

## Artículo original

# Actividad *in vitro* de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas

Carmen I. Sierra R.<sup>a</sup>, Esmirna Guevara<sup>b</sup>, Armando Guevara-Patiño<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Postgrado en Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. <sup>b</sup>Unidad de Infectología y Microbiología Médica. Laboratorio de Microbiología. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar, Venezuela.

<sup>c</sup>Departamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Batistini". Universidad de Oriente. Núcleo Bolívar. Ciudad Bolívar, Venezuela.

Recibido 20 de enero de 2011; aceptado 25 de abril de 2011

**Resumen:** *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo, capaz de adquirir genes que codifican la producción de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) haciéndose multiresistente, lo cual dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo. Se evaluó la actividad *in vitro* de piperacilina-tazobactam, en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas, en 8 aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de MBL, provenientes de cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela mediante el método epsilométrico. Las combinaciones de antimicrobianos que presentaron mayor efecto sinérgico fueron piperacilina-tazobactam/gentamicina y piperacilina-tazobactam/ciprofloxacina en 5/8 aislamientos. La combinación de piperacilina-tazobactam/amikacina presentó sinergia en 4 de los casos y adición en los otros 4, manifestando el menor índice de concentración inhibitoria fraccionada promedio. No hubo antagonismo en ninguna combinación de antimicrobianos. Los resultados de este estudio sugieren que piperacilina-tazobactam en combinación con gentamicina, amikacina o ciprofloxacina podrían ser utilizadas como alternativas terapéuticas en las infecciones por *P. aeruginosa* multiresistentes productoras de MBL en los hospitales del estado Bolívar, mientras que en los hospitales del oriente de Venezuela se sugiere la combinación piperacilina-tazobactam/amikacina.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, metalo- $\beta$ -lactamasas, sinergia, combinación de antimicrobianos, susceptibilidad a antimicrobianos.

## *In vitro* piperacillin-tazobactam activity in combination with aminoglycosides and fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* metallo- $\beta$ -lactamases producers

**Abstract:** *Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacillus able to acquire genes which codify for production of metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) becoming multiresistant, which difficults the treatment of infections produced by this microorganism. The *in vitro* activity of piperacilline-tazobactam, in combination with aminoglycosides and fluoroquinolones was evaluated in 8 *P. aeruginosa* MBL producers obtained at four hospitals of the west and south areas of Venezuela through an epsilometric method. The antimicrobial combinations which showed the greatest synergic effect were piperacillin-tazobactam/gentamicin and piperacillin-tazobactam/amikacin in 5/8 isolates. The piperacilline-tazobactam/amikacin combination showed synergy in 4 cases and addition in the other 4, with the lowest index of mean fractionated inhibitory concentration. There was no antagonism in any of the antimicrobial combinations. The results of this study suggest that piperacilline-tazobactam in combination with gentamicin, amikacin or ciprofloxacin, could be used as therapeutic alternatives in multiresistant *P. aeruginosa* MBL producers at all the hospitals of Bolivar State, while in hospitals located in the west of Venezuela, the piperacilline-tazobactam/amikacin combination is suggested.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- $\beta$ -lactamases, synergy, antimicrobial combinations, susceptibility to antimicrobials.

\* Correspondencia:

E-mail: agvillefort@yahoo.com

### Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo que pertenece a un grupo heterogéneo de bacterias denominadas

"no fermentadores". Es uno de los patógenos más importantes en el ámbito nosocomial [1-5], ya que es responsable del 10 al 15% de las infecciones asociadas a los cuidados de salud en todo el mundo, afectando principalmente a pacientes con

enfermedades crónicas y alteraciones de los mecanismos de defensa como cáncer, inmunodeficiencia, fibrosis quística o quemaduras [4-6]. *P. aeruginosa*, es responsable de la mayor tasa de mortalidad registrada en los casos de bacteriemia en pacientes neutropénicos (30-50%) y con neumonía (49%), la cual aumenta a un 69% en pacientes con ventilación mecánica en las unidades de cuidado intensivo (UCI) [5,7].

Las elevadas tasas de mortalidad en las infecciones por *P. aeruginosa* son debidas a su alto nivel de resistencia intrínseca a los antimicrobianos, su gran capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia a través de mutaciones en su cromosoma y a la posibilidad de adquirir nuevos determinantes de resistencia por transferencia horizontal [4,8,9].

