

Wirksamkeit von Fosfomycin in Kombination mit Levofloxacin gegenüber Erregern von nosokomialen Infektionen

A. Georgopoulos, A. Buxbaum

Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien

Schlüsselwörter:

Fosfomycin, Levofloxacin, Kombination, nosokomiale Infektion

Zusammenfassung

Das Ansteigen schwerer Infektionen durch multiresistente Erreger wie *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* macht eine Antibiotikatherapie in Form einer Kombination zweier Substanzen immer wichtiger. Durch die Kombination von Substanzen versuchen wir einerseits, eine Potenzierung der Wirkung im Sinne eines Synergismus bzw. Addition der Effekte der Einzelantibiotika zu erreichen, und andererseits gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentstehung zu minimieren. Hierbei wurde Fosfomycin in Kombination mit dem Chinolon Levofloxacin auf

eine potenzierende Wirkung gegenüber *S. aureus*, *Escherichia coli* und *P. aeruginosa* klinischer Isolate getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass Fosfomycin in Kombination mit Levofloxacin eine interessante Therapieoption für schwere nosokomiale Infektionen darstellen kann. Über die klinische Relevanz dieser Ergebnisse kann eine Entscheidung erst in der Klinik, beim Patienten getroffen werden, wenn diese Antibiotikakombination angewandt wird.

Key-words:

Fosfomycin, Levofloxacin, combination, hospital-acquired infection

Summary

The steady increase in infections caused by multiresistant bacteria such

as *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* renders antibiotic therapy based on combinations more and more important. The combination of substances has two aims: to add to the potential of one single substance in the form of synergism or additive effects and to minimize the risk for the development of resistance. This study evaluates the additive or synergistic activity of the combination of fosfomycin and the quinolone levofloxacin against clinical isolates of *S. aureus*, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*. The results show that the combination of these two substances can be a valuable therapy option for the treatment of severe hospital-acquired infections. The clinical relevance of these findings will have to be validated by the use of this antibiotic combination in the hospital setting.

Einleitung

Gram-negative Erreger wie *E. coli* und *Pseudomonas species* stellen durch die verschiedenen β -Laktamasen (vor allen Breitspektrum- β -Laktamasen) ein therapeutisches Problem bei nosokomialen Infektionen dar. Auch die Häufigkeit von Infektionen durch Gram-positive Keime wie *Staphylococcus aureus* hat in den letzten Jahren weltweit stark zugenommen. Bei derartigen Infektionen steigt nicht nur die Morbidität und Mortalität, es fallen auch durch einen längeren Spitalsaufenthalt höhere Kosten an. Erreger wie Staphylokokken, *E. coli* und Non-Fermenter wie *Pseudomo-*

nas species zählen zu den häufigsten Verursachern von nosokomialen Infektionen. Eine Kombinationstherapie könnte nicht nur zu einer Verkürzung der Behandlungsdauer und somit auch zu einer Kostensenkung führen, sondern die Wirkung der Antibiotika gegenüber pathogenen Erregern verbessern und die Resistenzentstehung der Keime reduzieren. Ein weiterer Vorteil wäre die Vermeidung der Selektion von Fosfomycin-resistenten Bakterien. Die Kombination von Fosfomycin, einem Antibiotikum mit einem breiten Wirkungsspektrum, mit dem Quinolon Levofloxacin, das ebenfalls ein breites Wirkspektrum

aufweist, scheint auch aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen sehr sinnvoll und interessant. Fosfomycin richtet seinen Angriffspunkt durch Blockierung der Zellwandsynthese auf die Zellwand der Bakterien. Levofloxacin jedoch wirkt im Inneren der Zelle auf die bakterielle DNA-Synthese durch Hemmung der Enzyme DNA-Gyrase und Topoisomerase. In den vorliegenden Studien wurden klinische Isolate aus verschiedenen nosokomialen Infektionen verwendet, um *in vitro* die Kombinationswirkung von Fosfomycin und Levofloxacin zu evaluieren.

