

# Sensibilidade das Enterobacteriáceas Produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Alargado à Fosfomicina

## *Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Susceptibility to Fosfomicin*

Tiago Brito, Clara Portugal, Luísa Sancho, Carina Carvalho, Bruno Grima, José Delgado Alves

### Resumo

**Introdução:** A emergência de enterobacteriáceas produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) nos últimos anos representa um problema de saúde pública, escasseando alternativas eficazes para o seu tratamento. Vários trabalhos internacionais têm demonstrado uma sensibilidade *in vitro* muito elevada destas bactérias à fosfomicina, havendo alguns que testaram a eficácia clínica do tratamento de cistites agudas não complicadas no subgrupo das *Escherichia coli* com resultados promissores. No Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca EPE (HFF) tem havido um aumento anual progressivo do isolamento destes patógenos. Os autores pretendem testar a sensibilidade das enterobacteriáceas produtoras de ESBL à fosfomicina no HFF e averiguar o eventual potencial terapêutico.

**Material e métodos:** Estudo prospectivo, durante 6 meses, no qual foi testada a sensibilidade à fosfomicina das enterobacteriáceas produtoras de ESBL isoladas. Foi utilizado o equipamento VITEK 2<sup>®</sup> para identificação das estirpes. A susceptibilidade à fosfomicina foi determinada através do método de difusão de disco (Oxoid<sup>®</sup>). O tratamento estatístico foi realizado através do programa Microsoft Excel<sup>®</sup>.

**Resultados:** Foram identificadas 150 enterobacteriáceas ESBL, das quais 52% corresponderam a *Klebsiella pneumoniae* e 44% a *Escherichia coli*. Cerca de 88% das *Escherichia coli* e 68% das *Klebsiella pneumoniae* apresentaram sensibilidade à fosfomicina.

**Conclusões:** De acordo com os dados obtidos a nível internacional e no nosso hospital, os autores recomendam a utilização da fosfomicina para tratamento de cistites agudas não complicadas provocadas por *Escherichia coli* produtoras de ESBL, sugerindo, concomitantemente, a realização de trabalhos futuros de eficácia clínica para consubstanciar esta prática e recomendação.

**Palavras-chave:** Fosfomicina; Infecções por Enterobacteriaceae; Infecções por *Escherichia coli*; Infecções por *Klebsiella*; Resistência beta-Lactâmica

### Introdução

A pressão selectiva do uso indiscriminado de antibióticos nos últimos anos tem provocado a emergência de variados microrganismos multirresistentes, dos quais as enterobacteriáceas produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) são um

### Abstract

**Introduction:** The rising frequency of extended spectrum Beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in recent years represents an important public health issue, with scarce effective alternatives for treatment. Several international studies have demonstrated very high *in vitro* susceptibility of these bacteria to fosfomicin. The clinical efficiency of this treatment was tested on acute uncomplicated cystitis due to *Escherichia coli* subset, with encouraging results. In Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca EPE (HFF) there has been a progressive annual increase in the isolation of these pathogens. The authors' goal was to test the susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to fosfomicin in HFF and assess its possible therapeutic potential.

**Material and methods:** Prospective study (6 month period), in which the susceptibility to fosfomicin of isolated ESBL-producing Enterobacteriaceae was tested. The VITEK 2<sup>®</sup> equipment was used to identify the strains. The fosfomicin susceptibility was determined by disk diffusion method (Oxoid<sup>®</sup>). Statistical analysis was performed using the Microsoft Excel<sup>®</sup> software.

**Results:** We identified 150 ESBL-producing Enterobacteriaceae, of which 52 % corresponded to *Klebsiella pneumoniae* and 44% to *Escherichia coli*. Approximately 88% of *Escherichia coli* and 68% of *Klebsiella pneumoniae* were susceptible to fosfomicin.

