



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL

BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A FOSFOMICINA E IMPLICACION DE LAS  
SUBPOBLACIONES CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA EN SU ACTIVIDAD *IN VITRO*.

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por la Licenciada en Biología Dña.  
Mónica Ballestero Téllez.

Sevilla, septiembre de 2017





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y el Dr. D. Fernando Docobo Pérez, Investigador Post-doctoral del programa VPPI de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A FOSFOMICINA E IMPLICACION DE LAS SUBPOBLACIONES CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA EN SU ACTIVIDAD *IN VITRO*" ha sido realizada por Dña. Mónica Ballestero Téllez bajo nuestra supervisión, reuniendo todos los requisitos necesarios para su presentación mediante la modalidad de compendio de publicaciones.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 30 de septiembre de 2017.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Dr. D. Fernando Docobo Pérez





UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología

Dr. D. Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A FOSFOMICINA E IMPLICACION DE LAS SUBPOBLACIONES CON SENSIBILIDAD DISMINUIDA EN SU ACTIVIDAD *IN VITRO*” ha sido realizada por Dña. Mónica Ballesteró Téllez bajo mi tutela y es apta para ser presentada mediante la modalidad de compendio de publicaciones.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a 30 de septiembre de 2017.

Dr. D. Jerónimo Pachón Díaz



## **AGRADECIMIENTOS**

Después de mucho trabajo y esfuerzo, aquí está el resultado. Parece mentira que tantas horas de trabajo se puedan llegar a resumir en unas pocas hojas, ya que la satisfacción que supone finalizar un proyecto como este es enorme.

Primero de todo quisiera agradecer a mis tutores, Álvaro Pascual y Fernando Docobo, el haber apostado por mí. Gracias Álvaro por tener siempre tiempo para escucharme y un buen consejo que dar. Fernando, un gracias se queda corto. Siempre que te he necesitado has estado ahí para guiarme y explicarme las cosas una y otra vez, con tu infinita paciencia y una sonrisa, sabiendo como motivarme a seguir adelante.

Por supuesto, gracias a toda la gente de la Cátedra, Paula, Fran, Lara, María...trabajar con vosotros es un placer, y vuestra ayuda, incalculable. Tampoco olvidar a Rafa, por aguantar las charlas del "Equipo fosfo" todas las tardes en su despacho y, en vez de echarnos, unirse a nuestras discusiones siempre con algún comentario productivo.

Y qué decir de las residentes, Elena, Esther, Inés, Ana, Patricia...sabéis que todas vosotras sois más que simples compañeras de trabajo, porque si algo tiene una tesis, es que tantas horas trabajando juntas crea un vínculo que supera quilómetros.

Gracias a todos los adjuntos de mi servicio que entienden la carga de trabajo que supone la investigación y nos ayudan a compaginar la residencia con la tesis.

Y ente lo laboral y la familia está Mercedes, a la que no solo le tengo que agradecer su implicación en esta tesis, sino tantas cosas que una página se me quedaría corta.

Muchas gracias a mi familia, por entender que esto para mí es importante. Aunque haya supuesto un buen tiempo lejos de vosotros, siempre os he sentido muy cerca.

Y por último, muchas gracias a Xavi, mi marido, porque si hay alguien que siempre está dispuesto a apoyarme y a sacar lo mejor de mí, eres tú. Contigo a mi lado ningún reto es imposible.



## TESIS COMO COMPENDIO DE ARTÍCULOS PREVIAMENTE PUBLICADOS

Esta tesis, de acuerdo con el informe correspondiente y la autorización de los directores de la misma y del órgano responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de dos artículos. Las referencias completas a los artículos que componen el cuerpo de la tesis son las siguientes:

*Molecular insights into fosfomycin resistance in Escherichia coli.* Ballester-Téllez M, Docobo-Pérez F, Portillo-Calderón I, Rodríguez-Martínez JM, Racero L, Ramos-Guelfo MS, Blázquez J, Rodríguez-Baño J, Pascual A. J Antimicrob Chemother. 2017 Jan 15. pii: dkw573. doi: 10.1093/jac/dkw573. Factor de impacto: 5,071 (1<sup>er</sup> decil, JCR 2016).

*Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in Enterobacteriaceae.* Ballester-Téllez M, Docobo-Pérez F, Rodríguez-Martínez JM, Conejo MC, Ramos-Guelfo MS, Blázquez J, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clin Microbiol Infect. 2017 Jan 3. pii: S1198-743X(16)30654-1. doi: 10.1016/j.cmi.2016.12.022. Factor de impacto: 5,292 (1<sup>er</sup> decil, JCR 2016).



## ÍNDICE

Lista de acrónimos.....	3
1- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Resistencia bacteriana.....	7
1.2 La resistencia bacteriana como un problema de salud pública .....	8
1.3 Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana .....	12
1.3.1 Prevención de las infecciones y estrategias no antimicrobianas.....	12
1.3.2 Uso racional y optimizado de los antimicrobianos disponibles .....	13
1.3.3 Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos .....	13
1.3.4 Desarrollo nuevos antimicrobianos .....	14
1.4 Rescate de antimicrobianos en desuso frente a enterobacterias multirresistentes. ....	16
1.5 Fosfomicina .....	19
1.5.1 Historia .....	19
1.5.2 Características moleculares.....	19
1.5.3 Mecanismo de acción.....	20
1.5.4 Mecanismos de resistencia .....	22
1.5.5 Espectro de acción y epidemiología de la resistencia.....	30
1.6 Aparición de resistencias a fosfomicina <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	34
1.7 Uso clínico de fosfomicina.....	37
1.7.1 Papel de la fosfomicina frente a bacterias multirresistentes. ....	38
1.8 Estudios de sensibilidad. Técnicas y limitaciones. ....	41
1.8.1 Dilución en agar.....	41
1.8.2 Microdilución en caldo.....	43
1.8.3 Técnicas de difusión en agar .....	44
1.9 Puntos de corte de sensibilidad/resistencia. ....	47
1.9.1 Cepas salvajes y no salvajes: la resistencia microbiológica.....	47
1.9.2 Sensibilidad y resistencia clínica.....	49
1.9.3 Comités internacionales: EUCAST y CLSI.....	50
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1 Hipótesis.....	57
2.2 Objetivos del estudio .....	57

2.1.1 Objetivos principales .....	57
2.1.2 Objetivos secundarios .....	57
3. PUBLICACIONES.....	59
Primer artículo.....	61
Segundo artículo .....	69
4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....	76
4.1 Primer artículo.....	78
4.2 Segundo artículo .....	81
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	83
6. CONCLUSIONES .....	96
7. BIBLIOGRAFÍA.....	99

## LISTA DE ACRÓNIMOS

AEMPS: Agencia española del medicamento y productos sanitarios.

AMPc: AMP cíclico.

BGN: bacilos Gram-negativos.

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

C3G: cefalosporinas de tercera generación.

CCR: represión catabólica del carbono.

CDC: *Center for diseases control and prevention.*

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute.*

CMI: concentración mínima inhibitoria.

CRP: complejo receptor de AMPc.

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control.*

ECOFF: puntos de corte epidemiológicos.

EPC: enterobacterias productoras de carbapenemasas.

ESCMID: *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease.*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.*

VR: vancomicina resistentes.

FC: farmacocinética.

FD: farmacodinamia.

FDA: *Food and Drug Administration.*

G3P: glicerol 3-fosfato.

G6P: glucosa 6-fosfato.

IDSA: *Infectious Diseases Society of America.*

ITU: infecciones de origen urinario.

MDR: *multidrug resistant.*

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards.*

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PEP: fosfoenolpiruvato.

SARM: *S. aureus* resistente a metilina.

ufc: unidades formadoras de colonias.



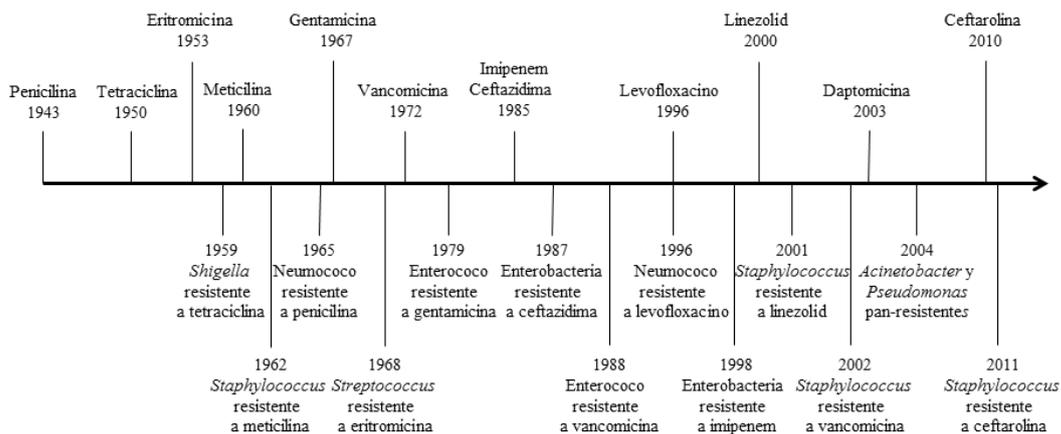
# 1- INTRODUCCIÓN



### 1.1 Resistencia bacteriana

Desde el descubrimiento en los años cuarenta del siglo pasado de la penicilina, los antibióticos han sido uno de los mayores avances en el campo de la salud, posibilitando la cura de numerosas enfermedades infecciosas. Ya en 1945, Alexander Fleming advirtió que disponer de ellos no aseguraba siempre el éxito terapéutico, puesto que los microorganismos rápidamente se adaptaban y se volvían resistentes a estos antimicrobianos<sup>1</sup>. La generación de resistencias es un fenómeno adaptativo natural propio de las bacterias, y ha ido repitiéndose a lo largo de la historia, de manera que, al poco tiempo de aparecer en el mercado un nuevo agente antimicrobiano, aparecían microorganismos resistentes al mismo. (Figura 1)

#### Descubrimiento de antibióticos



#### Aparición de resistencias

Figura 1: Línea del tiempo resumen en la que se muestra el año de descubrimiento de los antimicrobianos y el momento en el que se aíslan cepas resistentes al mismo.