Material und Methoden

Bakterienstämme

Insgesamt wurden 160 Isolate und 3 ATCC-Standardstämme, und zwar 60 *E. coli*, 60 *Pseudomonas aeruginosa*, 30 Methicillin-empfindliche und 30 Methicillin-resistente Staphylokokken (*S. aureus*), die von Patienten des AKH Wien mit nosokomialen Infektionen isoliert wurden, verwendet. Alle klinischen Isolate wurden nach standardisierten Labormethoden kultiviert und identifiziert und bis zur Testung bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Antibiotika

Es wurden zwei Antibiotika, nämlich Fosfomycin (Sandoz Wien) und Levofloxacin (Sanofi-Aventis Wien) für die Testung der *In vitro*-Wirksamkeit verwendet. Die Antibiotika wurden nach Vorschrift des Herstellers in Aqua dest. als Standardkonzentration von 1000 mg/ml gelöst und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Aufgetaute Antibiotika wurden nur einmal aufgetaut und am gleichen Tag verwendet.

Medien

Alle Untersuchungen wurden mit Mueller-Hinton-Bouillon plus 25 mg/l Glucose-6-Phosphat als Wachstumsmedium durchgeführt. Zur Kultivierung der Bakterien wurden Columbia-Agarplatten mit 5% Hammelblut verwendet.

Herstellung des Inokulums

Die Bakterien wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mit Mueller-Hinton-Bouillon suspendiert, um nach McFarland eine Dichte von 0,5 zu erreichen. Dieses Inokulum, 1 bis 3×10^6 CFU/ml entsprechend, wurde neuerlich zehnfach verdünnt, damit das endgültige Inokulum 1 bis 3×10^5 CFU/ml ergab.

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration in mg/l von Fosfomycin und Levofloxacin gegenüber *E. coli* (n = 60) und *P. aeruginosa* (n = 60), Grenzwerte für Fosfomycin: MHK > 64 mg/l resistent

Keim	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Fosfomycin	Levofloxacin	Fosfomycin	Levofloxacin
1	32	0,06	32	8
2	4	1	32	8
3	2	0,06	256	8
4	4	1	32	8
5	4	0,06	256	0,5
6	4	0,06	128	8
7	4	2	256	1
8	8	2	256	0,5
9	4	0,25	128	2
10	8	2	256	0,5
11	4	0,03	256	8
12	8	0,03	16	8
13	8	2	256	2
14	4	0,06	256	8
15	8	0,03	128	1
16	4	0,03	256	8
17	128	0,25	16	2
18	128	0,25	128	2
19	4	2	26	2
20	256	0,25	128	4
21	8	0,03	256	8
22	8	2	256	8
23	32	0,06	128	8
24	32	0,06	256	1
25	4	2	128	1
26	4	0,06	256	1
27	8	0,06	64	2
28	4	0,03	256	1
29	16	0,03	256	2
30	128	0,03	64	0,5
31	4	0,03	128	1
32	4	2	64	1
33	8	0,03	128	1
34	16	0,06	256	2
35	4	0,06	256	1
36	2	0,03	128	8

Tabelle 1 Fortsetzung: Minimale Hemmkonzentration in mg/l von Fosfomycin und Levofloxacin gegenüber *E. coli* (n = 60) und *P. aeruginosa* (n = 60), Grenzwerte für Fosfomycin: MHK > 64 mg/l resistent

Keim	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Fosfomycin	Levofloxacin	Fosfomycin	Levofloxacin
37	32	0,06	256	4
38	8	0,06	32	0,5
39	4	0,125	64	0,5
40	4	0,06	128	1
41	4	0,06	256	4
42	16	1	16	1
43	4	0,03	256	1
44	4	0,06	256	1
45	2	0,125	16	2
46	4	0,03	64	1
47	4	0,06	64	2
48	8	0,06	32	2
49	8	2	64	2
50	4	0,125	256	2
51	8	0,06	128	1
52	8	0,03	256	1
53	16	0,03	256	8
54	8	2	128	2
55	16	0,06	64	2
56	8	2	256	0,5
57	2	0,03	128	1
58	4	0,03	256	1
59	64	0,125	256	8
60	64	0,06	16	8