Entre los mecanismos de resistencia adquirida más importantes que presenta *P. aeruginosa* se encuentra la producción de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL). Estas enzimas se caracterizan por presentar un amplio perfil de sustratos, que incluye penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos, pero no hidrolizan a los monobactámicos (aztreonam) y su actividad es inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y otros quelantes de iones metálicos [10,11]. Con mucha frecuencia, las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL también son resistentes a otros grupos de antimicrobianos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, resultando multirresistentes [12].

La creciente diseminación de las MBLs transferibles en *P. aeruginosa* en el ámbito mundial es favorecida por el creciente y a veces inadecuado uso de imipenem y a la difusión de genes de resistencia, lo cual tiene un impacto significativo en las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria [12].

En la actualidad no existe una pauta o consenso

internacional para el tratamiento de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL, por lo que se han empleado esquemas terapéuticos con dos o más antimicrobianos que presenten acción sinérgica [13-15]. Sin embargo, estas combinaciones de antimicrobianos no deben ser elegidas empíricamente debido a que no siempre serán efectivas para todas las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente, por lo cual la evaluación de la actividad de las combinaciones de antimicrobianos es necesaria antes de iniciar el tratamiento para evitar fallas terapéuticas [14]. Algunos autores han sugerido que piperacilina-tazobactam en combinación con otros antimicrobianos puede ser una alternativa terapéutica para las infecciones causadas por estas bacterias aún cuando esto no ha sido probado clínicamente [16-20].

Por tal motivo, nos propusimos evaluar la actividad *in vitro* de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas, en aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas provenientes de cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela, mediante el método epsilométrico.

## Materiales y métodos

**Aislamientos bacterianos:** Se analizó una colección de 8 aislamientos de *P. aeruginosa* de origen clínico, productoras de MBL de tipo VIM y con un perfil de susceptibilidad de multirresistencia determinado por el método de difusión con discos, provenientes de cuatro hospitales del oriente y sur de Venezuela (Tabla 1).

**Concentración inhibitoria mínima (CIM):** A todos los aislamientos de *P. aeruginosa* se les determinó la CIM por el método epsilométrico utilizando tiras de Etest (AB Biodisk,

Tabla 1. Características epidemiológicas y perfil de susceptibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Procedencia	Nº de cepa	Año de aislamiento	Edad (años)	Sexo	Tipo de muestra	Perfil de susceptibilidad (método de difusión con discos)
CHRP Cdad. Bolívar. Edo. Bolívar.	698-A	2007	78	F	Secreción herida post-quirúrgica	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>I</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
	64-A	2009	68	F	Secreción de pie diabético	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>I</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>R</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
HRL San Félix. Edo. Bolívar.	788-A	2007	33	M	Secreción herida post-quirúrgica	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>S</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
	952-M	2006	46	F	Sangre	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>S</sup> ATM <sup>R</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
HUAPA Cumaná. Edo. Sucre.	6887,1	2009	53	M	Punta de catéter	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>I</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
	6898	2009	1	M	Sangre	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>I</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>I</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
HIST San Tomé. Edo. Anzoátegui.	23773	2009	83	F	Secreción Traqueal	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>S</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>
	865-A	2007	40	F	Lavado bronquial	PIP <sup>R</sup> TZP <sup>R</sup> CAZ <sup>R</sup> CFP <sup>R</sup> FEP <sup>R</sup> IMP <sup>R</sup> MER <sup>R</sup> ATM <sup>I</sup> GEN <sup>R</sup> AMK <sup>R</sup> CIP <sup>R</sup>

CHRP: Complejo Hospital "Ruiz y Páez", HUAPA: Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", HIST: Hospital Industrial de San Tomé, HRL: Hospital "Raúl Leoni", F: Femenino, M: Masculino, S: sensible, I: intermedio, R: resistente. PIP: piperacilina, TZP: piperacilina-tazobactam; CAZ: ceftazidima, CFP: cefoperazona, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MER: meropenem, ATM: GEN: gentamicina, AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina.

Solna, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ensayaron los siguientes antimicrobianos: piperacilina-tazobactam (TZP), amikacina (AMK), gentamicina (GEN) y ciprofloxacina (CIP). Como control para la determinación de la CIM se utilizó la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Todos los antibiogramas fueron incubados a 35 °C por 18 horas en atmósfera ambiental y los resultados fueron interpretados utilizando los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2010 [21]. Se consideró como el valor de la CIM, el punto de intersección de la elipse de inhibición con la escala impresa en la tira, posterior a la incubación.