A modo de ejemplo, en el momento en el que se empezó a utilizar la penicilina en la práctica clínica, la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, sin embargo, actualmente lo son menos del 5-10% de los aislados. De igual modo, cuando se introdujo en el mercado la cefotaxima a principios de la década de los ochenta, todas las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran sensibles,

mientras que en 2014 ya se encontraban unos porcentajes de resistencia del 13 y el 16%, respectivamente, en aislamientos de hemocultivos en España<sup>2</sup>.

La generación de resistencias se ve propiciada y amplificada por muchos factores, como el uso inadecuado de antimicrobianos en medicina y en veterinaria, su uso con finalidades no terapéuticas y la contaminación ambiental por antimicrobianos<sup>3,4</sup>.

Este cúmulo de factores ha llevado a la aparición y diseminación de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos simultáneamente. Se conocen con el nombre de microorganismos multirresistentes a aquellos que presentan resistencia a uno o más antimicrobianos de tres o más familias. Además, las cepas multirresistentes son capaces de diseminarse cuando no se toman medidas de prevención y control de las infecciones<sup>5</sup>. Hasta hace uno años, el problema de la resistencia antibiótica estaba principalmente localizado en el ámbito sanitario, ya que es donde se concentraba el mayor consumo de antimicrobianos y por lo tanto existía una mayor presión selectiva. Actualmente las bacterias resistentes se han extendido al ámbito comunitario, dificultando todavía más su control y posterior erradicación<sup>6</sup>.

Son pocas las opciones terapéuticas que quedan disponibles para tratar las infecciones causadas por estos microorganismos multirresistentes, y muchas veces no son óptimas, puesto que presentan mayor toxicidad, menor eficacia, escasa biodisponibilidad y en algunos casos un precio más elevado<sup>7,8</sup>. Estas infecciones además están asociadas a alta mortalidad<sup>9,10</sup>, estancia hospitalaria prolongada y elevado coste económico<sup>11</sup>. Por esta razón, no es sorprendente que recientemente se haya clasificado el problema de la resistencia antibiótica como una amenaza a la salud pública de primera magnitud<sup>12</sup>. La resistencia pone en peligro muchos de los logros de la medicina moderna que han ayudado a aumentar la esperanza de vida y no se pueden llevar a cabo sin antibioterapia, como es el caso de los trasplantes, cirugías complicadas o profilaxis.

## **1.2 La resistencia bacteriana como un problema de salud pública**

El aumento exponencial en los últimos años de patógenos multiresistentes se ha convertido en un problema de salud pública mundial. La situación es especialmente preocupante si nos fijamos en un tipo concreto de microorganismos, los bacilos Gram-

negativos (BGN). Es muy alarmante la velocidad con la que han evolucionado las resistencias en estas bacterias a antimicrobianos como las fluoroquinolonas, las cefalosporinas y los carbapenémicos así como su diseminación a través de todo el mundo en las últimas décadas<sup>13</sup>. Ya en 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe titulado *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*<sup>14</sup> donde se hacía especial hincapié en la problemática de las resistencias antibióticas a la hora de tratar infecciones graves. Este problema ha ido más allá, y este año la misma organización ha publicado una lista de “patógenos prioritarios” para los que necesitamos desarrollar nuevos antimicrobianos puesto que se han agotado las opciones terapéuticas debido a la multirresistencia<sup>12</sup>.

El uso y abuso de los antimicrobianos claramente conduce a la aparición de resistencias. Los microorganismos evolucionan generando o seleccionando mecanismos de resistencia que les permiten sobrevivir en presencia de los antibióticos<sup>15</sup>. Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación directa entre el consumo de antimicrobianos y la emergencia y diseminación de cepas resistentes<sup>16</sup>. En las bacterias, los genes que codifican para estos mecanismos de resistencia pueden ser heredados de una cepa parenteral o pueden ser adquiridos desde cepas no relacionadas mediante elementos genéticos móviles como integrones, transposones o plásmidos. Esta transferencia horizontal hace posible que la resistencia se transmita entre bacterias de diferentes especies<sup>15</sup>.

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de ADN circular presentes en bacterias, que se replican independientemente del genoma del huésped. Es el mecanismo de transferencia horizontal más común y ha sido fundamental para el reciente y rápido aumento de la resistencia a los antimicrobianos<sup>16</sup>.

En este sentido, los clones bacterianos llamados “exitosos” son una poderosa fuente de propagación de estos componentes genéticos que codifican para mecanismos de resistencia<sup>13</sup>. Estos clones son capaces de proporcionar plataformas estables para el mantenimiento y propagación de genes de resistencia y han jugado un papel esencial en la diseminación global la multirresistencia en microorganismos Gram-negativos, especialmente *Enterobacteriaceae*<sup>17</sup>.

El aumento de las infecciones causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* multirresistentes (incluyendo aislamientos resistentes a las fluoroquinolonas, cefalosporinas y

carbapenemas) se deben en gran parte a la diseminación global de ciertos clones de exitosos, como *E. coli* de tipo 131 (ST131) y *K. pneumoniae* ST258. Las razones para el éxito particular de estos clones exitosos y su asociación con ciertos plásmidos de resistencia son inciertas. Sin embargo, su capacidad de propagación rápida es indiscutible<sup>13</sup>.

La terapia antibiótica con  $\beta$ -lactámicos como las cefalosporinas se considera uno de los tratamientos elegidos para infecciones graves debidas a *Klebsiella* spp. y *E. coli*. Sin embargo, durante los últimos 6 años han aumentado rápidamente la cantidad de aislados de estas especies resistentes a cefalosporinas<sup>9</sup>. Las enzimas  $\beta$ -lactamasas son la causa más común de resistencia a diversos agentes  $\beta$ -lactámicos. Si tenemos en cuenta el problema de la diseminación de resistencias, son de principal interés aquellas enzimas que tengan codificación plasmídica, así como aquellas que tengan actividad contra un mayor espectro de  $\beta$ -lactámicos. Se conoce como " $\beta$ -lactamasas de espectro expandido" a aquellas enzimas con actividad contra las cefalosporinas con cadenas laterales oximiino y/o a las carbapenemas<sup>13</sup>. Estas enzimas consisten en las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos (por ejemplo, los tipos CMY), las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido clase A (BLEE) (por ejemplo, los tipos CTX-M, SHV y TEM) y las carbapenemasas (por ejemplo, los tipos KPC, las MBL, como los tipos VIM, IPM y NDM y las oxacilinasas, como por ejemplo, las enzimas tipo OXA-48)<sup>13</sup>. La producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido causa resistencia a varios  $\beta$ -lactámicos. Además, las *Enterobacteriaceae* portadoras de este tipo de estas enzimas, a menudo, son resistentes a otras clases de antimicrobianos, como las quinolonas o los aminoglucósidos<sup>10</sup>. El tipo global más común de BLEE es las  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M, mientras que OXA-48, KPC y NDM, son las carbapenemas más frecuentes entre los aislados nosocomiales y comunitarios de *Enterobacteriaceae*<sup>20</sup>.

En el informe sobre la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos llevado a cabo por el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) en 2014, se describió un porcentaje global de aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas del 7,3% en Europa, con variaciones entre países que iban desde el 0% al 62,3%, con una mayor propensión en la zona del Mediterráneo<sup>3</sup>. Las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) se han diseminado a nivel mundial debido un cúmulo de factores, como el aumento masivo del comercio y los movimientos humanos como

consecuencia de la globalización, permitiendo que la multirresistencia a fármacos se propague rápidamente y convirtiéndola en un problema que traspasa las fronteras de cualquier nación<sup>21,22</sup>.

Es el caso de *K. pneumoniae* productora de KPC. Desde su primer aislamiento en Estados Unidos se ha diseminado por todo el mundo, causando brotes en Europa, y llegando a convertirse en resistencia endémica por ejemplo en países como Grecia e Italia<sup>23</sup>. En España, se caracterizó un brote de KPC en Andalucía que tuvo como origen una paciente trasladada desde un hospital Italiano, que afectó a más de 28 pacientes hasta la fecha del estudio y que en la actualidad continúa activo<sup>24</sup>.

Lo mismo sucede con *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de NDM. A pesar de ser el subcontinente indio el lugar donde más aislamientos se han descrito se han encontrado aislados en los últimos años en Estados Unidos y Europa<sup>11</sup>.

Finalmente, la presencia de enzimas OXA-48 es más prevalente en toda la cuenca del Mediterráneo, aunque ya se han dado casos en zonas más al norte de Europa como Países Bajos y Bélgica<sup>25,26</sup>, y brotes en países del sureste asiático como es el caso de la India<sup>27</sup>.