**Conclusions:** Based on the data obtained at international level and in this study, the authors recommend the use of fosfomicin for the treatment of acute uncomplicated cystitis caused by ESBL-producing *Escherichia coli*. Future clinical efficacy research is needed in order to substantiate this practice and recommendation.

**Keywords:** Fosfomicin; Beta-Lactam Resistance; Enterobacteriaceae Infections; *Escherichia coli* Infections; *Klebsiella* Infections

paradigma de preocupação no âmbito da saúde pública. Estes patógenos têm vindo a ser isolados não só em contexto hospitalar, mas também na comunidade.<sup>1,2</sup>

As ESBL são enzimas bacterianas que hidrolisam os antibióticos beta-lactâmicos, tornando-os inactivos. Existem vários tipos dife-

rentes de ESBL, que promovem resistência a cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> e 4.<sup>a</sup> geração e que, frequentemente, conferem igualmente co-resistência a cotrimoxazol, tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.<sup>3</sup> Mais alarmante é o facto de, cada vez mais, terem vindo a ser isoladas bactérias produtoras de ESBL específicas (AmpC beta-lactamases, serine carbapenemases ou metalo-beta-lactamases) que conferem resistência a carbapenemos,<sup>4</sup> classe antibiótica considerada de eleição no tratamento de infecções graves por enterobacteriáceas produtoras de ESBL.<sup>5</sup>

A sociedade americana de doenças infecciosas incluiu recentemente a *Escherichia coli* (*Escherichia coli*) e *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*) produtoras de ESBL (os dois membros desta família mais vezes isolados mundialmente) como dois de seis microrganismos multirresistentes para os quais há necessidade urgente de novas opções terapêuticas.<sup>6</sup>

Como resposta a esse apelo, e na escassez de novos antimicrobianos, a comunidade científica tem-se voltado para fármacos mais antigos que, por terem sido colocados de parte no uso diário e por terem um mecanismo de acção diferente, poderão ter mantido a sua actividade antimicrobiana contra agentes multirresistentes.<sup>7,8</sup>

A fosfomicina é um antibiótico descoberto há mais de 30 anos, sendo estruturalmente diferente de qualquer outra classe de antibióticos. Necessita de estar dentro da célula para exercer a sua acção. Entra na bactéria através de 2 sistemas de transporte,<sup>9</sup> sendo o principal constituído pelo glicerosfato, enquanto o secundário consiste no sistema da hexose fosfato, que pode ser induzido pela glicose-6-fosfato.

Uma vez dentro da célula, inibe o primeiro passo na síntese da parede celular bacteriana. O seu mecanismo de acção consiste na inibição da enzima citoplasmática enolpiruvato transferase, através de uma ligação covalente ao resíduo de cisteína do local activo desta enzima, bloqueando assim a adição de fosfoenolpiruvato ao UDP-*N*-acetilglucosamina. Esta reacção é o primeiro passo na formação de ácido UDP-*N*-acetilmurâmico, o precursor do ácido *N*-acetilmurâmico, que existe somente nas paredes celulares bacterianas.<sup>10</sup>

A fosfomicina apresenta uma boa biodisponibilidade oral. O pico de concentração plasmática (22 a 32 mg/L) ocorre 2 a 2,5 horas após uma toma oral.<sup>9</sup>

O fármaco não se liga a proteínas plasmáticas, não é metabolizado, sendo excretado inalterado na urina. Após uma toma oral de fosfomicina, a concentração urinária máxima é atingida após 4 horas, mantendo-se em níveis superiores a 128 mg/L por 36 a 48 horas. Estes níveis são suficientes para inibir a maioria dos patogéneos urinários.<sup>9</sup>

É comercializada, nos EUA, sob a forma de saquetas, equivalendo a 3 g de fosfomicina, necessitando de dissolução em água fria antes da toma.<sup>9</sup> Em Portugal é comercializada também sob a forma de saquetas, com duas dosagens distintas: 2 g e 3 g. É

aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para cistites agudas não complicadas em mulheres, sendo segura nas grávidas.<sup>10</sup>

No Japão e em alguns países europeus, existe formulação para administração endovenosa, não estando ainda regulamentadas as indicações da sua utilização através desta via.