Kombinationsprüfung

Die Effektivität eines einzelnen Antibiotikums wird gewöhnlich an der geringsten Dosis, die kein Bakterienwachstum mehr zulässt (MHK: minimale Hemmkonzentration), gemessen. Als Arbeitsmethode wurde die Checkerboard-Technik angewandt, bei der zwei Antibiotika miteinander kombiniert werden und das Ergebnis immer zwischen Synergismus und Antagonismus liegt. Bei dieser Methode werden die unterschiedli-

chen Konzentrationen der beiden Antibiotika auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Verdünnungsreihen von Antibiotikum A entlang der x-Achse und Verdünnungsreihen von Antibiotikum B entlang der y-Achse der Platte werden angesetzt. Nach der Inkubationszeit werden die einzelnen Proben auf Wachstum bzw. Trübung überprüft. Für die Kombinationsprüfung sind vier verschiedene Werte von Bedeutung, nämlich MHK von Antibiotikum A allein, Antibiotikum

B allein, Antibiotikum A + B in Kombination und das Wachstum des Keimes ohne Antibiotikum. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels Isobologramm, wobei hier von der Definition der Additivität ausgegangen wird. Das Ergebnis ist gleich der Summe der Wirkungen der einzelnen Antibiotika, oder das Antibiotikum verhält sich so, als wäre es mit sich selbst kombiniert (ein Teil Antibiotikum A plus zwei Teile Antibiotikum B ist gleich drei Teile Antibiotikum A). Ist das Ergebnis besser als bei Additivität, so spricht man von Synergismus – ist es schlechter, von Antagonismus. Die graphische Isobologrammauswertung von zwei Substanzen in der Kombination entspricht der Auswertung mit Hilfe des FIC-Index. Der FIC-Index (Fractional Inhibitory Concentration) wird aus der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wie folgt berechnet:

$$\text{FIC-Index} = \frac{\text{MHK A} + \text{B}}{\text{MHK A}} + \frac{\text{MHK B} + \text{A}}{\text{MHK B}}$$

Diese Quotienten stellen Fraktionen wirkungsäquivalenter Konzentrationen dar. Wenn sich die FIC-Werte zu 1 summieren, besteht ein additives Verhalten (Add.). Ist die Summe kleiner als 1, liegt Synergismus (Syn.) vor. Sind die Werte zwischen 1 und 2, besteht Indifferenz (Ind.), und Werte, die größer als 2 sind, zeigen Antagonismus (Ant.). Ein FIC-Wert von 0,5 entspricht einer vierfachen MHK-Reduktion von jedem Antibiotikum der Kombination und bedeutet, dass beide Antibiotika einen synergistischen Effekt zeigen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung der geprüften Antibiotika Fosfomycin und Levofloxacin gegenüber *E. coli*, *P. aeruginosa* und Staphylokokken sind in Tabelle 1 und 2 zusam-

mengefasst dargestellt. Die Ergebnisse der Wirkung der beiden Substanzen in Kombination gegenüber *E. coli*, *P. aeruginosa* und Staphylokokken (MSSA, MRSA) sowie der ATCC-Stämme (Standardkeime) finden sich in Tabellen 3 und 4. Wie aus den minimalen Hemmkonzentrationen eindeutig hervorgeht, zeigt Fosfomycin gegenüber den hier getesteten *E. coli* und Staphylokokken (auch gegenüber Methicillin-resistenten Staphylokokken) eine sehr gute Wirksamkeit. Weniger wirksam war Fosfomycin jedoch gegenüber *P. aeruginosa*. Levofloxacin erbrachte, mit der Ausnahme von Methicillin-resistenten Staphylokokken, ebenso sehr gute minimale Hemmkonzentrationen bei allen anderen getesteten Bakterienstämmen. Die Wirkung von Fosfomycin und Levofloxacin in Kombination gegenüber Standardkeimen (ATCC-Stämme) brachte keine Synergismus-Effekte (Tab. 3). Gegenüber den klinischen Isolaten konnte sowohl eine synergistische als auch eine additive Wirkung festgestellt werden (Tab. 4).