**Sinergia de antimicrobianos:** Para cada uno de los aislamientos de *P. aeruginosa* se realizaron ensayos de sinergia de antimicrobianos, mediante el método epsilométrico utilizando tiras de Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia) según lo descrito en anteriores comunicaciones [22,23], probando las siguientes combinaciones de antimicrobianos: piperacilina-tazobactam/gentamicina (TZP+GEN), piperacilina-tazobactam/amikacina (TZP+AMK) y piperacilina-tazobactam/ciprofloxacina (TZP+CIP).

Las pruebas de sinergia se realizaron por duplicado, inoculando placas con agar Mueller-Hinton (Hi Media) con cationes ajustados según las recomendaciones del CLSI 2010, con suspensiones de los aislamientos ajustados a una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland; posteriormente se colocó la tira de uno de los antibióticos en la superficie del agar y luego el otro antibiótico, en un ángulo de 90°, con relación a la tira anterior. El punto de intersección entre las dos tiras fue la CIM de cada antimicrobiano determinada previamente. Cuando la CIM de alguno de los antimicrobianos ensayados fue superior a lo reflejado en la escala de la tira empleada, las tiras se cruzaron en la concentración más alta señalada en la tira del antibiótico (Figura 1). Todas las placas fueron incubadas a 35 °C por 18 horas en atmósfera ambiental. La CIM de cada antimicrobiano en combinación se interpretó como el valor en que la zona de inhibición se cruza con la escala impresa en la tira [22,23].

Para evaluar el efecto de la combinación de los diferentes antibióticos se calculó la concentración inhibitoria fraccionada (CIF) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de CIF} = (\text{CIM A en combinación}) / (\text{CIM A} + (\text{CIM B en combinación}) / (\text{CIM B}))$$

Donde CIM A en combinación corresponde a la CIM del antibiótico A en combinación con el antibiótico B, CIM A es la CIM del antibiótico A, CIM B en combinación corresponde a la CIM del antibiótico B en combinación con el antibiótico A y CIM B es la CIM del antibiótico B.

Los valores del índice de CIF se interpretaron como:

**Sinergia (índice CIF  $\leq 0,5$ ):** el efecto de los antimicrobianos en combinación es significativamente mayor que la actividad de cada uno probado separadamente.

**Adición (índice CIF  $> 0,5$  y  $\leq 1$ ):** la actividad de los dos antimicrobianos es aproximadamente la suma de

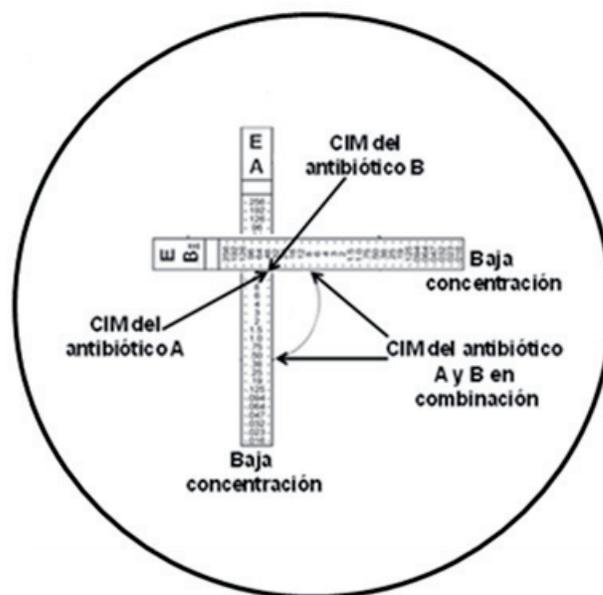


Figura 1. Representación esquemática de la prueba de sinergia de antimicrobianos por el método epsilométrico. CIM: Concentración inhibitoria mínima.

las actividades de ambos antimicrobianos probados separadamente.

**Indiferencia (índice CIF  $> 1$  y  $\leq 4$ ):** la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo cuando son probados separadamente.

**Antagonismo (índice CIF  $> 4$ ):** el efecto de los antimicrobianos en combinación es significativamente menor que la suma de la actividad de cada uno probado separadamente [22-24].

