analysis of the amplification model. *Genetica* 2009; **135**: 309–24.
367. Ballesterro-Téllez M, Docobo-Pérez F, Portillo-Calderón I, *et al.* Molecular insights into fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 1303–9.
368. Ballesterro-Téllez M, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, *et al.* Role of inoculum and mutant frequency on fosfomicin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2017; **23**: 325–31.
369. Morand B, Mühlemann K. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 14098–103.
370. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 745–57.
371. El-Halfawy OM, Valvano MA. Chemical Communication of Antibiotic Resistance by a Highly Resistant Subpopulation of Bacterial Cells Bundy JG, ed. *PLoS One* 2013; **8**: e68874.
372. Khatib R, Jose J, Musta A, *et al.* Relevance of vancomycin-intermediate susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia.
373. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 177–83.
374. Jarzembowski T, Wiśniewska K, Jóźwik A, Witkowski J. Heterogeneity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) characterized by flow cytometry. *Curr Microbiol* 2009; **59**: 78–80.
375. Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A. *Increased Amounts of a Novel Penicillin-binding Protein in a Strain of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Exposed to Nafcillin.*
376. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 4106–11.
377. Chakravorty S, Simmons AM, Rownecki M, *et al.* The new Xpert MTB/RIF ultra: Improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to Rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *MBio* 2017; **8**.
378. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, *et al.* Evaluation of a new test, GenoType HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3600–7.
379. Operario DJ, Koepffel AF, Turner SD, *et al.* Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One* 2017; **12**.
380. Sun L, Talarico S, Yao L, *et al.* Droplet digital PCR-based detection of clarithromycin resistance in

## BIBLIOGRAFÍA

- Helicobacter pylori isolates reveals frequent heteroresistance. *J Clin Microbiol* 2018; **56**.
381. Band VI, Weissid DS. Heteroresistance: A cause of unexplained antibiotic treatment failure? 2019.
382. Band VI, Crispell EK, Napier BA, *et al.* Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nat Microbiol* 2017; **1**: 16053.
383. Band VI, Satola SW, Burd EM, Farley MM, Jacob JT, Weiss DS. *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Exhibiting Clinically Undetected Colistin Heteroresistance Leads to Treatment Failure in a Murine Model of Infection*.
384. Vaudaux P; Francois, Berger-Bächi ;, Lew B; In vivo emergence of subpopulations expressing teicoplanin or vancomycin resistance phenotypes in a glycopeptide-susceptible, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. 2001.
385. Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1262–6.
386. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3413–5.
387. Abbott IJ, Van Gorp E, Wijma RA, *et al.* Oral fosfomicin efficacy with variable urinary exposures following single and multiple doses against enterobacterales: The importance of heteroresistance for growth outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; **64**: 1–13.
388. Kang CK, Kim YK, Jung SI, *et al.* agr functionality affects clinical outcomes in patients with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 2187–91.
389. Maor Y, Hagin M, Belausov N, Keller N, Ben-David D, Rahav G. Clinical Features of Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Bacteremia versus Those of Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia . *J Infect Dis* 2009; **199**: 619–24.
390. Fernández-Cuenca F, Gómez-Sánchez M, Rodríguez-Baño J, *et al.* Epidemiological and clinical features associated with colonisation/ infection by *Acinetobacter baumannii* with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems. *Int J Antimicrob Agents* 2012; **40**: 235–8.
391. Di Gregorio S, Perazzi B, Ordoñez AM, *et al.* Clinical, microbiological, and genetic characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *staphylococcus aureus* Bacteremia in a Teaching Hospital. *Microb Drug Resist* 2015; **21**: 25–34.
392. Sieradzki K, Roberts RB, Serur D, Hargrave J, Tomasz A. *Heterogeneously Vancomycin-Resistant Staphylococcus epidermidis Strain Causing Recurrent Peritonitis in a Dialysis Patient during Vancomycin Therapy*. 1999.