Pero no solamente la resistencia a carbapenémicos es un problema, sino que la resistencia combinada de cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos ha experimentado, según los últimos informes aportados por la Red Europea de vigilancia de la resistencia antibiótica (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*), un claro aumento entre los años 2012 y 2015, especialmente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*<sup>28</sup>.

Debido a todo lo anteriormente expuesto, se pone de manifiesto que el aumento progresivo de la resistencia a antimicrobianos constituye un problema sanitario de primera magnitud. En este sentido, se estima en 700.000 muertes anuales la cifra actual de mortalidad atribuible a la resistencia antimicrobiana a nivel mundial<sup>6</sup>. Pero el dato más alarmante es la previsión para los próximos años, ya que esta cifra seguirá creciendo hasta alcanzar los 10 millones de personas en el año 2050 si no se establecemos estrategias eficaces de carácter internacional para evitarlo<sup>6</sup>.

### 1.3 Estrategias para la lucha contra la resistencia antimicrobiana

Una gran parte de los avances médicos de las últimas siete décadas ha sido debida al descubrimiento y uso de los antimicrobianos, tanto para tratamiento como en profilaxis. Sin embargo, con la aparición y diseminación de microorganismos resistentes, su utilidad se está viendo amenazada.

Son muchas las organizaciones que han propuesto medidas para intentar controlar la aparición y diseminación de las resistencias como por ejemplo la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>29</sup>, el *Centers for diseases control and prevention* (CDC)<sup>30</sup> o el *European centre for disease prevention and control* (ECDC)<sup>31</sup>. Durante los últimos años también se han ido generando programas nacionales e internacionales con el fin de tratar de controlar la resistencia antimicrobiana<sup>32-34</sup>. La mayoría de estos programas coinciden en las estrategias principales:

#### 1.3.1 Prevención de las infecciones y estrategias no antimicrobianas

La selección de resistencias es un mecanismo evolutivo que se ve potenciado en el momento en el que se ponen en contacto las bacterias con cualquier antibiótico. Por ello, todas las medidas que conduzcan a una vigilancia y control adecuado de las infecciones favorecerán un menor uso de antimicrobianos. De esta manera reduciríamos en cierta medida la presión selectiva a la que se ven sometidas las bacterias<sup>35</sup>.

Otro método mucho más sencillo, pero más eficaz si cabe para evitar la propagación de las enfermedades, es la limpieza. Un punto clave para prevenir epidemias es el contar con un buen sistema de gestión de los residuos urbanos así como educar a la población en medidas de higiene básicas<sup>36,37</sup>. En este sentido, el lavado de manos ha demostrado ampliamente ser una de las estrategias más eficaces en la disminución de transmisión de infecciones, sobre todo en el ámbito hospitalario, así como también el aislamiento de pacientes infectados/colonizados<sup>38-40</sup>.

También son relevantes las estrategias no antimicrobianas, como por ejemplo el uso de vacunas, inmunoglobulinas, activadores de la inmunidad, terapia con fagos o la reversión de la resistencia<sup>41</sup>.

### *1.3.2 Uso racional y optimizado de los antimicrobianos disponibles*

El uso innecesario o inadecuado de antimicrobianos ha conducido al aumento de la resistencia antimicrobiana. Para evitar esta circunstancia y proteger nuestro arsenal terapéutico, es necesario mejorar el uso de los antimicrobianos para que además de lograr la curación del paciente tenga el menor impacto sobre la resistencia.

En ese sentido, muchas instituciones y hospitales han puesto en marcha programas de uso adecuado de antimicrobianos (Programas PROA) para optimizar las terapias, reducir los costes relacionados con las infecciones y las estancias hospitalarias derivadas de estas, así como mejorar la seguridad de los tratamientos y reducir o estabilizar la aparición de resistencias<sup>42</sup>. La puesta en marcha en los hospitales de equipos PROA y equipos de control de IRAs (infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria) ha supuesto un gran avance en el control de las resistencias antimicrobianas. Estos equipos han de ser multidisciplinarios y contar con médicos expertos en enfermedades infecciosas, farmacéuticos, microbiólogos, epidemiólogos, enfermeros y otros especialistas de áreas afectadas<sup>43,44</sup>.

Son muchos los estudios que han demostrado la utilidad y eficacia de este tipo de equipos para restringir la emergencia y la diseminación de las resistencias en el ámbito hospitalario y su trabajo es de máxima importancia ya que es justamente en los hospitales donde el problema de la resistencia a antimicrobianos se magnifica y tiene consecuencias más trágicas<sup>45,46</sup>.

### *1.3.3 Reducir el uso de agentes antimicrobianos con fines no terapéuticos*

Desde su descubrimiento, los antimicrobianos también se han utilizado en el campo de la veterinaria. A pesar de que existen agentes antimicrobianos diseñados exclusivamente para uso veterinario, la mayoría de las veces se utilizan los mismos principios activos o derivados similares a los usados para el tratamiento en humanos<sup>47</sup>.

Los antimicrobianos en veterinaria no solamente se utilizan con fines terapéuticos, sino que gran parte de ellos se usan como suplemento en su alimentación para promover el crecimiento o como profilaxis<sup>48</sup>. Está ampliamente demostrado que este tipo de prácticas ponen en peligro alternativas terapéuticas útiles para infecciones en humanos, por lo que estas se encuentran prohibidas en Europa. A pesar de ello, se ha descrito la presencia de enterobacterias productoras de BLEE, EPC y *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina en piensos y derivados cárnicos<sup>49,50</sup>.

En algunos países, la producción a gran escala de marisco y pescado en piscifactorías también utiliza los agentes antimicrobianos para acelerar el crecimiento de sus productos por lo que de igual manera se han de tener en cuenta como foco de origen de cepas multirresistentes<sup>51</sup>.

Una de las regiones donde es más visible el problema de la aparición de cepas multirresistentes es el sudeste asiático. En una revisión sobre el uso de antimicrobianos y la aparición de resistencias realizado en esa región se muestra que la prevalencia de microorganismo multirresistentes es mayor en aislados procedentes de ganado porcino, y que va en aumento año tras año<sup>52</sup>. En las últimas décadas esa zona se ha consolidado como un gran exportador de todo tipo de alimentos, por lo tanto, se trata de un problema que puede acabar atravesando fronteras.

De manera global, se están poniendo en marcha iniciativas para disminuir el uso de antimicrobianos necesarios para el tratamiento en humanos en ganado. Por ejemplo, en Países Bajos se ha puesto en marcha un programa denominado RESET con el fin de reducir el uso de antimicrobianos en ganado lechero aplicando un conjunto de medidas que abarcan tanto la formación como la creación de normativa e instituciones reguladoras, dando muy buenos resultados<sup>53</sup>.

#### 1.3.4 Desarrollo nuevos antimicrobianos

La rapidez con la que se diseminan los mecanismos de resistencia, la presión para reducir el uso de antimicrobianos, los escasos incentivos del mercado, y los elevados costes para licitar y fabricar nuevos antimicrobianos han disuadido a los inversores en este ámbito, por lo cual actualmente hay pocos antimicrobianos nuevos en fase de estudio<sup>54</sup>.

A pesar de ser conscientes de la emergencia de microorganismos multirresistentes, en los últimos años el número de antimicrobianos nuevos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) se ha reducido notablemente comparándolo con el de finales del siglo XX<sup>55</sup>. Este hecho hizo que múltiples sociedades científicas se coordinaran para plantear el problema de la disponibilidad de antimicrobianos y aparecieran programas como la iniciativa 10x20 de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), que propone desarrollar 10 antimicrobianos nuevos antes del año 2020. Entre enero de 2010 y diciembre de 2015, ocho nuevos antimicrobianos han sido aprobados por la FDA: ceftarolina, fidaxomicina, bedaquilina, dalbavancina, tedizolid, oritavancina, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam<sup>7</sup>.

En noviembre de 2011, la Comisión Europea inició un programa denominado IMI "*Innovative Medicines Initiative*" destinado a mejorar la eficiencia de la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos mediante un intercambio de conocimientos abiertos<sup>56</sup>. El resultado fue el programa "*New Drugs 4 Bad Bugs* (ND4BB)". El programa abarca siete proyectos que engloba todos los aspectos del desarrollo de antimicrobianos, incluyendo investigación sobre mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (TRANSLOCATION), descubrimiento de fármacos (ENABLE), desarrollo de fármacos (COMBACTE, COMBACTE-CARE, COMBACTE-MAGNET e iABC), economía y vigilancia (DRIVE-AB). Por otro lado, en septiembre de 2012, el Centro de Evaluación e Investigación de Drogas de la FDA anunció también el establecimiento de un grupo de trabajo multidisciplinario centrado en el desarrollo de fármacos antibacterianos. Desde su inicio, el grupo de trabajo promueve el desarrollo de fármacos antibacterianos además de proporcionar orientación y apoyo actuando como nexo de comunicación entre las necesidades clínicas y la industria farmacéutica<sup>57</sup>.

Pero la velocidad a la que aparecen nuevos antimicrobianos se ve ampliamente superada por la de generación de resistencias por parte de los microorganismos. Prueba de ello, es que ya se han detectado cepas resistentes a ceftazidima-avibactam y con CMI incrementadas a dalbavancina, antimicrobianos que llevan muy poco tiempo disponibles en el mercado<sup>58,59</sup>.

