

Actividad de cuatro fluoroquinolonas frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferente patrón de sensibilidad a ceftazidima e imipenem

Álvaro Pascual^a, Providencia Joyanes^a, Luis Martínez-Martínez^a, María del Carmen Conejo^a, Gonzalo Hernández^b, José Chaves^b y Evelio J. Perea^a

^aDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Sevilla. ^bDepartamento de Investigación y Desarrollo. Parke Davis. Madrid.

FUNDAMENTO. Evaluar la actividad de cuatro fluoroquinolonas (ciprofloxacino, clinafloxacino, norfloxacino y pefloxacino) frente a cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes patrones de sensibilidad a ceftazidima e imipenem.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se estudiaron 156 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla en los años 1998 y 1999. La actividad *in vitro* de cuatro fluoroquinolonas se determinó mediante microdilución en caldo Mueller Hinton suplementado con cationes siguiendo las recomendaciones del NCCLS.

RESULTADOS. Para el total de cepas evaluadas, los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI)₉₀ de clinafloxacino (4 mg/l) fueron significativamente inferiores a los de ciprofloxacino (64 mg/l). Para las 76 cepas resistentes a ciprofloxacino, las CMI₉₀ de clinafloxacino y ciprofloxacino fueron de 16 y > 128 mg/l respectivamente. Clinafloxacino fue más activa que ciprofloxacino, norfloxacino y pefloxacino, con independencia del patrón de sensibilidad o resistencia a ceftazidima e imipenem.

CONCLUSIÓN. Clinafloxacino fue más activa *in vitro* que ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, clinafloxacino, resistencia.

The activity of four fluoroquinolones against strains of *Pseudomonas aeruginosa* with a different sensitivity pattern to ceftazidime and imipenem

OBJECTIVES. To evaluate the activity of four fluorquinolones (ciprofloxacin, clinafloxacin, norfloxacin and perfloxacin) against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with different sensitivity patterns to ceftazidime and imipenem.

MATERIAL AND METHODS. 156 strains of isolated *P. aeruginosa* were studied at the Virgin Macarena University Hospital in Seville during 1998 and 1999. The *in vitro* activity of four fluorquinolones was determined by microdilution in Mueller Hinton bouillon, supplemented with cations, following the NCCLS guidelines.

RESULTS. For all the strains evaluated, the minimum inhibitory concentration values (MIC₉₀) of the clinafloxacin (4 mg/l) were significantly less than those for ciprofloxacin (64 mg/l). In the 76 strains resistant to ciprofloxacin, the clinafloxacin and ciprofloxacin MIC₉₀ were 16 and >128 mg/l respectively. Clinafloxacin was more active than ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin, independent to the sensitivity pattern or the resistance to ceftazidime and imipenem.

CONCLUSION. Clinafloxacin was more active *in vitro* than ciprofloxacin against *P. aeruginosa*.

Key words: *P. aeruginosa*, clinafloxacin, resistance.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa produce frecuentemente infecciones graves en pacientes hospitalizados que afectan especialmente a pacientes inmunodeprimidos, pacientes con fibrosis quística y portadores de sondas urinarias. *P. aeruginosa* puede ser resistente a aminoglucósidos, penicilinas y cefalosporinas antipseudomonales, carbapenemas y fluoroquinolonas¹. La resistencia de este microorganismo a fluoroquinolonas está relacionada con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, que codifican la subunidad A de la topoisomerasa II (ADN girasa) y IV, respectivamente². Las mutaciones en los genes que codifican la subunidad B de la topoisomerasa II (*gyrB*) o

Correspondencia: Dr. Á. Pascual.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Apdo. 914.
Sevilla 41080.
Correo electrónico: atomas@cica.es

Manuscrito recibido el 23-3-2001; aceptado el 19-6-2001.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 432-434

topoisomerasa IV (*parE*) no tienen relevancia clínica conocida². Algunas cepas de *P. aeruginosa* expresan sistemas activos de expulsión de antimicrobianos (bombas de expulsión activa) que pueden contribuir a incrementar los niveles de resistencia. Se han descrito diferentes operaciones que median la expresión de bombas de expulsión en *P. aeruginosa* codificados por genes Mex (múltiple expulsión), entre los que destacan los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM³⁻⁵. El sistema de expulsión MexAB-OprM constituye la bomba de expulsión activa más importante en cepas salvajes, y contribuye a la resistencia intrínseca a betalactámicos (excepto imipenem) y fluoroquinolonas⁴⁻⁵. La expresión de los sistemas de expulsión activa es fundamental para que *P. aeruginosa* desarrolle resistencias a fluoroquinolonas, pues en ausencia de estos sistemas las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de estos antimicrobianos frente a cepas con mutaciones en genes que codifican topoisomerasas no suelen superar el punto de corte de sensibilidad⁶.