Diskussion

Obwohl wir heute in der Klinik über eine große Auswahl verschiedenster Antibiotika verfügen, kommt es immer wieder zu einer Reihe von Behandlungsproblemen bei schweren Infektionen mit Hospitalismus-Keimen, wie Staphylokokken, *E. coli* und *P. aeruginosa*. Der immunsupprimierte Patient trägt dazu für die Ausbreitung von multiresistenten Erregern im Spital bei. Dazu kommt, dass bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion bestimmte Antibiotika, wie Aminoglykoside oder Glykopeptide, aufgrund ihrer Nephrotoxizität nicht einsetzbar sind. Geringe therapeutische Wirkstoffkonzentrationen am Infektionsort (Hirnabszesse und

Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentration in mg/l von Fosfomycin und Levofloxacin gegenüber Methicillin-empfindlichen (MSSA) und Methicillin-resistenten (MRSA) Staphylokokken (n=60), Grenzwerte für Fosfomycin: MHK > 64 mg/l resistent

Keim	MSSA		MRSA	
	Fosfomycin	Levofloxacin	Fosfomycin	Levofloxacin
1	0,5	0,25	8	32
2	0,25	0,25	32	16
3	0,125	0,5	32	16
4	0,5	0,25	8	32
5	0,25	0,25	32	8
6	0,5	0,5	4	128
7	0,5	1	4	1
8	0,5	0,25	64	8
9	0,25	0,25	8	16
10	0,25	1	4	16
11	0,5	0,5	8	16
12	0,25	0,25	8	8
13	0,25	0,25	8	16
14	0,25	0,125	8	8
15	0,5	0,25	8	16
16	0,5	0,25	8	16
17	1	0,25	1	8
18	0,5	0,25	256	32
19	0,25	0,25	16	8
20	0,25	0,25	16	16
21	0,5	0,25	4	16
22	1	0,25	4	16
23	2	4	8	16
24	0,25	0,25	256	8
25	0,5	0,25	8	32
26	0,5	0,5	64	16
27	0,25	0,25	16	8
28	1	0,25	8	32
29	0,25	0,5	4	16
30	0,5	0,25	4	32

andere Phlegmone, Weichteilinfektionen) machen ebenfalls häufig eine erfolgreiche Antibiotikabehandlung schwierig.

Fosfomycin hat durch die geringe Molekülgröße günstige pharmakokinetische Eigenschaften wie hohe therapeutische Breite, gute Wirksamkeit

Tabelle 3: Wirkung von Fosfomycin und Levofloxacin gegenüber ATCC-Standard-Stämmen

ATCC-Stämme	Wirkung in Kombination von Fosfomycin/Levofloxacin	MHK in mg/l von F/L
<i>E. coli</i> 25922	Ind.	2/0,03
<i>P. aeruginosa</i> 27853	Ind.	4/4
<i>S. aureus</i> 29213	Ind.	0,5/0,25

im anaeroben Milieu bei schwierig zu behandelnden Infektionen (Staphylokokken-, Pseudomonas-Keime) und kann zusätzlich mit Chinolonen kombiniert zur Anwendung kommen.