A fosfomicina é, geralmente, bem tolerada, sendo os sintomas gastrointestinais (principalmente a diarreia) os mais frequentes.<sup>9</sup>

Possui uma actividade antimicrobiana de largo espectro, incluindo diversas bactérias aeróbicas gram-negativas e gram-positivas. Para além disso, a fosfomicina parece ser poupada do efeito de variados mecanismos de acção de resistência a antibióticos, devido à sua estrutura e mecanismo de acção singulares.<sup>11,12</sup> Em países onde a fosfomicina é utilizada de forma rotineira na prática clínica, os isolamentos de enterobacteriáceas revelam baixos níveis de resistência a este antibiótico.<sup>13-15</sup> Pensa-se que as estirpes que desenvolvem resistência à fosfomicina através de mutações cromossómicas, possam adquirir concomitantemente outras modificações biologicamente desfavoráveis, que diminuam a sua sobrevivência.<sup>15,16</sup>

O método de diluição de agár é o método de eleição para aferir a susceptibilidade das enterobacteriáceas produtoras de ESBL à fosfomicina, uma vez que os métodos de microdiluição e difusão de disco apresentam resultados inconsistentes quando testam a sensibilidade das *Klebsiella pneumoniae*. Contudo, apresentaram resultados considerados fidedignos quando são testadas as *Escherichia coli*.<sup>17,18</sup>

Deve ser adicionada glicose-6-fosfato ao meio de cultura, numa concentração de 25 mg/L, mimetizando assim as condições *in vivo*, melhorando então a sensibilidade *in vitro* à fosfomicina, para a maior parte das enterobacteriáceas.<sup>19,10</sup>

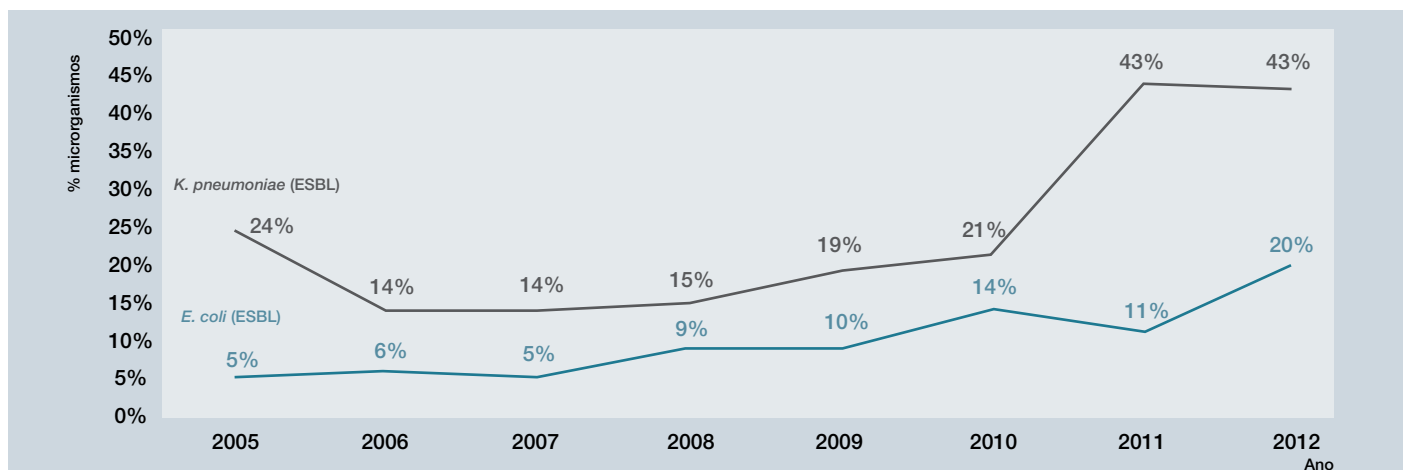
Um artigo de revisão de 2010<sup>20</sup> analisou 17 estudos de susceptibilidade à fosfomicina de enterobacteriáceas multirresistentes e 4 estudos de eficácia clínica da fosfomicina a infecções causadas por estas bactérias. Os estudos eram provenientes de diversos países (exs.: Reino Unido, França, Espanha, Japão, Hong Kong, Estados Unidos da América) ilustrando assim uma realidade mundial. Os métodos utilizados para aferir a susceptibilidade foram, principalmente, o teste de difusão de disco e o método de diluição de agár. Em 11 dos 17 estudos foi respeitado o limiar da concentração inibitória mínima de 64 mg/L ou menos (preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute) para definir a susceptibilidade.