Cinafloxacino es una nueva fluoroquinolona que ha mostrado mejor actividad *in vitro* que norfloxacin o ciprofloxacino frente a *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., corinebacterias, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos⁷⁻¹¹. El objetivo de este estudio es evaluar la actividad *in vitro* de clinafloxacino, ciprofloxacino, norfloxacin y pefloxacino frente a cepas de *P. aeruginosa* que expresan diferentes fenotipos de resistencia a betalactámicos.

Material y métodos

Bacterias

Se han evaluado 156 cepas de *P. aeruginosa* aisladas consecutivamente de muestras clínicas correspondientes a diferentes pacientes durante los años 1998 y 1999 en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Los microorganismos se identificaron con el sistema WalkAway 96 (Dade, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes complementado con el sistema API 20NE (BioMérieux, Francia) y métodos convencionales en los casos en que el sistema automatizado no fue concluyente. Las cepas se mantuvieron congeladas a -80 °C en caldo de tripticasa soja hasta la realización del estudio. Se utilizaron como cepas control *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

Se evaluaron las siguientes quinolonas: ciprofloxacino (Bayer, Alemania), clinafloxacino (Parke-Davis, EE.UU.), norfloxacin (Sigma, España) y pefloxacino (Rhône Poulenc, Francia). Además se determinaron las CMI de ceftazidima e imipenem. Las CMI se determinaron mediante microdilución en caldo Mueller Hinton suplementado con cationes siguiendo los criterios del NCCLS. Se evaluaron para cada antimicrobiano un rango de concentraciones de 128 a 0,06 mg/l. Las placas se incubaron a 35 °C durante 18-20 horas. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que inhibía a simple vista el crecimiento del microorganismo evaluado. Para el análisis de los resultados en función de la actividad de ceftazidima y de imipenem, se consideraron que las cepas fueron resistentes a ceftazidima cuando la CMI fue ≥ 16 mg/l y resistentes a imipenem cuando la CMI fue ≥ 8 mg/l, incluyendo por tanto cepas correspondientes a las categorías clínicas intermedias y resistentes según los criterios del NCCLS.

Resultados

En la tabla 1 se expresan los rangos de CMI así como los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de las fluoroquinolonas evaluadas frente a 156 cepas de *P. aeruginosa*. Clinafloxacino fue la fluoroquinolona más activa frente a este microorganismo. Si consideramos para clinafloxacino un punto de corte para cepas sensibles de ≤ 1 mg/l, el 65,4% (102) de las cepas de *P. aeruginosa* evaluadas fueron sensibles a esta fluoroquinolona. Este porcentaje disminuyó al 52,6% (82) para ciprofloxacino. Si consideramos las 74 cepas resistentes a ciprofloxacino (CMI ≥ 2 mg/l), la actividad de clinafloxacino fue superior a la de ciprofloxacino tanto en términos de CMI₅₀ (2 frente a 8 mg/l) como de CMI₉₀ (16 frente a >128).

De las 156 cepas de *P. aeruginosa* evaluadas (tabla 2), 91 eran sensibles a ceftazidima (CMI ≤ 8 mg/l) e imipenem (CMI ≤ 4 mg/l), 11 eran sensibles a ceftazidima y resistentes a imipenem (CMI ≥ 8 mg/l), 25 eran resistentes a ceftazidima (CMI ≥ 16 mg/l) y sensibles a imipenem y 29 eran resistentes a ambos antimicrobianos. Para las 11 cepas resistentes a imipenem y sensibles a ceftazidima los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de clinafloxacino fueron cuatro diluciones inferiores que los de ciprofloxacino. Al considerar las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ceftazidima y sensibles a imipenem (25 cepas), los valores de

TABLA 1. Rangos, CMI₅₀ y CMI₉₀ (mg/l) de cuatro fluoroquinolonas frente a 156 cepas de *P. aeruginosa*

	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Total cepas (156)			
Clinafloxacino	$\leq 0,06-32$	0,5	4
Ciprofloxacino	$\leq 0,06->128$	1	64
Norfloxacin	$\leq 0,06->128$	4	>128
Pefloxacino	0,25->128	32	>128
Cepas sensibles a ciprofloxacino ≤ 1 mg/l (82)			
Clinafloxacino	$\leq 0,06-1$	0,125	0,5
Ciprofloxacino	$\leq 0,06-1$	0,25	1
Norfloxacin	$\leq 0,06-128$	1	4
Pefloxacino	0,25-128	4	32
Cepas resistentes a ciprofloxacino > 2 mg/l (74)			
Clinafloxacino	0,25-32	2	16
Ciprofloxacino	2->128	8	>128
Norfloxacin	4->128	32	>128
Pefloxacino	16->128	128	>128

CMI: concentración mínima inhibitoria.

TABLA 2. Valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ (mg/l) de clinafloxacin y ciprofloxacino frente a 156 cepas de *P. aeruginosa* con diferente fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) a ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP)

Fenotipo (nº cepas)	Clinafloxacin		Ciprofloxacino	
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
CAZ-S, IMP-S (91)	0,25	2	0,5	16
CAZ-S, IMP-R (11)	0,5	2	2	8
CAZ-R, IMP-S (25)	2	8	32	>128
CAZ-R, IMP-R (29)	1	8	2	>128

CMI: concentración mínima inhibitoria.