Es gibt kaum *In vitro*-Studien über die Kombinationswirkung von Fosfomycin und Chinolonen bzw. Levofloxacin. Bei schweren nosokomialen Infektionen wird Fosfomycin sehr häufig mit Betalaktam-Antibiotika in Kombination empfohlen und angewendet. Die bekannteste und am häufigsten angewandte Antibiotikatherapie in Kombination ist die Kombination von Betalaktam-Antibiotika mit Aminoglykosiden. Vor allem gegenüber Staphylokokken-Infektionen und zwar jenen Staphylokokken, die Penicillinase produzieren, wurde auch in der Klinik ein synergistischer Effekt zwischen Betalaktam-Antibiotika und Aminoglykosiden beobachtet.

Bei Staphylokokken und *E. coli* konnte in mehreren Studien ein synergistischer Effekt von Fosfomycin in Kombination mit Betalaktam-Antibiotika gezeigt werden. Dies beruht auf der gleichzeitigen Blockade von verschiedenen Schritten der Zellwandsynthese. Bei den vorliegenden Untersuchungen sollten unter experimentellen Bedingungen mehr Kenntnisse über die Kombinationsmöglichkeit und Wirkungen von Fosfomycin mit dem Chinolon-Levofloxacin gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Spitalskeimen gewonnen werden. Die Ergebnisse der Studie haben unsere Vermutung, dass Fosfomycin mit Levofloxacin sinnvoll kombiniert werden kann, bestätigt.

Wie aus den Ergebnissen zu entnehmen ist, konnte in der Kombination der zwei Substanzen (Fosfomycin/Levofloxacin) bei ca. 70% der hier

getesteten Bakterienstämme eine synergistische oder additive Wirkung festgestellt werden (Tabelle 4). Diese Ergebnisse zeigen, dass Fosfomycin nicht nur mit Betalaktam-Antibiotika, sondern auch mit Levofloxacin als Kombinationspartner eine interessante Behandlungsmöglichkeit von Infektionen mit häufig im Krankenhaus vorkommenden, multiresistenten Bakterien, wie *S. aureus*, *E. coli* oder *P. aeruginosa*, darstellt. Der wesentliche Vorteil für diese Anwendung, nämlich Fosfomycin mit Levofloxacin in Kombination, ist leicht verständlich, da beide Kombinationspartner sowohl über ein breites Wirkspektrum als auch über eine große therapeutische Breite verfügen. Das Ansteigen von Infektionen durch multiresistente Erreger macht eine Kombinationstherapie mit Antibiotika immer wichtiger. Fosfomycin ist ein Antibiotikum, das seit mehreren Jahren mit sehr gutem Erfolg klinisch eingesetzt wird und nach wie vor eine wichtige Rolle in der antimikrobiellen Chemotherapie, auch als Kombinationspartner, spielt. Der Kostenfaktor und die niedrige Nebenwirkungsrate machen eine derartige Antibiotikakombination in vielen Fällen zu einer attraktiven Behandlungsoption. Die Entscheidung für das eine oder andere Antibiotikum mit Fosfomycin in Kombination muss jedoch in Abhängigkeit von den erwarteten Resistenzmustern und dem klinischen Bild des Patienten erfolgen.

Besten Dank an Frau Ing. Waltraud Schmidt für die ausgezeichnete medizinisch-technische Assistenz.

Korrespondierender Autor:

Univ.-Prof. DDr. Apostolos Georgopoulos
Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Tropenmedizin
A-1090 Wien, Währinger Gürtel 18-20

E-Mail:
apostolos.georgopoulos@meduniwien.ac.at

Tabelle 4: Kombination von Fosfomycin mit Levofloxacin gegenüber nosokomialen Erregern (n = 180)

Levofloxacin	Antibiotika		Fosfomycin			
	Keime	n	Syn.	Add.	Ind.	Ant.
	<i>E. coli</i>	60	20	20	20	0
	<i>P. aeruginosa</i>	60	9	34	17	0
	MSSA	30	7	13	9	0
	MRSA	30	1	20	9	0