

## BATTERIOLOGIA

## Uso del sistema E-test per lo studio di combinazioni antibiotiche verso batteri Gram-negativi multiresistenti in Fibrosi Cistica

Antonietta Lambiase<sup>1</sup>, Mariassunta Del Pezzo<sup>1</sup>, Valeria Raia<sup>2</sup>, Fabio Rossano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "Luigi Califano", Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II";

<sup>2</sup> Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica, Dipartimento di Pediatria, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli "Federico II".

**Key words:** Cystic Fibrosis, antibiotic-resistance, antibiotic combinations, synergy

**Use of E-test system for antibiotic combinations against multidrug-resistance Gram-negative bacteria in Cystic Fibrosis**

### SUMMARY

**Objectives:** Cystic Fibrosis patients are prone to infection by Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, which become very resistant with recurrent antibiotic treatments. The purpose of this study was to evaluate the susceptibility patterns of 12 isolates of *Burkholderia cepacia* and 8 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from Cystic Fibrosis patients to five individual antibiotics (ceftazidime, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, levofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole) and to four antibiotic combinations (ceftazidime associated with one of the other antibiotics).

**Methods:** Susceptibility tests were carried out using an agar diffusion method, the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden).

**Results:** Strains were selected because of their resistance to individual antimicrobial agents, tested with automated system (Phoenix, BD), which ranged from 41.6% for ceftazidime to 83.3% for ciprofloxacin for *Burkholderia cepacia* and from 25% for ceftazidime to 100% for trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pseudomonas aeruginosa*. By using E-test, we were able to demonstrate synergy against 2 strains of *Pseudomonas aeruginosa* (25%) with ceftazidime-piperacillin/tazobactam. No synergy was detected against all strains of *Burkholderia cepacia*.

**Conclusions:** These results suggest that the E-test offers a simple, labour-efficient and accurate method for MIC determination on agar medium and the susceptibility to antibiotic combinations greatly improves the guide to antibiotic therapy for infections to Gram-negative bacteria in Cystic Fibrosis patients.

### INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (CF) è la più comune malattia genetica a carattere monofattoriale con trasmissione autosomica recessiva della razza bianca a prognosi infausta. Essa è correlata alla presenza di mutazioni del gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 (CFTR) che codifica per una proteina con funzioni di trasporto di liquidi ed elettroliti attraverso la membrana epiteliale. All'alterazione della proteina consegue la compromissione di numerosi organi ed apparati quali l'apparato respiratorio, il pancreas, il fegato e le vie biliari, l'intestino e l'apparato riproduttivo. Tuttavia, la principale causa di morbilità e mortalità è correlata al progressivo deterioramento della funzione polmonare che in più del 90% dei casi è responsabile del decesso. L'infezione respiratoria cronica, caratteristica peculiare del paziente CF, può verificarsi molto precocemente (7).

Attualmente, l'aspettativa di vita per il paziente CF è notevolmente aumentata e ciò è dovuto in parte alla disponibilità di centri specializzati ed in parte all'uso di nuove molecole antimicrobiche più efficaci nei confronti di germi sostenenti infezioni polmonari (8).

L'aumentata sopravvivenza, i cicli multipli di terapia antibiotica a cui il paziente CF è sottoposto e l'esposizione prolungata a concentrazioni di antibiotico sub-inibenti, favoriscono la comparsa di ceppi batterici multiresistenti, in particolare *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes xylosoxidans*.

Nel caso di isolamento di ceppi multiresistenti da pazienti affetti da CF con riacutizzazione respiratoria secondaria a broncopneumopatia cronica bronchiectasica in fase evolutiva, risulta utile il saggio *in vitro* di associazioni di antibiotici con effetto potenzialmente sinergico (5, 8).

Secondo le indicazioni della letteratura e dei protocolli terapeutici più accreditati, le associazioni di antibiotici suggerite per ceppi Gram-negativi multiresistenti in CF sono le seguenti: beta-lattamine + aminoglicosidi, beta-lattamine + fluorochinoloni, aminoglicosidi + fluorochinoloni, carbapenemi + rifampicina, fosfomicina + ciprofloxacina, cloramfenicolo + chinoloni (1, 3).