Foram isoladas 5057 enterobacteriáceas, das quais 4448 eram produtoras de ESBL. Nos 11 estudos, nos quais foi possível retirar informação mais específica, verificou-se que pelo menos 90% dos isolamentos eram sensíveis à fosfomicina. Das 1657 *Escherichia coli* ESBL isoladas, 96% eram sensíveis. Das 748 *Klebsiella pneumoniae*, 81% eram sensíveis.

Em dois estudos clínicos analisados,<sup>21, 22</sup> o tratamento de cistites

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>E. coli</i> (ESBL)	30	42	44	92	108	192	211	226
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	33	27	29	42	72	73	229	167

**Figura 1:** Isolamentos, em número absoluto, de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL nas uroculturas requisitadas no HFF nos últimos anos



**Figura 2:** Percentagem de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL, em relação ao número total de *E. coli* e *K. pneumoniae*, isoladas em uroculturas no HFF nos últimos anos

agudas complicadas ou não complicadas, provocadas por *Escherichia coli* produtoras de ESBL com fosfomicina oral, apresentou bons resultados clínicos em 93% dos doentes, num total de 80 tratados.

Assim, a fosfomicina parece ser uma opção válida no tratamento de cistites agudas não complicadas provocadas por enterobactérias produtoras de ESBL (susceptibilidade superior nas *E. coli* analisadas<sup>20</sup>), carecendo contudo de mais estudos de eficácia clínica, principalmente para as situações de cistites agudas complicadas ou com critérios de gravidade.

No Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca EPE (HFF), tem-se vindo a assistir a um número crescente de isolamentos de enterobactérias produtoras de ESBL nos últimos anos, Fig. 1, com padrões de resistência cada vez mais abrangentes, havendo, inclusivamente, isolamento em 2011 de 2 casos de resistência a carbapenemos, o que restringe em muito as opções terapêuticas nestas situações.

Verifica-se assim o isolamento de 30 *Escherichia coli* produtoras de ESBL em 2005, aumentando de forma muito considerável até atingir os 226 isolamentos em 2012. De igual forma, em relação às *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, constata-se o isolamento de 33 em 2005 e 167 em 2012. Estes resultados ilustram a real e preocupante dimensão da incidência nacional deste tipo de bactérias.

Para além do número absoluto de isolamentos destas bactérias ter aumentado de forma categórica, também o número relativo, em relação ao total de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, tem crescido significativamente, Fig. 2.

Nos primeiros anos, cerca de 15% das *Klebsiella pneumoniae* isoladas eram produtoras de ESBL, enquanto em 2012 já 43% produziam estas enzimas. Em relação às *Escherichia coli*, verificou-se que, em 2005, 5% eram produtoras de ESBL, aumentando gradualmente até 20% em 2012.

Assim, estamos perante um problema de importância crescente, não só no Mundo, como também no nosso Hospital, sendo fundamental termos mais opções terapêuticas à nossa disposição. A fosfomicina poderá, neste contexto, afigurar-se como uma alternativa válida para o tratamento de cistites agudas provocadas por enterobactérias produtoras de ESBL.

