

Wirksamkeit von Fosfomycin in Kombination mit β -Laktam-Antibiotika gegenüber *Staphylococcus aureus*

A. Georgopoulos

Univ.-Klinik für Innere Medizin I, Klin. Abt. für Infektionen und Chemotherapie, Medizinische Universität Wien
(Leiter: Univ.-Prof. DDr. W. Graninger)

Schlüsselwörter:

Fosfomycin, β -Laktame, Kombinations-therapie

Zusammenfassung

Schwere Staphylokokken-Infektionen, insbesondere Infektionen, die durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Erreger hervorgerufen werden, werden oft mit einer Kombination von Antibiotika behandelt. So kann auch durch die Anwendung von zwei Antibiotika gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung gesenkt werden. Durch die Kombination zweier Antibiotika versuchen wir eine Potenzierung der Wirkung im Sinne eines Synergismus der Einzelantibiotika zu erreichen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde Fosfomycin in Kombination mit β -Laktam-Antibiotika auf ihre

potenzierende Wirkung gegenüber einer großen Anzahl von *Staphylococcus aureus*-Erreger evaluiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Fosfomycin in Kombination mit β -Laktam-Antibiotika eine interessante Therapieoption von schweren Staphylokokkeninfektionen im Spital darstellen könnte. Über die klinische Relevanz dieser Daten kann eine Entscheidung erst in der Klinik, beim Patienten getroffen werden, wenn dieser Antibiotikakombination mehr Beachtung geschenkt wird.

Key-words:

Fosfomycin, β -lactams, combination therapy

Summary

Severe staphylococcal infections, especially infections caused by the methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus pathogens are very often treated using a combination of antibiotics. This method of applying simultaneously 2 antibiotics reduces a possible development of resistance. Due to the fact that two antibiotics are combined we try to potentiate the effect (synergism) of a single antibiotic application. The potentiating effect of the simultaneous application of Fosfomycin and β -lactam-antibiotics against a large number of *Staphylococcus aureus* strains could be evaluated in the present study. It could be shown that the combination of Fosfomycin and β -lactam-antibiotics represents an interesting therapy option in case of severe staphylococcal infections in hospital settings. The clinical relevancy of these dates depends on the future use of this combination therapy in daily clinical practice.

Einleitung

Die Häufigkeit von Infektionen durch Gram-positive Keime hat in den letzten Jahren weltweit stark zugenommen. Erreger wie Methicillin-resistente Staphylokokken, Penicillin-resistente Pneumokokken oder Vancomycin-resistente Enterokokken sind unter den häufigsten Verursachern von nosokomialen Infektionen. Bei derartigen Infektionen steigt nicht nur die Morbidität und Mortalität, es fallen auch durch einen längeren Spitalsaufenthalt höhere Kosten an. Eine gezielte Kombinationstherapie könnte nicht nur zu einer Verkürzung der

Behandlungsdauer und somit auch zu einer Kostensenkung führen, sondern die Wirkung eines Antibiotikums gegenüber den pathogenen Erregern verbessern.

In dieser Studie wurden klinische Isolate aus verschiedenen Staphylokokken-Infektionen von Spitalspatienten verwendet und *in vitro* in Kombination mit verschiedenen Antibiotika getestet.

Material und Methoden

Bakterienstämme: Es wurden insgesamt 104 Stämme – 91 Methicillin-

empfindliche und 13 Methicillin-resistente-Staphylokokken (*Staphylococcus aureus*), die von Patienten aus dem AKH-Wien isoliert wurden, gesammelt. Alle klinischen Isolate wurden nach standardisierten Labormethoden kultiviert und identifiziert und bis zur Testung bei -196°C aufbewahrt.

Antibiotika: Für die Kombinationsprüfung wurden Fosfomycin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefuroxim und Imipenem verwendet. Die Antibiotika wurden nach Vorschrift des Herstellers im Aqua dest. als Standardkonzentration von 1.000 mg/ml gelöst

und im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Aufgetaute Antibiotika wurden am selben 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 Inoculums: 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 Inoculum, 1 bis 3 x 10⁶ CFU/ml entsprechend, wurde neulich zehnfach verdünnt, damit das endgültige Inoculum 1 bis 3 x 10⁵ CFU/ml ergibt.