## Resultados

Se evaluó un total de 8 aislamientos de *P. aeruginosa* productoras MBL, caracterizadas por métodos fenotípicos y genotípicos, provenientes de 4 hospitales del oriente y sur de Venezuela.

Al comparar el patrón de susceptibilidad de los aislados estudiados se obtuvo que 4 aislamientos presentaron resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina y amikacina) y ciprofloxacina y sensibilidad a piperacilina-tazobactam; 2 aislamientos, además de la sensibilidad a piperacilina-tazobactam, mostraron sensibilidad intermedia a la gentamicina y sólo 1 aislamiento mostró resistencia a todos los antimicrobianos probados, por lo que el antimicrobiano más eficaz fue piperacilina-tazobactam (Tabla 2).

Las combinaciones que presentaron mayor efecto sinérgico fueron TZP+GEN y TZP+CIP, ambas en 5 aislamientos, pero se presentó indiferencia en 2 y 3 aislamientos respectivamente. Así mismo, un aislamiento presentó adición para la combinación TZP+GEN. La combinación TZP+AMK presentó sinergia en la mitad de los casos (4/8 aislamientos) y adición en la otra mitad. No hubo antagonismo en ninguna combinación de antimicrobianos. La combinación TZP+AMK fue la que presentó menor

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenidas mediante el método epsilométrico de cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Aislamiento	Concentración inhibitoria mín. ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Interpretación)							
	TZP		GEN		AMK		CIP	
698-A	48/4	(S)	16	(R)	>256	(R)	6	(R)
64-A	48/4	(S)	24	(R)	192	(R)	>32	(R)
788-A	32/4	(S)	16	(R)	96	(R)	4	(R)
952-M	>256/4	(R)	24	(R)	>256	(R)	8	(R)
6887,1	32/4	(S)	8	(I)	>256	(R)	>32	(R)
6898	64/4	(S)	12	(I)	>256	(R)	>32	(R)
23773	24/4	(S)	24	(R)	128	(R)	>32	(R)
865-A	>256/4	(R)	96	(R)	24	(I)	>32	(R)

TZP: piperacilina-tazobactam; AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina, S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

índice de CIF promedio (0,44), mientras que para las combinaciones TZP+GEN y TZP+CIP la CIF promedio fue de 0,59 y 0,78 respectivamente.

En la tabla 3 se muestra la CIF de cada microorganismo estudiado. Los aislamientos provenientes del Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" y del Hospital "Raúl Leoni" presentaron sinergia en las tres combinaciones de antimicrobianos (TZP+GEN, TZP+AMK y TZP+CIP). Los aislamientos del Hospital "Antonio Patricio Alcalá" presentaron resultados mixtos de sinergia, adición e indiferencia en igual proporción, mientras que en los provenientes del Hospital Industrial de San Tomé sólo se

demonstró adición e indiferencia. Llama la atención que los aislamientos de estos dos hospitales presentaron adición en la combinación TZP+AMK y presentaron predominantemente indiferencia en las otras combinaciones.

## Discusión

Los aislamientos de *P. aeruginosa* productoras de MBL están frecuentemente asociados a infecciones nosocomiales difíciles de tratar, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y sometidos a procedimientos invasivos en las UCI, debido a que estas enzimas son capaces de inactivar a todos los  $\beta$ -lactámicos y con frecuencia presentan otros mecanismos de resistencia dando lugar a fenotipos multirresistentes, haciendo cada vez más difícil el manejo de los procesos infecciosos causados por esta bacteria [7,8,25,26].

Actualmente, la industria farmacéutica no anticipa, en un futuro cercano, la presencia de un antimicrobiano competente para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes [25], por lo que en muchos países la mayoría de estas infecciones son tratadas mediante terapias combinadas escogidas empíricamente. A pesar de que muchos estudios han demostrado que las terapias combinadas son superiores a las monoterapias, se ha observado que la respuesta de *P. aeruginosa* a varias combinaciones de antimicrobianos es impredecible, por lo que una combinación de antimicrobianos empíricamente elegida puede ser potencialmente contraproducente

Tabla 3. Concentración inhibitoria fraccionada para las diferentes combinaciones de antimicrobianos según hospital de procedencia y aislados de *P. aeruginosa* productoras de MBL.