Con el fin de dar visibilidad a este problema, el 27 de febrero de este año la OMS publicó por primera vez un listado de los principales patógenos multirresistentes a tener en cuenta con el objetivo de guiar y promover la investigación y desarrollo de

nuevas drogas que nos ayude a combatir el problema global de la multirresistencia<sup>60</sup>. Entre ellas destacan los BGN multirresistentes: Enterobacterias productoras de BLEE o carbapenemasas, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos.

#### **1.4 Rescate de antimicrobianos en desuso frente a enterobacterias multirresistentes.**

Aunque el desarrollo de nuevos antimicrobianos frente a microorganismos multirresistentes se ha ralentizado en las últimas décadas, se dispone de antimicrobianos denominados “antiguos”, que fueron desarrollados hace décadas y que por diferentes razones dejaron de utilizarse que aún pueden ser de gran utilidad frente a la multirresistencia bacteriana.

La pérdida del interés por estas drogas es debida a diversos factores, algunos de ellos específicos de cada fármaco. Lo que es común para todos ellos es que en un momento determinado dejaron de ser antimicrobianos de primera línea para el tratamiento, y eso hizo que se dejaran de prescribir, derivando en su retirada del mercado en muchos países. Como consecuencia de este desuso muchas bacterias multirresistentes siguen siendo sensibles a éstos<sup>61,62</sup>.

En la mayoría de países europeos y en Estados Unidos no se dispone de todo el repertorio de antimicrobianos “antiguos” completo. Por ejemplo, la formulación intravenosa de la minociclina, uno de los agentes con mayor actividad frente a BGNs multirresistentes, se hubo de reintroducir en el mercado americano en 2009 como parte de un programa internacional de recuperación de antimicrobianos antiguos para combatir a los microorganismos multirresistentes<sup>63</sup>

Muchos de estos antimicrobianos “antiguos” poseen un amplio espectro de acción, precios económicos y carecen de restricciones de uso<sup>64</sup>. A pesar de ello, no se pueden utilizar basándose solamente en su espectro de sensibilidad, sino que se requiere conocer otros parámetros farmacológicos igualmente importantes para asegurar el éxito de la antibioterapia, que no se llegaron a investigar en profundidad durante el desarrollo de los mismos. Entre estos factores destacan parámetros de

farmacodinamia (FD) y farmacocinética (FC) o las interacciones que puedan tener con otros medicamentos.

Para solventar muchos de estos vacíos de conocimiento, se necesitan ensayos clínicos bien diseñados que nos proporcionen información veraz, aunque son pocos los estudios que se llevan a cabo para optimizar estos antimicrobianos “antiguos”, ya que, al no ser rentables para la industria farmacéutica, la mayoría han de ser financiados con fondos públicos. Un ejemplo de ello es el proyecto AIDA creado en el 2011 con financiación de la Unión Europea. Este proyecto tiene como objetivo principal responder a la cuestión de la eficacia clínica y la dosificación óptima de cinco antimicrobianos “antiguos” (colistina, fosfomicina, nitrofurantoína, minociclina y rifampicina) estudiando aspectos tan importantes como regímenes de dosificación, eficacia microbiológica, FC/FD así como de toxicidad y aparición de resistencia<sup>65</sup>.

Pero no es solamente para el tratamiento de infecciones complicadas donde estos antimicrobianos “antiguos” pueden ser eficaces, sino que disponen incluso de una mayor utilidad para el tratamiento en atención primaria, donde la resistencia también es un problema creciente y además la utilización de fármacos por vía parenteral se ve restringida. Un ejemplo de ello es el tratamiento de infecciones de origen urinario (ITU) causadas por microorganismos productores de BLEE o resistentes a quinolonas que afectan principalmente a mujeres que no requieren hospitalización para el tratamiento de la cistitis o el tratamiento de la bacteriuria asintomática por estos microorganismos en embarazadas. Antimicrobianos como nitrofurantoina, fosfomicina o mecilinam han demostrado ser de mucha utilidad en estos casos. En la siguiente tabla se resumen otros posibles usos para estos antimicrobianos<sup>66</sup>.

Bacteria	Settings and clinical scenarios	Potentially useful old antibiotic (susceptibility ranges reported in contemporary literature)
Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)	Healthcare-associated and hospital-acquired infections, including bacteraemia, pneumonia and other severe infections	Polymyxins (colistin/polymyxin B) (50–100%) i.v. fosfomicin (39–100%) Temocillin (3–91% of KPC-producers)
Carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Aminoglycosides (locally variable) Polymyxins (colistin/polymyxin B) (98–99.4%) i.v. fosfomicin (30–80%)
Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> (CRAB)		Aminoglycosides (locally variable) Polymyxins (colistin/polymyxin B) (92–100%) i.v. minocycline (68–79%) SXT (locally variable)
ESBL-producing Enterobacteriaceae	Outpatients: mainly uncomplicated UTIs (cystitis), asymptomatic bacteriuria in pregnancy and prostatitis	Aminoglycosides (15–57%) Nitrofurantoin (40–96%)
	Inpatients, carbapenem-sparing regimens for complicated UTIs, pneumonia and other infections	Oral fosfomicin (15–97%) Pivmecillinam (93–100%) i.v. fosfomicin (83–97%) Temocillin (76–87%)
MRSA	Initial treatment or step-down to oral treatment for several infections mainly SSTIs	Mecillinam (93–100%) Aminoglycosides (locally variable) Minocycline (97–100%) Fusidic acid (93–98.2%)
VRE	Healthcare-associated and hospital-acquired infections, as glycopeptide-sparing agents or for polymicrobial infections involving enterococci or Gram-negatives and MRSA Healthcare-associated and hospital-acquired infections, including bacteraemia, pneumonia and abdominal infections	SXT (0–99%, locally variable) i.v. fosfomicin (33–100%) Chloramphenicol (52–87%) i.v. fosfomicin (33–100%) SXT (0–99%, locally variable) Chloramphenicol (80%) i.v. fosfomicin (30–100%)

i.v., intravenous; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; UTI, urinary tract infection; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; SSTI, skin and soft-tissue infection; VRE, vancomycin-resistant enterococci.

Tabla 1: Microorganismos multirresistentes y situaciones clínicas para los cuales la utilización de antibióticos “antiguos” es potencialmente útil<sup>66</sup>

## 1.5 Fosfomicina

### 1.5.1 Historia

Fosfomicina, conocida antiguamente como fosfonomycin, es un antibiótico natural que data del año 1969<sup>67</sup>. Es el primer antibiótico de descubrimiento español, ya que se aisló inicialmente de una cepa del hongo *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096) procedente de una muestra de tierra tomada en Alicante en 1966<sup>68</sup>. Su descubrimiento se enmarca en el curso de un programa de investigación de nuevos antibióticos realizado por las compañías Merck & Co Inc. y la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos. Posteriormente, también se ha logrado aislar de otras especies como *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces wedmorensis*, *Pseudomonas viridiflava* y de *Penicillium* sp<sup>69,70</sup>. En la actualidad se produce de manera exclusiva por síntesis química. Su comercialización se inició en su forma de sal cálcica para la administración oral, y como sal sódica para su uso intravenoso.

Se ha utilizado en algunos países para el tratamiento de la infección urinaria desde su descubrimiento, pero se ha vuelto mucho más popular desde que en 2011 la guía IDSA y la *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease* (ESCMID) actualizaran sus recomendaciones para el tratamiento de esta infección colocando a este antimicrobiano como el agente de primera elección para el tratamiento de la infección urinaria no complicada causada por enterobacterias<sup>71</sup>.

Fosfomicina también está disponible para su uso en veterinaria desde hace más de 40 años, pero su uso en Europa es muy escaso, siendo más común en países de centro y Sudamérica<sup>72</sup>.

### 1.5.2 Características moleculares

La fosfomicina es un análogo del fosfoenolpiruvato (PEP). La molécula es sencilla e hidrosoluble, con un peso molecular de 138 Da, uno de los más bajos en lo que a antimicrobianos se refiere. Sólo consta de tres átomos de carbono, uno de ellos unido al de fósforo sin puente de oxígeno intermedio. Su actividad antibacteriana se debe a su enlace epoxi. La molécula es estable en un intervalo de pH de 4 a 11, con una actividad óptima a pH 6,2. La sustitución de los dos átomos de hidrógeno del radical

fosfórico por otros de sodio o de calcio da lugar a las sales disódica, para su uso parenteral, o a la sal cálcica, para su uso oral. Una formulación galénica posterior une la molécula a una base orgánica (tris-hidroximetil-aminometano) para aumentar su biodisponibilidad, dando lugar al trometamol o trometamina<sup>73</sup>.(Figura 4)

No pertenece a ninguna familia de antimicrobianos puesto que no está relacionado químicamente con ningún de ellos.