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 angewendet, bei der zwei Antibiotika miteinander kombiniert werden und das Ergebnis immer zwischen Synergismus und Antagonismus liegt. Bei Checkerboard, der am meisten verwendeten Methode, werden die unterschiedlichen 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 Kombinationstestung 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 Anti-

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration in mg/L gegenüber MSSA (n=91)

Bakterien/ Stämme	Fosfomycin	Amox./Clav.	Cefuroxim	Imipenem
3653	0,125	0,06	0,25	0,015
1864	2	0,125	1	0,015
2322	0,125	0,5	1	0,015
2399	0,5	1	1	0,01
1769	0,125	1	0,25	0,015
1785	0,25	1	0,5	0,015
1983	0,125	0,06	0,25	0,015
2080	0,125	0,5	0,25	0,015
3265	0,25	0,06	0,25	0,015
2446	2	2	1	0,015
2490	0,25	2	1	0,015
3400	0,5	0,125	1	0,015
2300	2	0,06	1	0,015
1844	0,06	0,5	0,5	0,015
1756	0,125	1	0,5	0,015
3805	0,125	0,5	1	0,015
3405	0,125	0,06	0,5	0,015
4186	0,125	0,06	0,5	0,015
1588	0,125	2	1	0,015
1961	0,125	0,06	1	0,015
2466	0,25	1	1	0,015
2310	1	0,125	1	0,015
2074	0,5	1	1	0,015
2498	2	0,5	1	0,015
2407	0,25	1	1	0,015
EPI0231	1	0,5	1	0,015
2255	0,25	0,5	0,5	0,015
1812	0,125	0,5	0,5	0,015
1614	0,5	1	1	0,015
2364	0,5	0,5	1	0,015
3815	0,25	1	0,5	0,015
3655	0,125	0,5	0,5	0,015
3588	2	1	1	0,015
2930	0,125	0,06	0,5	0,015
2607	0,25	0,125	0,5	0,015
2442	0,125	1	0,5	0,015
2009	0,25	0,06	0,5	0,015
2615	0,5	32	2	16
1734	0,5	2	1	0,015
3801	0,25	0,5	1	0,015

Fortsetzung Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration in mg/L gegenüber MSSA (n=91)

Bakterien/ Stämme	Fosfomycin	Amox./Clav.	Cefuroxim	Imipenem
2474	1	1	1	0,015
2468	0,5	1	0,5	0,015
2459	1	1	0,5	0,015
2067	1	1	1	0,015
1846	0,5	0,5	1	0,015
2060	0,5	0,5	0,5	0,015
2223	0,25	1	0,5	0,015
2805	0,25	0,125	0,5	0,015
2252	0,5	0,5	0,5	0,015
2375	0,125	1	1	0,015
2779	0,25	0,06	1	0,015
3423	0,125	1	1	0,015
1682	1	0,5	0,5	0,015
1562	1	2	0,5	0,015
1486	0,5	0,06	0,5	0,015
1501	1	1	0,5	0,015
1564	0,125	1	1	0,015
2803	0,5	1	0,5	0,015
3542	0,5	0,5	0,5	0,015
2928	0,5	1	1	0,015
2807	0,25	0,125	0,5	0,015
3792	1	0,5	1	0,015
2849	0,5	0,125	1	0,015
3022	0,5	0,5	0,5	0,015
2278	0,5	0,5	1	0,015
3566	0,25	4	2	0,015
3013	1	2	1	0,015
3014	0,25	1	0,5	0,015
3422	0,5	0,125	0,5	0,015
2169	0,125	0,06	0,5	0,015
1996	0,25	1	1	0,015
2283	0,25	0,125	1	0,015
2213	0,25	1	0,5	0,015
2289	0,06	1	0,5	0,015
1584	0,5	0,5	1	0,015
2797	0,5	1	1	0,015
2029	0,06	1	1	0,015
1953	0,125	1	0,5	0,015
1675	2	2	1	0,015

biotikum. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels Isobologramm, wobei wir hier von der Definition der Additivität ausgehen. Das Ergebnis ist gleich der Summe der Wirkungen der einzelnen Antibiotika oder die der Antibiotika verhält sich so, als wäre sie mit sich selbst kombiniert (ein Teil Antibiotikum A plus zwei Teile Antibiotikum B ist gleich wie drei Teile Antibiotikum A). Ist das Ergebnis besser als bei Additivität, so sprechen wir 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 und Diskussion

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfungen der getesteten Antibiotika gegenüber *Staphylococcus aureus* sind in den Tabellen 1 bis 3 zusammengefasst und dargestellt. Die Wirkung von Fosfomycin mit den hier kombinierten β -Laktamen gegenüber MSSA *in vitro* sind in den Tabellen 4

und 5 zusammengefasst. Wie aus den Tabellen 1 bis 3 eindeutig hervorgeht, zeigt Fosfomycin gegenüber Staphylokokken und auch gegenüber MRSA eine sehr gute Wirksamkeit. Die Anzahl der *In vitro*-Studien über Kombinationswirkungen von Fosfomycin mit β -Laktam-Antibiotika sind sehr gering. Fosfomycin wird jedoch bei Spitalsinfektionen sehr häufig mit β -Laktam-Antibiotika in Kombination empfohlen und angewendet. In dieser Studie sollten unter experimentellen Bedingungen mehr Kenntnisse über die Kombinationsmöglichkeiten und Wirkungen von Fosfomycin mit β -Laktam-Antibiotika gewonnen werden. Im Speziellen sollte hier vergleichend die Wirkung von Fosfomycin mit Amoxicillin/Clavulansäure oder mit einem Cephalosporin der 2. Generation, nämlich Cefuroxim, bzw. mit Imipenem gegenüber Staphylokokken *in vitro* evaluiert werden.