Lo scopo del presente lavoro è saggiare l'attività di diverse associazioni antibiotiche verso ceppi di *P. aeruginosa* e di *B.cepacia* isolati da campioni respiratori di pazienti CF. I ceppi utilizzati per tale studio sono indicati come resistenti in accordo con la definizione data dalla "Cystic Fibrosis Foundation", per cui è multiresistente un ceppo che non mostra sensibilità ai β-lattamici, agli aminoglicosidi ed ai fluorochinoloni (4).

Tale studio mira alla standardizzazione di un metodo rapido in piastra e alla valutazione della presenza di effetto sinergico delle associazioni antibiotiche utilizzate.

**MATERIALI E METODI**

**Ceppi batterici.** Sono stati utilizzati 12 ceppi di *B. cepacia* ed 8 ceppi di *P. aeruginosa*, isolati da campioni respiratori (espettorati ed aspirati bronchiali) di 20 pazienti CF afferenti al Centro di Riferimento Campano per la Fibrosi Cistica, nel periodo gennaio 2004 - luglio 2005.

La scelta di tali ceppi è stata motivata dallo studio del loro spettro di sensibilità agli antibiotici. Essi, infatti, sottoposti a tale tipo di studio con il sistema automatico Phoenix (BD), hanno mostrato alta resistenza agli aminoglicosidi (più del 50% dei ceppi sia di *B. cepacia* che di *P. aeruginosa* sono risultati resistenti sia ad amikacina che a gentamicina), alle cefalosporine di seconda e terza generazione (escludendo ceftazidime verso cui meno del 50% di tutti gli isolati in studio era resistente), ai chinoloni ed alle benzil-pirimidine (trimetoprim-sulfametossazolo).

**Saggi per la sensibilità agli antibiotici.** I ceppi sono stati sottoposti a studio della sensibilità verso ceftazidime, ciprofloxacina, piperacillina/tazobactam, levofloxacina e trimetoprim-sulfametossazolo,

prima individualmente e poi in associazione (ceftazidime + ciprofloxacina, ceftazidime + piperacillina/tazobactam, ceftazidime + levofloxacina, ceftazidime + trimetoprim-sulfametossazolo), utilizzando l'E-test.

Esso è un metodo quantitativo per la determinazione della MIC mediante agar diffusione e prevede l'uso di strisce di carta impregnate da un gradiente calibrato di antibiotico e collocate su piastra. La MIC risulta così evidenziata lungo la striscia nel punto di intersezione con le colonie.

I ceppi isolati, sono inoculati fino ad ottenere una sospensione a densità ottica standardizzata (0.5 McFarland), ed insemnati su terreno agarizzato Müller-Hinton.

Per il saggio dei singoli antibiotici, le strisce di E-test sono state posizionate su piastra e successivamente incubate a 37°C per 24 h (per *P.aeruginosa*) e 48 h (per *B.cepacia*).

Per il saggio delle combinazioni di antibiotici, per ogni associazione è stata posta su piastra la striscia di E-test del primo antibiotico (ceftazidime) per un'ora; successivamente tale striscia è stata rimossa ed al suo posto è stata inserita la seconda striscia di antibiotico, incubando a 37°C overnight.

Per calcolare gli eventuali effetti sinergici o gli eventuali effetti additivi delle associazioni antibiotiche, sono state adoperate le seguenti formule (6):

$$\frac{MIC(A+B)}{MIC(A) + MIC(B)} \leq 0.5$$

*effetto sinergico*

$$\frac{MIC(A+B)}{MIC(A) + MIC(B)} > 0.5-1 <$$

*effetto additivo*

A+B= valore di associazione

A= MIC del primo antibiotico

B= MIC del secondo antibiotico

**RISULTATI**

Le percentuali di isolati sensibili, intermedi e resistenti ad ogni agente antimicrobico, ottenute con i due sistemi (microdiluizione automatica ed E-test) sono mostrate in tabella 1.