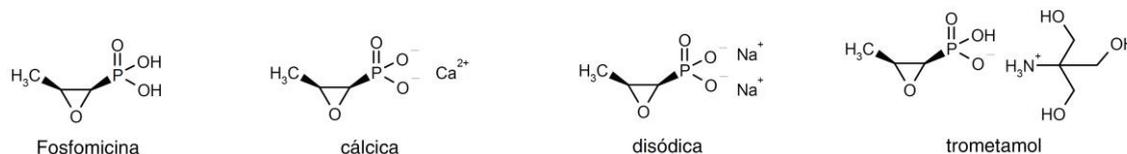


Figura 4: Formulación de la fosfomicina (ácido (-)-*cis*-1,2-epoxi-propil-fosfónico) y sus formulaciones (cálcica, disódica y trometamol)<sup>73</sup>

### 1.5.3 Mecanismo de acción

La fosfomicina es un antibiótico bactericida que inhibe el paso inicial de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular en procariortras. Se une a la enzima UDP-*N*-acetilglucosamina-3-*O*-enolpiruvil transferasa (MurA), mediante competición con su sustrato, el fosfoenolpiruvato (PEP). Esta enzima es la encargada de catalizar la primera etapa de la biosíntesis del heteropolímero de peptidoglicano en el paso previo a la incorporación de PEP a la uridin-difosfo-*N*-acetilglucosamina (UDP-NacGlu) para originar el ácido uridin-difosfo-*N*-acetilmurámico <sup>74</sup>. Fosfomicina se une covalentemente con el centro activo de MurA mediante un enlace tioéter con el residuo de cisteína 115 (Cys115)<sup>75-77</sup>. La cristalización de MurA de *E. coli* unida a UDP-NacGlu y a fosfomicina reveló que la molécula se une a Cys115 formando interacciones electrostáticas estrechas entre los tres residuos conservados de MurA (Lys22, Arg120 y Arg397) y el grupo fosfonato del antibiótico<sup>78,79</sup>. (Figura 5)

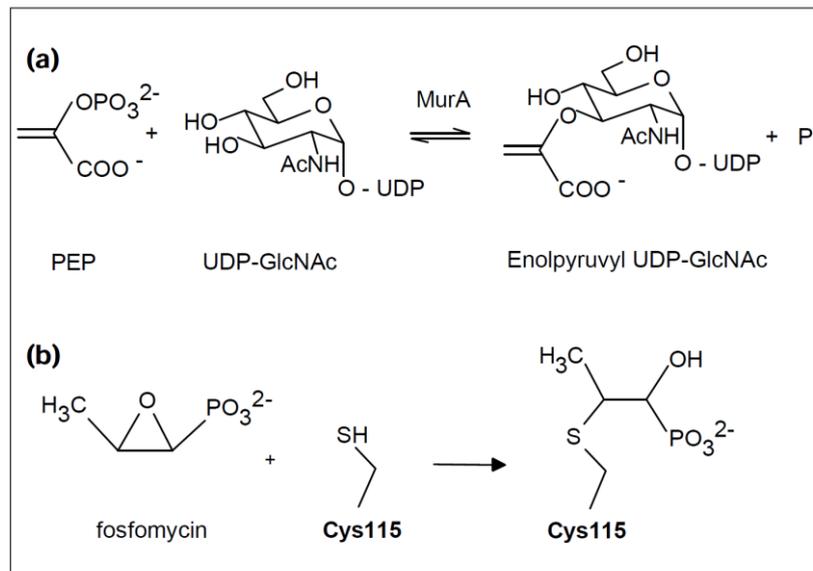


Figura 5: a) Reacción catalizada por MurA. b) Reacción entre fosfomicina y el residuo Cys115 de MurA, la cual produce una inactivación de la enzima<sup>78</sup>.

Pero para poder realizar su acción, la fosfomicina previamente ha de llegar al citoplasma de la bacteria, ya que es allí donde se localiza MurA. Se han descrito dos proteínas transportadoras de membrana del tipo *major facilitator superfamily* capaces de introducir el antimicrobiano dentro de la bacteria: un transportador de L-alfa-glicerol (GlpT) y uno de hexosas-6-fosfato (UhpT)<sup>80</sup>. GlpT es el transportador principal de glicerol 3-fosfato (G3P) en *E. coli*.<sup>81</sup> (Figura 6)

La expresión de los genes de ambos transportadores necesita de la presencia de AMP cíclico (AMPc) así como del complejo receptor de AMPc (CRP)<sup>82</sup> junto con un complejo sistema de regulación que será explicado más detalladamente a continuación.

El antibiótico actúa sobre las bacterias en su fase de crecimiento ya que es en ese momento cuando se sintetiza la pared y no interfiere en las reacciones que requieren PEP de las células eucariotas<sup>73</sup>.

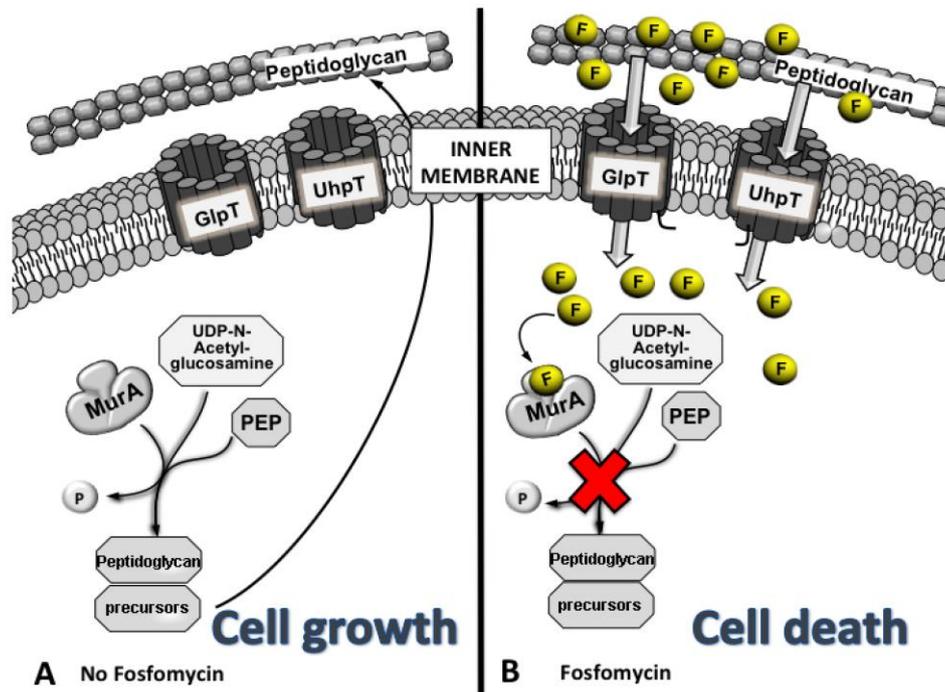


Figura 6: A) Representación del mecanismo de acción de MurA en la formación del peptidoglicano de membrana durante el crecimiento bacteriano. B) Fosfomicina (F) entra en la bacteria a través de cualquiera de los transportadores (GlpT y/o UhpT) y se une a MurA, bloqueando su actividad<sup>82</sup>.

#### 1.5.4 Mecanismos de resistencia

##### 1.5.4.1 Resistencia intrínseca a fosfomicina

Existen algunas bacterias que son intrínsecamente resistentes a fosfomicina. Hasta la fecha, se han descrito principalmente dos mecanismos. El primero es un cambio aminoacídico en MurA que afecta a la cisteína a la que se une el antibiótico (Cys115) por un aspartato. Esta mutación genera una proteína completamente funcional, pero insensible al antibiótico. Algunas bacterias que presentan esta secuencia son *Chlamydia spp*<sup>83</sup>, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio fischeri*<sup>84,85</sup>.

El segundo mecanismo es la utilización de manera natural de una vía de reciclaje del peptidoglicano en vez de su creación *de novo* (en la que interviene MurA). De esta manera, la diana de fosfomicina no interviene en la síntesis de la pared y por lo tanto

estas bacterias presentan una resistencia inherente al antibiótico<sup>86</sup>. Esta ruta de síntesis de peptidoglicano se ha descrito en *Pseudomonas putida*<sup>87</sup>.

#### 1.5.4.2 Genes cromosómicos relacionados con la resistencia a fosfomicina

La adquisición de resistencias a fosfomicina se podría obtener teóricamente con cualquier mutación que dificulte la unión del antibiótico con su diana. Esto se puede conseguir evitando o reduciendo la entrada de este en la bacteria o modificando su estructura para que reduzca su afinidad por MurA<sup>82</sup>.

#### Reducción de la permeabilidad a fosfomicina

Los mecanismos clásicamente relacionados con la resistencia a fosfomicina son las alteraciones de sus transportadores, UhpT y GlpT<sup>74,88</sup>.

GlpT es un transportador que incorpora glicerol 3-fosfato (G3P), mientras que UhpT incorpora hexosas-fosfato como la manosa 6-fosfato<sup>89</sup>, glucosa 6-fosfato (G6P), fructosa 6-fosfato y L-gliceraldehído 3-fosfato<sup>80,90</sup>.

Ambos transportadores pertenecen al grupo de las *major facilitator superfamily*, y son transportadores de membrana que a la vez que incorporan sus sustratos, expulsan un fosfato inorgánico fuera de la bacteria<sup>81,91</sup>. La expresión de ambos transportadores es inducida por sus sustratos y requiere la presencia del complejo AMPc-CRP.