## BIBLIOGRAFÍA

393. Moosavian M, Shoja S, Nashibi R, *et al.* Post neurosurgical meningitis due to colistin heteroresistant *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol* 2014; **7**.
394. French CE, Coope C, Conway L, *et al.* Control of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae outbreaks in acute settings: an evidence review. *J Hosp Infect* 2017; **95**: 3–45.
395. Park K-H, Kim ES, Kim HS, *et al.* Comparison of the clinical features, bacterial genotypes and outcomes of patients with bacteraemia due to heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-susceptible *S. aureus*.
396. Srinivas P, Hunt LN, Pouch SM, *et al.* Detection of colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* from blood and respiratory isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; **91**: 194–8.
397. Mathews Griner LA, Guha R, Shinn P, *et al.* High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 2349–54.
398. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science (80- )* 1996; **274**: 1208–11.
399. Rosche WA, Foster PL, Cairns J. The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6862–7.
400. Richardson AR, Yu Z, Popovic T, Stojiljkovic I. Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 6103–7.
401. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science (80- )* 2000; **288**: 1251–3.
402. Hall LMC, Henderson-Begg SK. Hypermutable bacteria isolated from humans - A critical analysis. *Microbiology* 2006; **152**: 2505–14.
403. Liebert K, Hermann A, Schlickerrieder M, Jeltsch A. Stopped-flow and mutational analysis of base flipping by the *Escherichia coli* Dam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase. *J Mol Biol* 2004; **341**: 443–54.
404. Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat* 2003; **6**: 137–45.
405. Siegel EC, Bryson V. Mutator gene of *Escherichia coli* B. *J Bacteriol* 1967; **94**: 38–47.
406. Jolivet-Gougeon A, Kovacs B, Le Gall-David SL, *et al.* Bacterial hypermutation: Clinical implications. *J Med Microbiol* 2011; **60**: 563–73.
407. Miller JH, Suthar A, Tai J, Yeung A, Truong C, Stewart JL. Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999; **181**: 1576–84.
408. Zaleski P, Piekarowicz A. Characterization of a dam mutant of *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiology* 2004; **150**: 3773–81.
409. Chen L, Paulsen DB, Scruggs DW, Baner MM, Reeks BY, Lawrence ML. Alteration of DNA adenine

## BIBLIOGRAFÍA

methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice.

410. Herman GE, Modrich P. *Escherichia coli* K-12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable. *J Bacteriol* 1981; **145**.

411. Yanagihara F, Yoshida S, Sugaya Y, Maki H. The dnaE173 mutator mutation confers on the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III a capacity for highly processive DNA synthesis and stable binding to primer/template DNA. *Genes Genet Syst* 2007; **82**: 273–80.

412. Schaaper RM. *Base Selection, Proofreading, and Mismatch Repair during DNA Replication in Escherichia coli*. 1993.

413. Miller JH. SPONTANEOUS MUTATORS IN BACTERIA: Insights into Pathways of Mutagenesis and Repair. *Annu Rev Microbiol* 1996; **50**: 625–68.

414. Horst JP, Wu T hui, Marinus MG. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol* 1999; **7**: 29–36.

415. Taddei F, Hayakawa H, Bouton MF, *et al.* Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science (80- )* 1997; **278**: 128–30.

416. Shimokawa H. Functional significance of conserved residues in the phosphohydrolase module of *Escherichia coli* MutT protein. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 3240–9.

417. Cox EC. Bacterial Mutator Genes. *Annu Rev Genet* 1976; **10**: 135–56.

418. Zhao J, Leung H-CE, Winkler ME. The miaA Mutator Phenotype of *Escherichia coli* K-12 Requires Recombination Functions. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1796–800.

419. Jaunius Urbonavicius, Qiang Qian, JeÂroÃme M.B.Durand TGH and GRB. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J* **20**: 4863–73.

420. Farr SB, D'ari R, Touati D. *Oxygen-dependent mutagenesis in Escherichia coli lacking superoxide dismutase (oxygen radicals/DNA lesions/exonuclease I)*. 1986.