Hospital	Nº de cepa	Combinación de antimicrobianos	CIF	Interpretación	Nº de cepa	Combinación de antimicrobianos	CIF	Interpretación
CHRP	698-A	TZP+GEN	0,29	Sinergia	64-A	TZP+GEN	0,13	Sinergia
		TZP+AMK	0,11	Sinergia		TZP+AMK	0,10	Sinergia
		TZP+CIP	0,11	Sinergia		TZP+CIP	0,5	Sinergia
HRL	788-A	TZP+GEN	0,34	Sinergia	952-M	TZP+GEN	0,30	Sinergia
		TZP+AMK	0,22	Sinergia		TZP+AMK	0,17	Sinergia
		TZP+CIP	0,35	Sinergia		TZP+CIP	0,44	Sinergia
HUAPA	6887,1	TZP+GEN	1,25	Indiferencia	6898	TZP+GEN	0,38	Sinergia
		TZP+AMK	0,88	Adición		TZP+AMK	0,63	Adición
		TZP+CIP	1,25	Indiferencia		TZP+CIP	0,44	Sinergia
HIST	23773	TZP+GEN	0,58	Adición	865-A	TZP+GEN	1,42	Indiferencia
		TZP+AMK	0,52	Adición		TZP+AMK	0,88	Adición
		TZP+CIP	1,17	Indiferencia		TZP+CIP	2	Indiferencia

CHRP: Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez", Ciudad Bolívar; HUAPA: Hospital Universitario "Antonio Patricio Alcalá", Cumaná; HIST: Hospital Industrial de San Tomé, San Tomé; HRL: Hospital "Raúl Leoni", San Félix; CIF: concentración inhibitoria fraccionada; IPM: imipenem; GEN: gentamicina; AMK: amikacina; CIP: ciprofloxacina; TZP: piperacilina-tazobactam.

[15,19,20]. De allí la necesidad de disponer de nuevas alternativas terapéuticas y métodos microbiológicos de fácil aplicabilidad, que provean información sobre combinaciones de antimicrobianos efectivos para el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente.

El método del tablero y la determinación de la curva de muerte han sido durante mucho tiempo los únicos métodos disponibles para la evaluación de la sinergia *in vitro* de antimicrobianos, sin embargo, estos no son usados de manera rutinaria en la práctica clínica ya que son muy costosos, laboriosos y técnicamente demandantes [27,28].

Estudios previos han demostrado que el método epsilométrico es una alternativa rápida, reproducible y fácil de aplicar para evaluar la actividad sinérgica de antimicrobianos, que podría contribuir significativamente a la mejora de las opciones terapéuticas de las infecciones por *P. aeruginosa*. Además, en el caso de *P. aeruginosa*, se ha demostrado una buena correlación entre el método epsilométrico y el método del tablero, que es la prueba estándar para la determinación de la sinergia de antimicrobianos [22,23,29].

Las combinaciones de betalactámicos y aminoglucósidos son las más frecuentemente utilizadas para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes [15,20]. En el presente estudio se evaluó la combinación de piperacilina-tazobactam con gentamicina, amikacina y ciprofloxacina mediante el método epsilométrico, ya que se ha demostrado que estos grupos de antimicrobianos, en especial los  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos, poseen actividad sinérgica y son de uso común en nuestros hospitales; además, algunos autores han sugerido el uso de piperacilina-tazobactam en combinación con otros antimicrobianos como terapia para las infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL [16,17,20].

En este estudio se demostró que existen altos porcentajes de sinergia entre piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos, lo cual coincide con los estudios realizados por otros investigadores, donde se encontró sinergia entre piperacilina-tazobactam en combinación con tobramicina (50%), amikacina (95,9%) y arbekacina (100%) en aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes [15,20].

Algunos investigadores han encontrado que en aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL tipo IMP-1, la sinergia entre piperacilina-tazobactam en combinación con ciprofloxacina es de un 30,6% y el antagonismo de un 20,4% [20], lo cual difiere con nuestro estudio donde la sinergia para dicha combinación fue mayor (62,5%, 5 cepas) sin evidencia de antagonismo. Es posible que esta diferencia se deba al tipo de MBL producida por las cepas estudiadas y a la presencia de otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo y alteraciones de la permeabilidad.