Múltiples estudios demuestran que cepas con sensibilidad reducida a fosfomicina no son capaces de crecer en medios con una sola fuente de carbono (G3P en el caso de cepas deficientes en el transportador GlpT y hexosas como G6P en aquellas deficientes en UhpT)<sup>92</sup>

Además, se ha observado que la adición de G6P al medio en el que se realiza el antibiograma induce sensibilidad en cepas resistentes deficientes en GlpT, ya que se induce un aumento en la transcripción del otro transportador de fosfomicina (UhpT)<sup>93</sup>. Este sesgo estará siempre presente a la hora de interpretar los resultados de sensibilidad a este antibiótico ya que la adición de G6P es obligatoria si se siguen los protocolos estandarizados de las técnicas de sensibilidad<sup>94,95</sup>

En *E. coli* podemos encontrar ambos transportadores participando en la incorporación de fosfomicina al citoplasma celular, pero en el caso, por ejemplo, de *P. aeruginosa*

únicamente se encuentra presente la permeasa GlpT, produciéndose resistencia a fosfomicina con solamente la inactivación de este transportador<sup>96</sup>.

El mejor ejemplo de la importancia de estas permeasas en la resistencia a fosfomicina es el paradigma de *Listeria monocytogenes*. Esta especie es incapaz de incorporar el antibiótico *in vitro* y en consecuencia es resistente. Sin embargo, *in vivo*, el regulador central de virulencia PrfA induce el factor de virulencia Hpt, una permeasa de G6P que también puede ser utilizada por fosfomicina para entrar en la bacteria, sensibilizándola a fosfomicina<sup>97</sup>.

Pero no únicamente la presencia o ausencia de los transportadores afectan a la resistencia a fosfomicina. Ambas permeasas están bajo un complejo sistema de regulación en el que intervienen numerosas proteínas, muchas de ellas implicadas también en procesos relacionados con el metabolismo de azúcares de la bacteria.

### Regulación del sistema GlpT

La estructura de GlpT de *E. coli* presenta dos dominios conectados por un largo bucle central en el que encontramos el agujero para la translocación del sustrato<sup>98,99</sup>. La parte transmembrana de transportador está constituida por 12  $\alpha$ -hélices con una estructura muy conservada entre todas las permeasas de G3P<sup>100</sup>. La unión de fosfomicina a GlpT ha sido caracterizada en proteoliposomas por Santoro y colaboradores, mostrando como la droga compete por el sitio de unión del sustrato natural de GlpT y una vez unida es transportada al interior de la membrana<sup>101</sup>. (Figura 7)

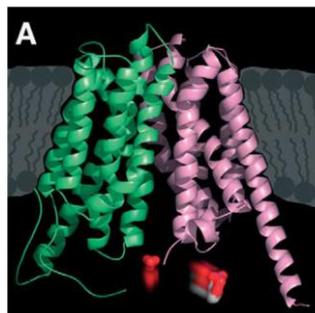


Figura 7: A) Estructura de GlpT, representación en lazos: dominio N-terminal de la proteína coloreado en verde y el C-terminal en rosa. Se representa una molécula de G3P saliendo al espacio citoplasmático y una molécula de fosfato inorgánico entrando al poro del transportador<sup>99</sup>.

Debido a la importancia del G3P para el metabolismo de las bacterias, su transporte a través de la membrana interna de las procariotas está fuertemente regulado por varios mecanismos, muchos de ellos con funciones redundantes. El primer punto de control es el regulón *glpT*, formado por 5 operones, el cual controla el ratio glicerol/G3P<sup>102</sup>. El gen *glpT* está situado dentro de uno de estos operones (*glpCBATQ*). La transcripción del gen *glpT* está reprimida por el represor GlpR (codificado en el operón *glpEGR*). GlpR es capaz de unirse cerca del promotor de *glpT*, inhibiendo su transcripción. Mutaciones en *glpR* hacen que aumente la transcripción del transportador<sup>99,102</sup>.

En *E. coli*, la expresión de GlpT está inducida por G3P en condiciones aerobias y requiere del complejo CRP-AMPC, mientras que en anaerobiosis se reprime por la presencia de nitratos, glucosa y la mutación en *fnr*<sup>103,104</sup>.

De manera indirecta, también se ha comprobado que los productos finales de la biosíntesis de lípidos y de la glicolisis participan en la regulación de *glpT* inhibiendo su transcripción<sup>105</sup>, así como los niveles de fosfato inorgánico<sup>106</sup>.

### Regulación del sistema UhpT

UhpT es un transportador de hexosas fosfato responsable de la entrada de G6P. Las cepas resistentes a fosfomicina, incapaces de crecer en medios definidos con G6P como única fuente de carbono, portan mutaciones de pérdida de función en los genes que activan al transportador o en el propio transportador *uhpT*<sup>107,108</sup>.

De igual modo que el transportador GlpT, UhpT es un monómero con doce hélices alfa en su dominio transmembrana<sup>109</sup>. En la regulación de la expresión de *uhpT* interviene un sistema de dos componentes (*uhpB* y *uhpC*) y una kinasa (*uhpA*). Por lo tanto, la inactivación de cualquiera de estos genes provoca la no expresión del transportador, y por lo tanto, disminución de la internalización de fosfomicina<sup>107</sup>. UhpC es una proteína integral de membrana capaz de detectar la G6P en el medio y activar UhpB, una proteína histidina-kinasa que forma parte de un sistema de dos componentes junto con UhpA. UhpB, mediante un sistema His-a-Asp fosforil-transferasa, añade un fosfato a UhpA. Una vez fosforilado, UhpA es capaz de unirse al promotor de UhpT, promoviendo la transcripción del transportador<sup>82,110,111</sup>.

Además, la represión catabólica de la bacteria, a través del complejo CRP-AMPC también regula positivamente la transcripción de UhpT<sup>112,113</sup>. (Figura 8)

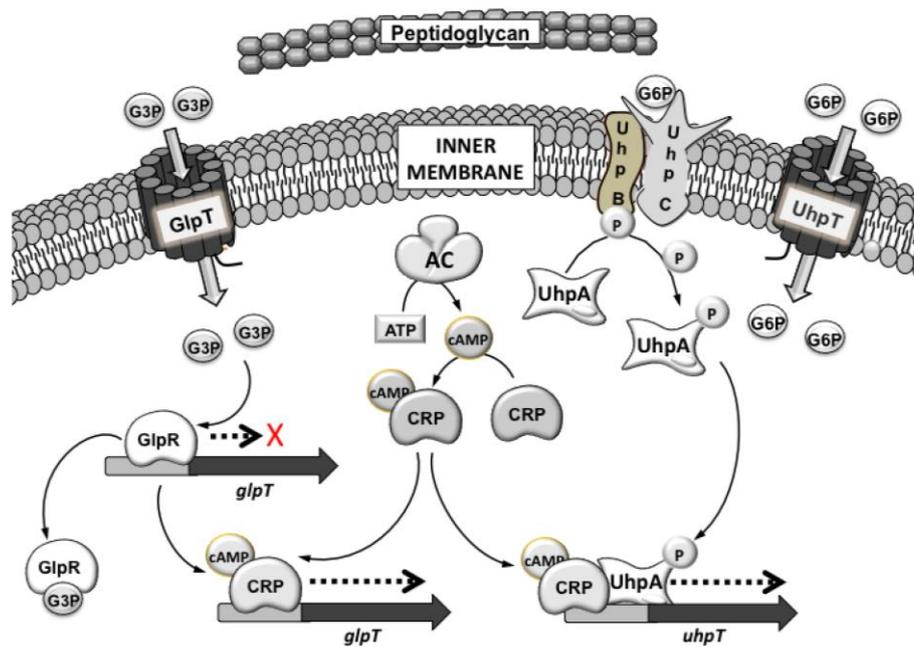


Figura 8: Representación esquemática del funcionamiento y la regulación de los dos sistemas de transporte de fosfomicina (GlpT y UhpT)<sup>82</sup>

### Papel del AMPc en la regulación de los transportadores GlpT y UhpT.

Como hemos visto en los apartados anteriores, los niveles de AMPc son importantes en la regulación de ambos transportadores de fosfomicina, por lo que alteraciones que produzcan variaciones en los niveles de AMPc también se relacionan con resistencia al antimicrobiano. Se han reportado disminuciones en los niveles de AMPc intracelular como consecuencia de mutaciones en el gen *cyaA*, el cual codifica para la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de sintetizar el AMPc<sup>114</sup>.

Del mismo modo, también se han relacionado mutaciones en el gen *ptsI* (el cual que interviene en la ruta metabólica de la represión catabólica del carbono (CCR)), con la modificación de los niveles de AMPc y la consecuente resistencia a fosfomicina<sup>92,115,116</sup>. El dominio EIIA del transportador de glucosa (EIIAGlc) es la unidad central de procesamiento de la ruta CCR en *E. coli*. Cuando se fosforila, EIIAGlc puede activar la enzima AC produciendo la síntesis de AMPc.

Las elevadas concentraciones de AMPc desencadenan la formación de complejos CRP-AMPc los cuales se unen a los promotores de los genes catabólicos, activándolos, y aumentando la transcripción de los genes *glpT* y *uhpT*<sup>82</sup>.

El gen *ptsI* codifica para la proteína EI, que fosforilará a HPr (proteína de histidina) que a su vez acabará fosforilando a EIIAGlc.

Una vez EIIAGlc se encuentra fosforilado, puede o bien participar en la activación de genes catabólicos como consecuencia de su unión a la enzima AC o bien, si la bacteria se encuentra incorporando azúcares al citoplasma mediante el sistema fosfoenolpiruvato-carbohidrato fosfotransferasa (sistema PTS), al no ser necesaria la activación de los procesos catabólicos, el fosfato de EIIAGlc en vez de activar AC será utilizado para fosforilar los azúcares incorporados<sup>113</sup>. (Figura 9) En su estado no fosforilado, EIIAGlc no puede activar AC, en cuyo caso, EIIAGlc se unirá e inactivará enzimas metabólicas y transportadores de fuentes de carbono secundarias.