L'associazione ceftazidime+piperacillina/tazobactam ha mostrato effetto sinergico nei confron-

**Tabella 1.** Sensibilità agli antibiotici dei ceppi analizzati in questo studio

Antibiotici	<i>P. aeruginosa</i> (8 ceppi)						<i>B. cepacia</i> (12 ceppi)					
	Brodo-diluizione			E-test			Brodo-diluizione			E-test		
	S <sup>a</sup>	I <sup>a</sup>	R <sup>a</sup>	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ceftazidime	5	1	2	5	1	2	4	3	5	6	-	6
Ciprofloxacina	3	-	5	4	-	4	2	-	10	2	-	10
Piperacillina/Tazobactam	4	-	4	4	-	4	4	2	6	5	1	6
Levofloxacina	2	-	6	2	-	6	3	-	9	5	-	7
Trimetoprim/Sulfametossazolo <sup>b</sup>	/	/	/	/	/	/	1	3	8	4	-	8

<sup>a</sup>: S=sensibile; I:intermedio; R:resistente

<sup>b</sup>: I dati di sensibilità di *P.aeruginosa* vs trimetoprim/sulfametossazolo sono omessi per la sua intrinseca resistenza nei confronti di tali antibiotico.

ti di due ceppi di *P. aeruginosa* (25%), dando rispettivamente 0.49 e 0.31 come indici di associazione. Su tutti i ceppi di *B. cepacia* non è stato riscontrato alcun effetto sinergico.

## CONCLUSIONI

Il notevole aumento delle resistenze da parte di ceppi di *P. aeruginosa* e *B. cepacia* è un problema che investe l'intera comunità CF.

Convenzionalmente, i metodi utilizzati per testare la sensibilità batterica agli antimicrobici sono designati ad indicare uno schema monoterapeutico nelle infezioni acute. Questi metodi assumono che la terapia deve conseguire l'eliminazione del microrganismo dal sito di infezione e ciò può essere ottenuto dall'esposizione del microrganismo stesso a concentrazioni sufficientemente alte di antibiotico per un tempo sufficiente.

Nel caso della malattia polmonare in CF, la completa eliminazione del patogeno è praticamente impossibile a causa della complessa interazione fra le difese dell'ospite ed il patogeno stesso.

Obiettivo della terapia della polmonite batterica in paziente CF è il controllo dell'infezione e la riduzione dell'infiammazione utilizzando un'adeguata strategia antibiotica.

Di notevole utilità è quindi un metodo che migliori l'azione degli antimicrobici utilizzando saggi di associazione.

Il metodo E-test da noi utilizzato per saggiare l'effetto antimicrobico di associazioni chemioterapiche offre molti vantaggi fra cui dare considerevoli informazioni riguardanti la sensibilità di un ceppo a molti antibiotici ed ad altrettante associazioni in 24 ore (per *P. aeruginosa*) o in 48 ore (per *B. cepacia*).

Sebbene l'elevato costo del sistema E-test ne condizioni l'uso routinario, esso risulta estremamente utile nei casi in cui sia clinicamente necessario conoscere il dato quantitativo della sinergia fra diversi antibiotici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, MacDonald E. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with Cystic Fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1206-12.
2. Banerjee D, Stableforth D. The treatment of respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection in Cystic Fibrosis: what drug and which way? *Drugs* 2000; 60: 1053-4
3. Conway SP, Brownlee KG, Denton M, Peckham DG. Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Med* 2003; 2: 321-2.
4. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report. Bathesda 2003.
5. Marchetti F, Giglio L, Canduso M, Faraguna D, Assael BM. Early antibiotic treatment of

*Pseudomonas aeruginosa* colonisation in Cystic Fibrosis: a critical review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 67-74.

6. Saiman L, Mehar F, Niu WW, Neu HC, Shaw KJ, Miller G, Prince A. Antibiotic susceptibility of multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis, including candidates for transplantation. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 532-7.
7. Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 57-71
8. Saiman L, Siegel J. Infection Control recommendations for patients with Cystic Fibrosis: microbiology, important pathogens and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 2003; 3 (Suppl).

### Antonietta Lambiase

Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano"  
 Facoltà di Medicina e Chirurgia  
 Università di Napoli "Federico II"  
 Via Pansini 5 -80131-Napoli  
 Tel. 081 7462530 - Fax 081 7462530  
 E-mail: [alambias@unina.it](mailto:alambias@unina.it)