La combinación TZP+AMK fue la que obtuvo el más bajo índice de CIF promedio y en ninguno de los casos presentó indiferencia, en contraste con las otras combinaciones. Esto podría indicar que la combinación TZP+AMK sería

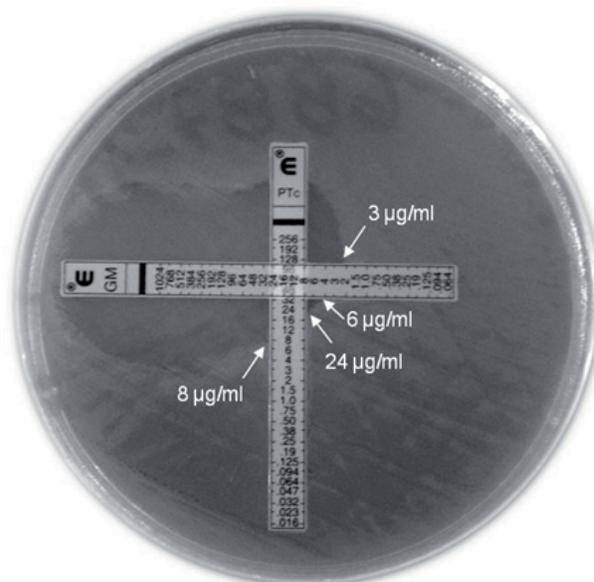


Figura 2. Prueba de sinergia de antimicrobianos entre piperacilina-tazobactam (Ptc) y gentamicina (GM) donde se aprecia una diferencia marcada entre las lecturas de la CIM según el lado de la tira o el cuadrante donde se haga la lectura.

la opción terapéutica a utilizar en caso de infecciones por *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL.

Es de hacer notar que los aislamientos provenientes de los hospitales del sur del país (Hospital Universitario “Ruiz y Páez” y Hospital “Raúl Leoni”) presentaron sinergia a las tres combinaciones de antimicrobianos probadas. Es posible que por la cercanía de ambos hospitales exista una diseminación clonal que explique esta similitud en la respuesta ante las combinaciones de antimicrobianos probadas, o que presenten los mismos determinantes de resistencia.

Hay que destacar que las definiciones de sinergia, adición, indiferencia y antagonismo se refieren a la actividad *in vitro* de la combinación de dos o más antimicrobianos y se desconoce si las combinaciones que demuestren sinergia o adición serán efectivas *in vivo* [14,28]. Sin embargo, se considera que las combinaciones con estas actividades son más efectivas que la monoterapia y podrían disminuir la probabilidad de aparición de subpoblaciones bacterianas resistentes a los antimicrobianos administrados [24,28].

A nuestro entender, este es el primer estudio realizado en Venezuela donde se evalúa la sinergia de antimicrobianos en *P. aeruginosa* multirresistentes productoras de MBL y se sugiere una posible terapia combinada para el tratamiento de pacientes infectados con este tipo de microorganismo.

En este estudio se evaluó la sinergia mediante la colocación de las tiras en ángulo de 90° descrita por White y col [22], realizándose la lectura de la CIM combinada en el borde de la tira que da al cuadrante donde se encuentran señaladas las concentraciones más bajas de ambos antimicrobianos (Figura 1). Esto es aparentemente fácil, sin embargo, pueden presentarse dudas al momento de realizar la lectura, ya que en algunos casos, los antimicrobianos

probados arrojaron diferencias marcadas en la lectura de la CIM dependiendo del cuadrante donde se lea la escala de concentración del antimicrobiano, es decir, pueden existir diferencias de lectura si la escala se lee en el borde de la tira que da al cuadrante donde se realiza la lectura o si se lee en el otro borde, lo cual genera dudas al momento de escoger un valor para el cálculo de la CIF (Figura 2). En la literatura consultada no existen estudios donde se reporte este tipo de problemas para la evaluación de las combinaciones de antimicrobianos por el método epsilométrico, por tanto se desconoce si estas diferencias de lecturas pueden tener algún significado al momento de evaluar la sinergia.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que piperacilina-tazobactam en combinación con gentamicina, amikacina o ciprofloxacina, podrían ser utilizados como alternativas terapéuticas para los diferentes aislamientos de *P. aeruginosa* multiresistentes productoras de MBL provenientes de los hospitales del estado Bolívar, mientras que en los aislados obtenidos de los hospitales del oriente de Venezuela se sugiere la combinación piperacilina-tazobactam/amikacina. Sin embargo, es importante evaluar la sinergia de antimicrobianos en cada aislamiento clínico, ya que el comportamiento del microorganismo ante dichas combinaciones puede variar de un aislamiento a otro. Asimismo, se recomienda realizar estudios posteriores donde se evalúe la eficacia de estas terapias combinadas *in vivo*.