421. Gonza'lez B, Gonza'lez-Flecha G, Demple B, Gonzalez-Flecha B, Demple B. Transcriptional Regulation of the *Escherichia coli* oxyR Gene as a Function of Cell Growth. 1997; **179**: 6181–6.

422. Yang Y, Park SH, Alford-Zappala M, *et al.* Role of endonuclease III enzymes in uracil repair. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2019; **813**: 20–30.

423. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 2014; **38**: 1126–45.

424. Erill I, Campoy S, Barbé J. Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**: 637–56.

425. Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* 2008; **4**: 338–44.

## BIBLIOGRAFÍA

426. Courcelle J, Wendel BM, Livingstone DD, Courcelle CT. RecBCD is required to complete chromosomal replication: Implications for double-strand break frequencies and repair mechanisms. *DNA Repair (Amst)* 2015; **32**: 86–95.
427. Harris RS, Longerich S, Rosenberg SM. Recombination in adaptive mutation. *Science (80- )* 1994; **264**: 258–60.
428. López E, Blázquez J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3411–5.
429. Baharoglu Z, Krin E, Mazel D. RpoS Plays a Central Role in the SOS Induction by Sub-Lethal Aminoglycoside Concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 2013; **9**.
430. Matic I, Taddei F, Radman M. No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol* 2000; **182**: 5922–4.
431. Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, *et al.* High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol* 2002; **184**: 605–9.
432. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4062–70.
433. Oliver A. Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: Prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**: 563–72.
434. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Chronic Lung Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3382–6.
435. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Høiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2276–82.
436. Turrientes MC, Baquero MR, Sánchez MB, *et al.* Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 1746–58.
437. Prunier A-L, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel J-FO, Leclercq R. *High Rate of Macrolide Resistance in Staphylococcus aureus Strains from Patients with Cystic Fibrosis Reveals High Proportions of Hypermutable Strains.* 2003.
438. Morosini MI, Baquero MR, Sánchez-Romero JM, *et al.* Frequency of mutation to rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains: hexA and hexB polymorphisms do not account for hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1464–7.
439. Watson ME, Burns JL, Smith AL. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in mutS

## BIBLIOGRAFÍA

- are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 2004; **150**: 2947–58.
440. Le Gall S, Desbordes L, Gracieux P, *et al.* Distribution of mutation frequencies among *Salmonella enterica* isolates from animal and human sources and genetic characterization of a *Salmonella* Heidelberg hypermutator. *Vet Microbiol* 2009; **137**: 306–12.
441. Maciá MD, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Detection and Susceptibility Testing of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains with the Etest and Disk Diffusion. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2665–72.
442. Conejo MC, Amblar G, Pascual Á, Perea EJ, Martínez-Martínez L. Detection of hypermutable *Escherichia coli* strains in a collection of clinical isolates by the fosfomicin-rifampin disk method [1]. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2672.
443. Garibyan L, Huang T, Kim M, *et al.* Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA Repair (Amst)* 2003; **2**: 593–608.
444. O’neill AJ, Chopra I. Original articles Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 161–9.
445. Rosche WA, Foster PL. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 2000; **20**: 4–17.
446. Lurias SE, Delbrock M. *MUTATIONS OF BACTERIA FROM VIRUS SENSITIVITY TO VIRUS RESISTANCE*’-’.
447. Anon. Evolution Figures: Chapter 12. Available at: <http://www.evolution-textbook.org/content/free/figures/ch12.html>. Accessed July 5, 2020.
448. Lea DE, Coulson CA. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet* 1949; **49**: 264–85.
449. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomicin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 506–15.
450. VanScoy B, McCauley J, Bhavnani SM, Ellis-Grosse EJ, Ambrose PG. Relationship between fosfomicin exposure and amplification of *Escherichia coli* subpopulations with reduced susceptibility in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 5141–5.
451. Rice LB. The Maxwell Finland Lecture: For the Duration-- Rational Antibiotic Administration in an Era of Antimicrobial Resistance and *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 491–6.
452. Paul M, Leibovici L. Combination Antimicrobial Treatment Versus Monotherapy: The Contribution of Meta-analyses. *Infect Dis Clin North Am* 2009; **23**: 277–93.
453. Kumar A, Zarychanski R, Light B, *et al.* Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: A propensity-matched analysis\*. *Crit Care Med*

## BIBLIOGRAFÍA

2010; **38**: 1773–85.

454. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, *et al.* Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 726–34.
455. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, *et al.* Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish society of infectious diseases and clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015; **33**: 337.e1-337.e21.
456. Schmid A, Wolfensberger A, Nemeth J, Schreiber PW, Sax H, Kuster SP. Monotherapy versus combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nature* 2019; **9**.
457. Descourouez JL, Jorgenson MR, Wergin JE, Rose WE. Fosfomicin Synergy In Vitro with Amoxicillin, Daptomycin, and Linezolid against Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium from Renal Transplant Patients with Infected Urinary Stents. 2013.
458. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. In vitro investigation of synergy among fosfomicin and parenteral antimicrobials against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; **95**: 216–20.
459. Albur MS, Noel A, Bowker K, MacGowan A. The combination of colistin and fosfomicin is synergistic against NDM-1-producing Enterobacteriaceae in in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model experiments. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 560–7.
460. Zhao M, Bulman ZP, Lenhard JR, *et al.* Pharmacodynamics of colistin and fosfomicin: A ‘treasure trove’ combination combats KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 1985–90.
461. Ito R, Tomich AD, McElheny CL, Mettus RT, Sluis-Cremer N, Doi Y. Inhibition of fosfomicin resistance protein FosA by phosphonoformate (fosfarnet) in multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**.
462. Hamou-Segarra M, Zamorano L, Vadlamani G, *et al.* Synergistic activity of fosfomicin, b-lactams and peptidoglycan recycling inhibition against Pseudomonas aeruginosa.
463. Corvec S, Tabin UF, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. Activities of fosfomicin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum-lactamase-producing Escherichia coli in a foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1421–7.
464. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 695–701.

## BIBLIOGRAFÍA

465. Hickman RA, Hughes D, Cars T, Malmberg C, Cars O. Cell-wall-inhibiting antibiotic combinations with activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: O267–73.
466. Evren E, Azap ÖK, Çolakoğlu Ş, Arslan H. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **76**: 335–8.
467. Portier H, Lucht F, Chavanet P, Kazmierczak A, Tremeaux JC, Duez JM. Cefotaxime in combination with other antibiotics for the treatment of severe methicillin-resistant staphylococcal infections. *Infection* 1985; **13**.
468. Meißner A, Rahmanzadeh R, Haag R. Adjuvant fosfomycin medication in chronic osteomyelitis. *Infection* 1989; **17**: 146–51.
469. Corti N, Sennhauser FH, Stauffer UG, Nadal D. Fosfomycin for the initial treatment of acute haematogenous osteomyelitis. *Arch Dis Child* 2003; **88**: 512–6.
470. World Health Organization. Home AWaRe. Available at: <https://adoptaware.org/>. Accessed May 8, 2020.
471. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, ampC-, and carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**.
472. Gould FK, Denning DW, Elliott TSJ, *et al*. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: A report of the working party of the british society for antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 269–89.
473. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, *et al*. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; **43**: 304–77.
474. Giamarellou H, Zissis NP, Tagari G, Bouzos J. In vitro synergistic activities of aminoglycosides and new  $\beta$ -lactams against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; **25**: 534–6.
475. Leibovici L, Paul M, Poznanski O, *et al*. Monotherapy versus  $\beta$ -lactam-aminoglycoside combination treatment for gram-negative bacteremia: A prospective, observational study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1127–33.
476. Vidal L, Gafter-Gvili A, Borok S, Fraser A, Leibovici L, Paul M. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 247–57.
477. Munckhof WJ, Lindsay Grayson M, Turnidge JD. A meta-analysis of studies on the safety and efficacy of aminoglycosides given either once daily or as divided doses. *J Antimicrob Chemother* 1996; **37**: 645–63.