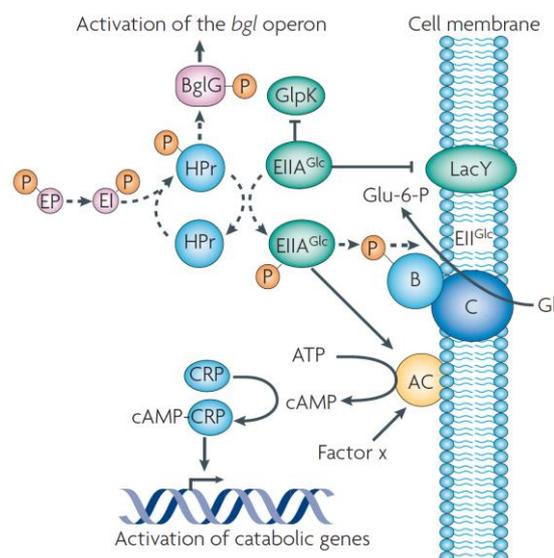


Figura 9: Representación del sistema de represión de genes catalíticos en *E. coli*<sup>113</sup>.

### Mutaciones en la diana murA

Las modificaciones en la diana de fosfomicina aparecen raramente en aislados clínicos, y no se ha descrito ninguna hasta la fecha que afecte a su centro activo. Mutaciones como Asp369Asn y Leu370Ile se sugieren como posibles orígenes de una sensibilidad disminuida a fosfomicina, ya que son residuos muy conservados que pueden interferir en la unión del PEP a MurA, y por consiguiente, también en la unión del antibiótico<sup>92</sup>.

Por otro lado, la sobreexpresión de MurA en *E. coli*, también ha demostrado ser causante de una disminución en la sensibilidad a este antimicrobiano, aunque a costa de disminuir el *fitness* bacteriano<sup>117</sup>.

En microorganismos Gram-positivos también se han encontrado mutaciones en MurA. Por ejemplo, en un estudio en el que se secuenciaron 96 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, se encontraron 7 mutaciones en MurA, pero solamente una de ellas (la cual se traducía en un codón de parada) se encontraba en una cepa resistente a fosfomicina<sup>118</sup>.

#### 1.5.4.3 Mecanismos plasmídicos de resistencia

La resistencia plasmídica es aquella en la que el determinante de resistencia es transmisible entre microorganismos mediante plataformas genéticas. Estos determinantes de resistencia para fosfomicina son enzimas capaces de modificar la estructura del fármaco haciéndole perder su actividad<sup>68</sup>. En el caso del agente antimicrobiano que nos ocupa, muchas veces esas mismas plataformas también llevan mecanismos de resistencia para otros antimicrobianos<sup>68,119</sup>.

Las enzimas modificantes de fosfomicina se clasifican principalmente en dos grandes grupos:

metaloenzimas (FosA, FosB y FosX) y enzimas tipo quinasa (FomA y FomB) (Figura 10).

Las metaloenzimas abren el anillo epóxido de la fosfomicina ayudándose de un cofactor metálico (ion manganeso, magnesio o potasio) y añaden diversos sustratos (glutación, bacilitiol o agua) que hacen que la molécula pierda su actividad<sup>120</sup>.

Las proteínas Fos muestran una homología muy alta de secuencia, con pocos residuos de diferencia entre ellas. Estas pequeñas variaciones son las que confieren las diferencias catalíticas de cada subclase<sup>82</sup>. Están relacionados evolutivamente y forman un grupo de enzimas relacionadas con la glioxalasa I, metilmalonil-CoA epimerasa y extradiol dioxigenasas, todas ellas miembros de la misma superfamilia de metaloenzimas y comparten un pliegue estructural común que proporciona un entorno de coordinación metálico muy versátil, mediando la catálisis de un conjunto muy diverso de reacciones<sup>121</sup>.

FosA fue la primera enzima de este grupo descrita. Se trata de una glutación-S-transferasa encontrada originalmente en un plásmido de *S. marcescens*<sup>122,123</sup>. Posteriormente se aisló en un plásmido conjugativo de multirresistencia procedente de aislados clínicos de enterobacterias residiendo en el transposón Tn2921<sup>124,125</sup>. FosA

necesita  $Mn^{2+}$  como cofactor para inactivar la fosfomicina añadiendo una molécula de glutatión al anillo oxirano del antibiótico, produciendo así su inactivación<sup>126</sup>. Además, también requiere  $K^+$  para una actividad óptima, ya que la activación de la enzima es 100 veces mayor cuando este catión monovalente se une al centro catalítico<sup>127</sup>. El análisis funcional de la secuencia FosA ha revelado varios residuos implicados en la unión del sustrato y ligando a los iones  $Mn^{2+}$  y  $K^+$  que son esenciales para la actividad enzimática<sup>128</sup>.

Otras enzimas plasmídicas glutatión-S-transferasa relacionadas (tipo FosA) son FosA3, FosA4, FosA5 y FosC2<sup>119</sup>.

FosB es una tiol-S-transferasa que también confiere resistencia a fosfomicina. Se detectó por primera vez en un plásmido de *Staphylococcus epidermidis* y posteriormente se ha detectado en plásmidos de muchas bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecium*<sup>129,130</sup>.

FosB se caracterizó inicialmente como una L-cisteína tiol transferasa  $Mg^{2+}$  dependiente que catalizaba la adición de un grupo tiol utilizando L-cisteína como un sustrato donante<sup>131</sup>. En contraste con FosA, FosB no muestra dependencia de metales monovalentes. En el trabajo de Gaballa y colaboradores se sugiere que el bacillitíol podría ser el donador de tiol *in vivo* para FosB<sup>132</sup>. El análisis cinético posterior de FosB de *S. aureus* ha confirmado que la enzima es una tiol S-transferasa dependiente de un metal divalente y que el bacillitíol es el sustrato tiol preferido por la enzima en condiciones fisiológicas<sup>133</sup>.

Las hidrolasas del tipo FosX son una subfamilia de las enzimas relacionadas con FosA y FosB, compartiendo 30%-35% de identidad de secuencia con ellas<sup>134</sup>. Enzimas homólogas a FosX han sido identificados en el cromosoma de varios microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Brucella melitensis*. FosX es una hidrolasa  $Mn^{2+}$  dependiente que cataliza la hidratación de la fosfomicina<sup>135</sup>. La enzima media la adición de agua a la posición C1 del antibiótico, rompiendo el anillo de oxirano y utiliza ácido glutámico como catalizador de la reacción<sup>135</sup>.

Los microorganismos productores de antibióticos suelen asociar los genes biosintéticos a los genes de resistencia con el fin de protegerse ellos mismos de los efectos nocivos de los antibióticos que generan. Los productores de fosfomicina tienen quinasas

antibióticas no relacionadas con las metaloenzimas Fos que modifican y desintoxican el antibiótico dentro de la bacteria. En *Streptomyces* spp., dos quinasas de fosfomicina modifican secuencialmente al antibiótico en presencia de ATP y  $Mg^{2+}$ . FomA convierte fosfomicina en fosfomicina monofosfato, mientras que FomB produce difosfato fosfomicina utilizando la forma de monofosfato como sustrato<sup>136,137</sup>.

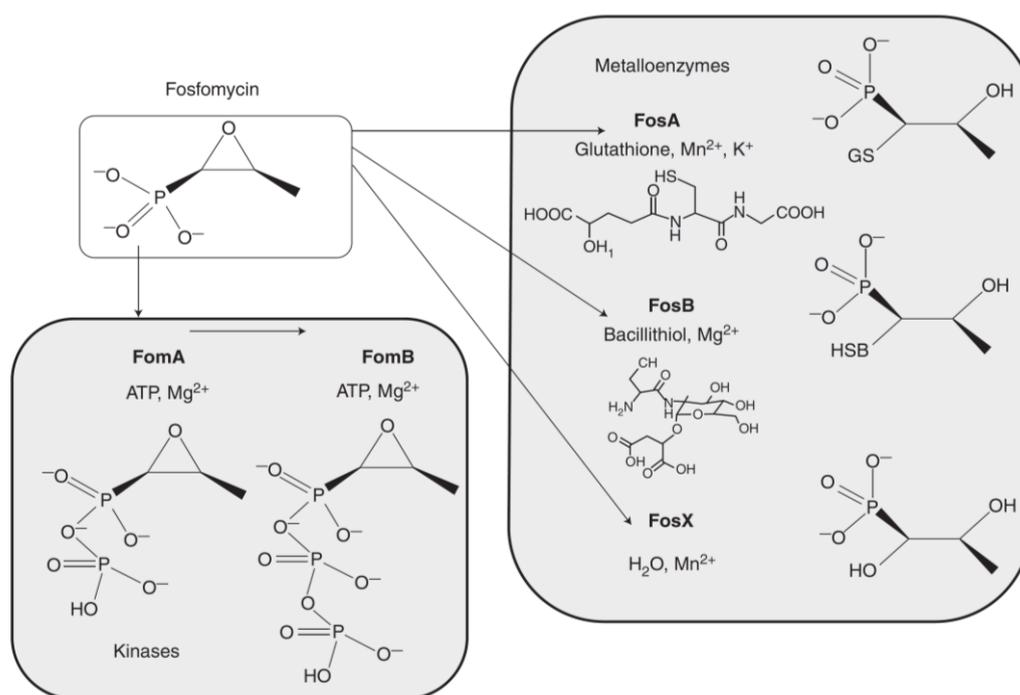


Figura 10: Principales mecanismos enzimáticos de resistencia a fosfomicina<sup>119</sup>.