### Agradecimientos

Agradecemos a Dra. Elsa Salazar, Dr. Benito Campos, Lcda. Yasmin Rodríguez y Lcda. Margarita Echeverría por facilitarnos los aislamientos utilizados en este estudio.

### Referencias

- Gad G, El-Domany R, Zaki S, Ashour H. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60:1010-17.
- Gamero M, García A, Rodríguez F, Ibarra A, Casal M. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Rev Español Quimiot.* 2007; 20:230-3.
- Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ta ed. Madrid-España: Panamericana; 2008.
- Cezario R, Duarte L, Ferreira J, Costa R, Da Costa, A, Gontijo P. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27:269-74.
- Crivaro V, Di Popolo A, Caprio A, Lambiase A, Di Resta M, Borriello T, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:127-33.
- Matar G, Chaar M, Araj G, Srour Z, Jamaledine G, Hadi U. Detection of a highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas aeruginosa* from nosocomial infections in a medical center. *BMC Microbiology.* 2005; 5:1-7.
- Rivera M, Rodríguez C, Huayán G. *Pseudomonas aeruginosa* productora de  $\beta$ -lactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de neonatología. *Peru Med Exp Salud Pública.* 2008; 25:250-2.
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009; 58:1133-48.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel M, Van J, Glupczynski Y, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13:560-78.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20:440-58.
- Walsh T, Toleman M, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm?. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:306-25.
- Mendes R, Castanheira M, Campos A, Gales A. Metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42:103-13.
- Pankey G, Ashcraft D. *In vitro* synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:2959-64.
- Balke B, Hogardt M, Schmoltd S, Hoy L, Weissbrodt H, Häussler S. Evaluation of the E test for the assessment of synergy of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25:25-30.
- Dundar D, Otkun M. *In-vitro* efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Yonsei Med J.* 2010; 51:111-6.
- Zavascki A, Barth A, Saraiva A, Didonet A, Fernández J, Francisco A, *et al.* The influence of metallo- $\beta$ -lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:387-92.
- Parkins M, Pitout J, Church D, Conly J, Laupland K. Treatment of infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13:199-202.
- Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect.* 2008; 68:73-82.
- Chachanidze V, Curbelo-Irizarry A, Ashcraft D, Pankey G. *In vitro* synergy of levofloxacin plus piperacillin/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009; 1:5.
- Fujimura S, Takane H, Nakano Y, Watanabe A. *In vitro* synergy studies based on tazobactam/piperacillin against clinical isolates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 19:1115-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; tenth edition informational supplement. M100-S20. Wayne (PA), USA: 2010.
- White R, Burgess D, Manduru M, Bosso J. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40:1914-8.
- Bonapace Ch, White R, Friedrich L, Bosso J. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a

- comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diag Microbiol Infec Disease*. 2000; 30:43-50.
24. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2000. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia> Acceso 15 de diciembre 2010.
  25. López F, Culebras E, Bonilla I, Gómez M, Picazo J. Actividad *in vitro* de terapia combinada con colistina frente a *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en unidad de cuidados intensivos. *Rev Esp Quimioter*. 2008; 21:189-93.
  26. Sánchez D, Marcano D, Spadola E, León L, Payares D, Ugarte C y col. Metaloenzimas tipo VIM detectadas en aislamientos clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro hospitales en Venezuela. *Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel"*. 2008; 39:17-22.
  27. Wareham D, Bean D. *In-vitro* activity of polymyxin B in combination with imipenem, rifampicin and azithromycin versus multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 carbapenemases. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006; 5:1-5.
  28. Sueke H, Kaye S, Neal T, Hall A, Tuft S, Parry Ch. An *in vitro* investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. *Immunol Microbiol*. 2010; 51:4151-5.
  29. Sami B, Arabacıb Ü, Erentürkc S, Akdurd H. Investigation of various antibiotic combinations using the E-Test method in multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Microbiol Chemother*. 2002; 48:31-5.