Die Ergebnisse bestätigen derartige Kombinationsmöglichkeiten und im Falle von Amoxicillin/Clavulansäure sogar mit einer 20%igen synergistischen Wirkung. Die Kombination Fosfomycin mit Cefuroxim ist möglich, jedoch mit Imipenem wird die Kombinationswirkung – synergistische bzw. additive Wirkung – bis 60% bei MSSA vorteilhaft und auch bei MRSA stark ausgeprägt, nämlich bei 9 von 13 Bakterienisolaten wurde ein synergistischer Effekt festgestellt (Tabelle 3 und 4). Diese Ergebnisse bestätigen die gute Wirkung von Fosfomycin als Kombinationspartner als eine interessante Therapiemöglichkeit von Staphylokokkeninfektionen im Spitalsbereich. Der wesentliche Vorteil für die Anwendung derartiger Antibiotikakombinationen, nämlich Fosfomycin mit β -Laktamen, wird leicht verständlich, da beide Kombinationspartner sowohl über ein breites Wirkspektrum, als auch über eine große therapeutische Breite verfügen.

Fortsetzung Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentration in mg/L gegenüber MSSA (n=91)

Bakterien/ Stämme	Fosfomycin	Amox./Clav.	Cefuroxim	Imipenem
2154	0,5	0,06	0,5	0,015
2161	0,125	0,06	0,5	0,015
2089	0,25	1	1	0,015
2019	0,125	1	0,5	0,015
2139	0,25	1	1	0,015
1849	1	0,5	0,5	0,015
1848	1	1	0,5	0,015
2331	0,06	0,06	0,25	0,015
2505	0,5	1	0,25	0,015
2804	0,25	1	0,5	0,015
2400	0,5	2	0,5	0,015
ATCC 2921	0,5	0,25	1	0,015

Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentration in mg/L gegenüber MRSA (n=13)

Bakterien/ Stämme	Fosfomycin	Amox./Clav.	Cefuroxim	Imipenem
EPI 248	32	64	4	128
EPI 217	16	32	256	128
2182	128	64	128	64
1747	2	64	256	64
1787	0,5	16	256	8
3607	4	64	128	128
1965	4	32	4	0,25
2208	1	64	256	64
.....1663	2	64	256	32
EPI 223	32	16	256	16
EPI 192	2	64	256	128
2218	8	64	>256	8
2086	32	8	256	64

Tabelle 3: Bereich der minimalen Hemmkonzentration gegenüber *Staphylococcus aureus* in mg/L

	MSSA (n = 91)	MRSA (n = 13)
Fosfomycin	0,06 – 2	0,5 – 128
Amox./Clav.	0,06 – 32	8 – 64
Cefuroxim	0,25 – 2	4 – 256
Imipenem	0,015 – 16	0,25 – 128

Tabelle 4: Kombinationswirkung von Fosfomycin mit β -Laktam-Antibiotika gegenüber MSSA, n=91, (%)

Antibiotika	Fosfomycin			
	Syn	Add	Ind	Ant
Amox./Clav.	19 (21)	17 (19)	55 (60)	-
Cefuroxim	5 (5)	6 (7)	79 (87)	1 (1)
Imipenem	8 (9)	46 (50)	37 (41)	-

Tabelle 5: Kombinationswirkung von Fosfomycin mit β -Laktam-Antibiotika gegenüber MRSA (n=13)

Antibiotika	Fosfomycin			
	Syn	Add	Ind	Ant
Amox./Clav.	4	2	7	-
Cefuroxim	3	2	8	-
Imipenem	9	2	2	-

Die Bedeutung von nosokomialen Infektionen durch Gram-positive Bakterien ist enorm. Multiresistente Erreger stellen oft ein großes therapeutisches Problem dar, weil es nur ein begrenztes Angebot an Antibiotika gibt und immer häufiger Studien über neu auftretende resistente Bakterien erscheinen. Das Ansteigen von Infektionen durch resistente Bakterien macht eine Kombinationsbehandlung immer wichtiger. Der Kostenfaktor und die niedrige Nebenwirkungsrate machen eine derartige Antibiotika-Kombination in vielen Fällen zu einer attraktiven Behandlungsoption. Die Entscheidung jedoch für das eine oder andere Antibiotikum mit Fosfomycin in Kombination muss in Abhängigkeit von der erwarteten Resistenzsituation und dem klinischen Bild des Patienten erfolgen.

Besten Dank an Ing. Waltraud Schmidt und Karin Stich für die ausgezeichnete medizinisch-technische Assistenz.

Anschrift des Verfassers:

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

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