CMI₅₀ y CMI₉₀ de clinafloxacin (2 y 32 mg/l) fueron significativamente inferiores que los de ciprofloxacino (32 y >128 mg/l). Frente a las 29 cepas resistentes a los dos betalactámicos, los valores de CMI₉₀ de clinafloxacin fueron de 8 mg/l, mientras que para el resto de fluoroquinolonas evaluadas se incrementó a >128 mg/l. De hecho, el 62,1% de estas cepas se inhibían con una concentración de 1 mg/l de clinafloxacin, frente a un 17,6% de las mismas que se inhibían a la misma concentración de ciprofloxacino. Estas diferencias en actividad entre las dos fluoroquinolonas se observaron tanto en cepas sensibles como resistentes a ciprofloxacino.

Discusión

Clinafloxacin es una nueva fluoroquinolona que ha mostrado una mayor actividad *in vitro* que ciprofloxacino frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *A. baumannii* y otros bacilos gramnegativos. En estudios previos hemos comprobado que el 51% de cepas de *E. faecium* resistentes a ciprofloxacino se inhibían a una concentración de clinafloxacin de 1 mg/l¹⁰. En otro estudio sobre la evolución de la sensibilidad a quinolonas en *Proteus mirabilis*, observamos que para todas las cepas resistentes a ciprofloxacino (CMI \geq 4 mg/l), los valores de CMI₉₀ de diferentes quinolonas fueron 32 mg/l, con la excepción de clinafloxacin que mostró una CMI₉₀ de 4 mg/l⁹. Finalmente, los valores de CMI₉₀ de clinafloxacin y ciprofloxacino frente a 30 cepas multirresistentes de *A. baumannii* fueron de 2 y 128 mg/l respectivamente⁸. De hecho, utilizando el mismo punto de corte para ambos antimicrobianos, el 93,3% de los aislamientos eran resistentes a ciprofloxacino, mientras que el 43,3% lo eran a clinafloxacin. Los datos de este estudio indican que también frente a *P. aeruginosa*, clinafloxacin fue significativamente más activo *in vitro* que ciprofloxacino, norfloxacin y pefloxacin. Se han descrito resultados similares al evaluar la actividad de clinafloxacin y otras fluoroquinolonas frente a cepas de *P. aeruginosa* constituyendo biocapas en la superficie de sondas urinarias¹². Aunque la mejor actividad de clinafloxacin se mantiene frente a las cepas resistentes a ciprofloxacino, los valores elevados de CMI₅₀ (2 mg/l) y de CMI₉₀ (16 mg/l) cuestionan su potencial uso clínico frente a estas cepas. El futuro desarrollo de inhibidores de bombas de expulsión activa para uso clínico podría hacer reconsiderar el uso de esta fluoroquinolona en cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* que sean además resistentes a ciprofloxacino¹³.

En conclusión, clinafloxacin es más activa *in vitro* que ciprofloxacino frente a cepas de *P. aeruginosa* con independencia de su sensibilidad o resistencia a ceftazidima e imipenem. Esta actividad es considerablemente inferior en cepas resistentes a ciprofloxacino, lo que sugiere la existencia de resistencia cruzada y mecanismos de resistencia similares para todas las fluoroquinolonas en *P. aeruginosa*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por Laboratorios Parke Davis España.

Bibliografía

- Hancock REW. Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Dis 1998; 27(supp 1): S93-S99.
- Cambau E, Perani E, Dib C, Petinon C, Trias J, Jarlier V. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2.248-2.252.
- Köhler T, Pechere JC, Plesiat P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. Cell Mol Life Sci 1999; 56: 771-778.
- Xian-Zhi L, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 433-436.
- Ziha-Zaifi I, Llanes C, Köler T, Pechere JC, Plesiat P. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB OprM. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 287-291.
- Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, et al. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. J Bacteriol 2000; 182: 3.142-3.150.
- Schmitz FJ, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Heinz HP, Brisse S. *In vitro* potency of moxifloxacin, clinafloxacin and sitafloxacin against 248 genetically defined clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 109-113.
- Pascual A, López-Hernández I, Martínez-Martínez L, Perea EJ. *In vitro* susceptibilities of multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* to eight quinolones. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 140-142.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Pascual A, Suárez AI, Perea EJ. Trends in the susceptibilities of *Proteus mirabilis* isolates to quinolones. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 407-408.
- Martínez-Martínez L, Joyanes P, Pascual A, Terrero E, Perea EJ. Activity of eight fluoroquinolones against enterococci. Clin Microbiol Infect 1997; 3: 497-499.
- Martínez-Martínez L, Suárez AI, Ortega MC, Perea EJ. Comparative *in vitro* activities of new quinolones against coryneform bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1.439-1.441.
- Joyanes P, Mazza B, Martínez L, López-López G, Pascual A. Actividad de ocho fluoroquinolonas frente a biocapas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* sobre sondas urinarias de látex siliconizado. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000; 18: 27-40.
- Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 105-116.