## BIBLIOGRAFÍA

478. Le. In Vitro Activity of Carbapenems Alone and in Combination With Amikacin Against KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. *J Clin Med Res* 2011; **3**: 106.
479. Hirsch EB, Guo B, Chang K-T, *et al.* Assessment of Antimicrobial Combinations for *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. 2012.
480. Mentec H, Vallois JM, Bure A, Saleh-Mghir A, Jehl F, Carbon C. Piperacillin, tazobactam, and gentamicin alone or combined in an endocarditis model of infection by a TEM-3-producing strain of *Klebsiella pneumoniae* or its susceptible variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 1883–9.
481. Máthé A, Szabó D, Anderlik P, Rozgonyi F, Nagy K. The effect of amikacin and imipenem alone and in combination against an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **58**: 105–10.
482. Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S, Falagas ME. *Effect of Aminoglycoside and  $\beta$ -Lactam Combination Therapy versus  $\beta$ -Lactam Monotherapy on the Emergence of Antimicrobial Resistance: A Meta-analysis of Randomized, Controlled Trials*. 2005.
483. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, *et al.* Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect* 2009; **58**: 213–9.
484. Kim BN, Woo JH, Kim MN, Ryu J, Kim YS. Clinical implications of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Hosp Infect* 2002; **52**: 99–106.
485. Souli M, Galani I, Boukovalas S, *et al.* In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2395–7.
486. Hayami H, Goto T, Kawahara M, Ohi Y. Activities of  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, amikacin and fosfomicin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from complicated urinary tract infections. *J Infect Chemother* 1999; **5**: 130–8.
487. Tessier F, Quentin C. In vitro activity of fosfomicin combined with ceftazidime, imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; **16**: 159–62.
488. Martinez-Martinez L, Rodriguez G, Pascual A, Suarez AI, Perea EJ. In-vitro activity of antimicrobial agent combinations against multiresistant *Acinetobacter baumannii* [1]. *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 1107–8.
489. Montgomery AB, Vallance S, Abuan T, Tservistas M, Davies A. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Dose-Escalation Phase 1 Study of Aerosolized Amikacin and Fosfomicin Delivered via the PARI Investigational eFlow<sup>®</sup> Inline Nebulizer System in Mechanically Ventilated Patients. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2014; **27**: 441–8.
490. Montgomery AB, Rhomberg PR, Abuan T, Walters KA, Flamm RK. Potentiation effects of amikacin and fosfomicin against selected amikacin-nonsusceptible gram-negative respiratory tract

## BIBLIOGRAFÍA

- pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 3714–9.
491. Montgomery AB, Rhomberg PR, Abuan T, Walters KA, Flamm RK. Amikacin-fosfomycin at a five-to-two ratio: Characterization of mutation rates in microbial strains causing ventilator-associated pneumonia and interactions with commonly used antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 3708–13.
492. Sime FB, Johnson A, Whalley S, *et al.* Pharmacodynamics of aerosolized fosfomycin and amikacin against resistant clinical isolates of pseudomonas aeruginosa and klebsiella pneumoniae in a hollow-fiber infection model: Experimental basis for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**.
493. Kollef MH, Ricard JD, Roux D, *et al.* A Randomized Trial of the Amikacin Fosfomycin Inhalation System for the Adjunctive Therapy of Gram-Negative Ventilator-Associated Pneumonia: IASIS Trial. *Chest* 2017; **151**: 1239–46.
494. Li Bassi G, Motos A, Fernandez-Barat L, *et al.* Nebulized Amikacin and Fosfomycin for Severe Pseudomonas aeruginosa Pneumonia: An Experimental Study. 2019; **47**: e470–7.
495. Sugathan S, Mandal J. An invitro experimental study of the effect of fosfomycin in combination with amikacin, ciprofloxacin or meropenem on biofilm formation by multidrug-resistant urinary isolates of Escherichia coli. *J Med Microbiol* 2019; **68**: 1699–706.
496. Lorian V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia; 2005.
497. Prichard MN, Shipman C. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* 1990; **14**: 181–205.
498. Berenbaum M. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989; **41**: 93–141.
499. S. L. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* 1953; **3**: 285–90.
500. BLISS CI. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY. *Ann Appl Biol* 1939; **26**: 585–615.
501. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1.
502. Yadav B, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput Struct Biotechnol J* 2015.
503. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Res* 2020.
504. Bulitta JB, Hope WW, Eakin AE, *et al.* Generating Robust and Informative Nonclinical In Vitro and In Vivo Bacterial Infection Model Efficacy Data To Support Translation to Humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: 1–25.
505. Landersdorfer CB, Yadav R, Rogers KE, *et al.* Combating Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii by an Optimized Imipenem-plus-Tobramycin Dosage Regimen: Prospective Validation via