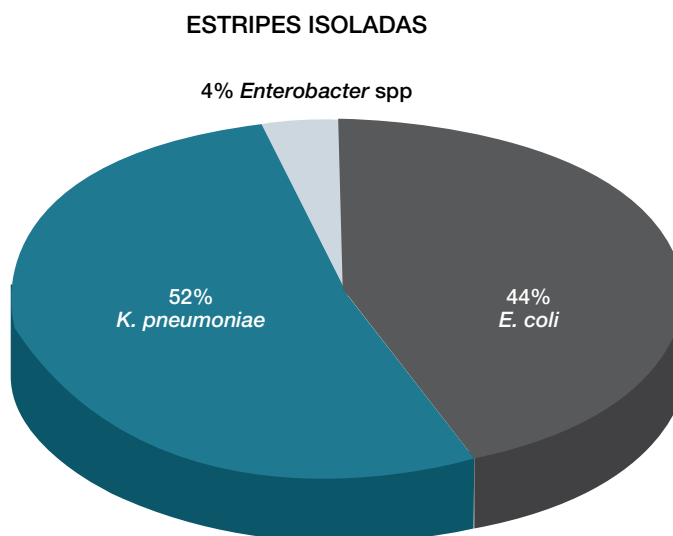
Os autores pretenderam então testar a sensibilidade das entero-

bactérias produtoras de ESBL à fosfomicina durante 6 meses e propor a sua utilização nos doentes com cistites agudas não complicadas (provocadas por estas bactérias), se resultados de sensibilidade elevados.

## Material e Métodos

Estudo prospetivo, no qual foram analisadas todas as uroculturas requisitadas no HFF durante 6 meses, compreendidos entre 1 de Novembro de 2011 e 30 de Abril de 2012. Foram selecionadas as enterobactérias com padrão de resistência compatível com produção de ESBL e o laboratório testou a sua sensibilidade à fosfomicina.

A identificação bacteriana e o teste de sensibilidade inicial foram realizados através do equipamento VITEK 2® (*Biomérieux, France*). A susceptibilidade à fosfomicina foi determinada através do método de difusão de disco (Oxoid®). Foi utilizado o limiar de sensibili-



**Figura 3:** Estirpes de enterobactérias isoladas em número relativo

	Sensíveis	Resistentes
<i>E. coli</i> (ESBL)	88%	12%
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	68%	32%

**Figura 4:** Sensibilidade das *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL à fosfomicina

dade preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (sensível  $\geq$  16 mm de diâmetro).

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado através do programa *Microsoft Excel*<sup>®</sup>.

## Resultados

Foram identificadas 150 enterobacteriáceas ESBL, das quais 52% corresponderam a *K. pneumoniae* e 44% a *E. coli*, como se pode verificar pela análise da Fig. 3.

Analisando por estirpe, verificamos que 88% das *E. coli* e 68% das *K. pneumoniae* foram sensíveis fosfomicina, Fig. 4, resultando numa sensibilidade global de 77%.

## Discussão

Analisando os resultados verificamos uma maior sensibilidade *in vitro* à fosfomicina das *E. coli* isoladas, quando comparadas com as *K. pneumoniae*. Esta diferença foi maior do que a realidade descrita em outros trabalhos,<sup>20</sup> podendo ser justificada pela menor fidedignidade do método de difusão de disco na avaliação da sensibilidade das *K. pneumoniae* em relação à avaliação da sensibilidade das *E. coli*.<sup>17, 18</sup> Devido ao envolvimento crescente das enterobacteriáceas ESBL na etiologia das cistites agudas torna-se fundamental encontrar alternativas orais para o tratamento de infecções sem critérios de gravidade, minimizando e reservando a utilização de antibióticos de espectro alargado (como os carbapenemos) para situações graves. Assim, com a utilização da fosfomicina em cistites agudas não complicadas, poder-se-ão diminuir os custos inerentes à antibioterapia endovenosa e hospitalização e diminuir a pressão selectiva sobre as bactérias.