## BIBLIOGRAFÍA

- Hollow-Fiber Infection and Mathematical Modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**.
506. Cadwell JJ. The Hollow Fiber Infection Model: Principles and Practice. 2015.
507. Baba T, Ara T, Hasegawa M, *et al*. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006; **2**: 2006.0008.
508. Datsenko KA, Wanner BL. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. 2000.
509. Rodríguez-Beltrán J, Turret J, Tenaillon O, *et al*. High recombinant frequency in extraintestinal pathogenic escherichia coli strains. *Mol Biol Evol* 2015; **32**: 1708–16.
510. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**: 5463–7.
511. Bioinformatics at COMAV. SECUENCIACIÓN DE SANGER — Bioinformatics at COMAV 0.1 documentation. 2017. Available at: [https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro\\_bioinf/sanger.html](https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/sanger.html). Accessed January 23, 2021.
512. Aziz RK, Bartels D, Best AA, *et al*. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008; **9**: 75.
513. Keseler IM, Mackie A, Santos-Zavaleta A, *et al*. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: D543–50.
514. Anon. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed January 24, 2021.
515. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. 2019.
516. Baquero M-R, Nilsson AI, Turrientes M del C, *et al*. Polymorphic mutation frequencies in Escherichia coli: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5538–42.
517. Pfausler B, Spiss H, Dittrich P, Zeitlinger M, Schmutzhard E, Joukhadar C. Concentrations of fosfomycin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 848–52.
518. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) EMA (EMA). Annex III Amendments to relevant sections of the summary of product characteristics and package leaflets. 2020.
519. Jenkins A, Thomson AH, Brown NM, *et al*. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: Do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? A systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2754–9.
520. Medicamentos y Productos Sanitarios AE de. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. *Amikacina* 2011.
521. Blaser J. In-vitro model for simultaneous simulation of the serum kinetics of two drugs with different half-lives. *J Antimicrob Chemother* 1985; **15**: 125–30.

## BIBLIOGRAFÍA

522. Anon. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.
523. Edgar R, Bibi E. MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol* 1997; **179**: 2274–80.
524. Ellington MJ, Livermore DM, Pitt TL, Hall LMCC, Woodford N. Mutators among CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and risk for the emergence of fosfomicin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 848–52.
525. Law CJ, Enkavi G, Wang DN, Tajkhorshid E. Structural basis of substrate selectivity in the glycerol-3-phosphate: Phosphate antiporter GlpT. *Biophys J* 2009; **97**: 1346–53.
526. Westblade LF, Erringtonid J, Dö Rrid T. Antibiotic tolerance. 2020.
527. Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, *et al.* Pharmacodynamics of fosfomicin: Insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5602–10.
528. Diep JK, Sharma R, Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of activity and emergence of resistance of Polymyxin B and ZTI-01 (fosfomicin for injection) against KPC-producing klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**.
529. Louie A, Maynard M, Duncanson B, Nole J, Vicchiarelli M, Drusano GL. Determination of the Dynamically Linked Indices of Fosfomicin for Pseudomonas aeruginosa in the Hollow Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**.
530. Yu W, Zhou K, Guo L, *et al.* In vitro pharmacokinetics/ pharmacodynamics evaluation of fosfomicin combined with amikacin or colistin against KPC2-producing Klebsiella pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 246.