## Conclusões

As enterobacteriáceas produtoras de ESBL apresentam uma sensibilidade *in vitro* elevada à fosfomicina, quer em resultados internacionais, quer nos resultados apresentados no nosso estudo. Já foram realizados trabalhos<sup>21, 22</sup> que apresentaram boa eficácia clínica da fosfomicina no tratamento de cistites agudas não complicadas provocadas por *E. coli* produtoras de ESBL.

Por conseguinte, os autores recomendam a utilização da fosfomicina para tratamento de cistites agudas não complicadas provocadas por *E. coli* produtoras de ESBL, sugerindo, concomitantemente, a realização de trabalhos futuros de eficácia clínica para consubstanciar esta prática e recomendação.

Os resultados de sensibilidade das *K. pneumoniae* à fosfomicina, através do método de difusão de disco, apresentam resultados mais inconstantes e menos fidedignos, pelo que os autores recomendam precaução na decisão terapêutica nestas situações. Após o trabalho realizado, a fosfomicina foi aprovada pela comissão de farmácia e terapêutica do HFF, estando aprovada para utilização em cistites agudas não complicadas, cujo resultado de urocultura revele isolamento de *E. coli* sensível a este antibiótico. ■

*Protecção de Seres Humanos e Animais: Os autores declaram que não foram realizadas experiências em seres humanos ou animais.*

*Direito à Privacidade e Consentimento Informado: Os autores declaram que nenhum dado que permita a identificação do doente aparece neste artigo.*

*Conflitos de Interesse: Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho*

*Fontes de Financiamento: Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo*

*Correspondência: tmsalvadorbrito@hotmail.com*

*Recebido: 26.01.2015*

*Aceite: 05.06.2015*

## Bibliografia

- Zahar JR, Lortholary O, Martin C, Potel G, Plesiat P, Nordmann P. Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;10:172-80.
- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-86.
- Livermore DM, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol* 2006;14:413-20.
- Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial, Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006;42:657-68.
- Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infections. *Lancet Infect Dis* 2008;8:751-62.
- Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomicin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis* 2008;46:1069-77.
- Nabin K, Shrestha and J. Walton Tomford, *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 2001;10:255-260.
- Bertram G, Katzung, Susan B. Masters, Anthony J. Trevor. *Basic And Clinical Pharmacology Edition* 2009. London: McGraw-Hill; 2009.
- Patel SS, Balfour JA, Bryson HM. Fosfomicin tromethamine: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs* 1997;53:637-56.

12. Arca P, Rico M, Brana AF, Villar CJ, Hardisson C, Suarez JE. Formation of an adduct between fosfomicin and glutathione: a new mechanism of antibiotic resistance in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1552-56.
13. Soussy C. Recommendations 2008. Paris: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie; 2008.
14. Knottnerus BJ, Nys S, Ter Riet G, Donker G, Geerlings SE, Stobberingh E. Fosfomicin tromethamine as second agent for the treatment of acute, uncomplicated urinary tract infections in adult female patients in The Netherlands? *J Antimicrob Chemother* 2008;62:356-59.
15. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2850-58.
16. Alos JI, Garcia-Pena P, Tamayo J. Biological cost associated with fosfomicin resistance in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections. *Rev Esp Quimioter* 2007;20:211-15.
17. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
18. M. de Cueto, L. López, J. R. Hernández, C. Morillo, and A. Pascual. In Vitro Activity of Fosfomicin against Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of Susceptibility Testing Procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:368-70.
19. Barry AL, Fuchs PC. In vitro susceptibility testing procedures for fosfomicin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1235-38.
20. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomicin for the treatment of multi-drug-resistant, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010;10:43-50.
21. Rodríguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, et al. Community infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008;168:1897-902.
22. Pullukcu H, Tasbakan M, Sipahi OR, Yamazhan T, Aydemir S, Ulusoy S. Fosfomicin in the treatment of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*-related lower urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:62-65.