### 1.5.5 Espectro de acción y epidemiología de la resistencia.

Fosfomicina es un agente antimicrobiano de amplio espectro que muestra una excelente actividad bactericida frente a un amplio rango de microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos, incluyendo aquellos que presentan multirresistencias<sup>138</sup>.

Los microorganismos que están clasificados como intrínsecamente resistentes a fosfomicina según el comité CLSI y por lo tanto no sería necesario testar su sensibilidad frente al antimicrobiano son *A. baumannii/A. calcoaceticus complex*, *Burkholderia cepacia complex* y *Stenotrophomonas maltophilia* del grupo no-enterobacterias, y *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus capitis* dentro de los Gram-positivos<sup>139</sup>.

El comité EUCAST añade a esta lista *Corynebacterium* sp. como género intrínsecamente resistente a fosfomicina<sup>140</sup>.

#### *Actividad frente a Gram-positivos*

*S. aureus* es habitualmente sensible a fosfomicina, manteniéndose en un rango de 33.2%-100% (frecuencia de 91.7%) según los diferentes trabajos<sup>62</sup>. La sensibilidad a este antimicrobiano es similar en los *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). Se ha calculado una CMI modal de 1 µg/ml aunque en este último grupo es en el que se encuentran los valores más altos<sup>138</sup>.

Fosfomicina también es activo *in vitro* frente a la mayoría de *Enterococcus faecalis* incluyendo las cepas vancomicina resistentes (VR) y que por lo tanto tienen menos opciones terapéuticas, con una CMI modal de 32-64 µg/ml<sup>141</sup>. De manera general, se calcula que el 30-100% de las cepas de *Enterococcus* spp. son sensibles a fosfomicina, y no parece haber relación entre la resistencia a este fármaco y ser VR<sup>61,142,143</sup>.

En un estudio americano con aislados de enterococo de origen urinario se observó una sensibilidad a fosfomicina del 90,6%, puntualizando que existen diferencias de resultado según la metodología que se utilice<sup>144</sup>.

En un estudio hecho en Grecia sobre un total de 1.847 aislados Gram-positivos de origen no urinario se observó un 69,1% de resistencia a fosfomicina. Si analizamos los resultados por especies se determinó que 416 de 419 (99.3%) *S. aureus* eran sensibles, incluyendo 129 de 130 *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) mientras que únicamente 745 de 961 (77,5%) de los estafilococos coagulasa negativa presentaban sensibilidad a fosfomicina. De los 42 *Streptococcus pneumoniae*, 64 *Streptococcus pyogenes* y 93 otros Gram-positivos, el 61,9%, 40,6% y el 48,4% respectivamente, fueron sensibles a fosfomicina<sup>61</sup>.

La actividad de fosfomicina frente a *S. pneumoniae* se ha evaluado en dos estudios, dando valores de sensibilidad del 61,9% y del 100%<sup>62,145</sup>.

#### *Actividad frente a Gram-negativos y Gram-negativos multirresistentes*

Fosfomicina tiene una excelente actividad frente a enterobacterias. En Europa, se calcula una tasa de resistencia global para enterobacterias inferior al 1,5%<sup>146</sup>.

Para *E. coli* se han detectado porcentajes de sensibilidad que oscilan entre el 81 y 100%, dependiendo sobre todo del área geográfica de la que provengan los aislados<sup>62,147,148</sup>. La CMI suele ser baja, por debajo de 2-4 µg/ml<sup>149</sup>. Es en Asia donde actualmente se reportan valores más altos de CMI, llegando a presentar valores de 128 µg/ml<sup>150,151</sup>. Aunque en la actualidad no se ha realizado estudios con la suficiente potencia como para determinar la diseminación real de la resistencia en este continente, un trabajo reciente realizado en 20 hospitales en China se determinó que el 80.2 % de los aislados resistentes a fosfomicina eran portadores del gen *fosA3*<sup>152</sup>.

En España, la resistencia a fosfomicina en *E. coli* sigue siendo muy baja. En un estudio realizado en Aragón, se determinó el porcentaje de resistencia en aislados procedentes de infección urinaria comunitarias, que fue de 2,29% en 2011, 2,42% en 2012 y 3,65% en 2013<sup>153</sup>. En Galicia el porcentaje de resistencia oscila entre 1,8 y 5% según un estudio en el que participaron 9 hospitales de esta comunidad. Los ratios más elevado de resistencia se encuentran entre los varones mayores de 75 años<sup>154</sup>. En población pediátrica, los resultados de sensibilidad son muy altos (99-100%) incluso en *E. coli* BLEE<sup>155,156</sup>.

*K. pneumoniae* es más frecuentemente resistente a fosfomicina que *E. coli* en la mayoría de las series, variando la sensibilidad entre un 15 y un 100% con una media del 83,8%<sup>62</sup>. La sensibilidad en países en vías de desarrollo es ligeramente inferior respecto a la observada en países del primer mundo (82,4% y 87,4% respectivamente)<sup>62</sup>.

Otras enterobacterias como *Proteus* spp, y *Enterobacter* spp. presentan porcentajes de sensibilidad más bajos, llegando al 50% y 75% respectivamente según algunos estudios<sup>62,147,157</sup>. En *Citrobacter* spp fosfomicina suele tener más actividad, alcanzando el 92.8% de sensibilidad en el último estudio realizado en Grecia<sup>158</sup>.

Para *P. aeruginosa* y *S. maltophilia* la CMI suele estar alrededor de 64 µg/ml, por lo que la sensibilidad variará según los puntos de corte utilizados. *A. baumannii* y *M. morgani* son normalmente resistentes a fosfomicina<sup>138,144</sup>.

La sensibilidad a fosfomicina entre las capas productoras de BLEE tipo CTX-M es mayor en *E. coli* que en *K. pneumoniae* calculándose ratios de sensibilidad para el primero de 86-100%<sup>159</sup>. Estos resultados son mejores a los que se obtienen con otros fármacos como nitrofurantoína, ciprofloxacino o trimetoprim-sulfametoxazol<sup>141</sup>.

En una revisión de 17 estudios, en la que se evaluó la actividad de fosfomicina para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE, 11 de los estudios reportaron al menos un 90% de sensibilidad a este antimicrobiano en sus aislados<sup>62</sup>.

Un posible nuevo uso para fosfomicina es en el tratamiento de las infecciones causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Existen estudios que demuestran que la mayoría de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas son sensibles a este antimicrobiano. Aunque los ratios de sensibilidad son variables según los trabajos (67-93%) la mayoría de ellos coinciden en su potencial uso, sobre todo en forma de tratamiento combinado<sup>160-162</sup>.

En un estudio llevado a cabo en 2017 en Turquía para conocer la sensibilidad a fosfomicina de aislados clínicos multirresistentes se concluyó, que el 20,7% de cepas productoras de BLEE eran resistentes con frecuencias del 9,5% para *E. coli*, 28% para *Enterobacter spp.*, 35,7% para *Klebsiella spp.* y 50% para *Morganella spp.* Además, el 72,2% de las cepas extremadamente resistentes y el 61,1% de las resistentes a carbapenémicos fueron resistentes<sup>163</sup>.

#### *Epidemiología de la resistencia plasmídica a fosfomicina*

La resistencia plasmídica más prevalente es la variante genética *fosA*. Principalmente se asila en cepas de *E. coli*, tanto de origen clínico, ambiental así como de animales de granja y de compañía, siendo Japón, China y Corea del Sur los países que han reportado el mayor número de cepas con este mecanismo de resistencia<sup>164-167</sup>.

El 7,8% de los aislados clínicos de *E. coli* recogidos en 20 hospitales geográficamente dispersos en China entre julio de 2009 y junio de 2010 no eran sensibles a la fosfomicina. De éstos, el 80% portaba el gen del *fosA3*, presumiblemente en un plásmido conjugativo<sup>152</sup>. En otro estudio más reciente del mismo país se describe una tasa de resistencia a fosfomicina del 60,8% en los aislados productores de KPC y del 12,5% en los productores de BLEE. Un 34% del total de aislados KPC portaban también *fosA3*<sup>151</sup>. Pero lo más alarmante es que *fosA3* y *bla<sub>KPC2</sub>* se encontraron co-localizado en el mismo plásmido, al que se denominó pFOS18, por lo que indicaría una posible diseminación conjunta de ambos mecanismos de resistencia<sup>151</sup>. También se ha

encontrado *fosA3* en plásmidos CTX-M de *E. coli* en Japón, flanqueados por elementos IS26<sup>168</sup>.

Aunque el problema de la resistencia a fosfomicina mediante determinantes plasmídicos es ya un problema grave en Asia, debido a la gran cantidad de personas que viajan a esas zonas y la cantidad de importaciones de distintos productos que realizan, es esperable que en los próximos años acabe siendo un problema de resistencia a nivel mundial. De hecho, ya se ha detectado un caso de resistencia a fosfomicina mediada por *fosA3* en una paciente de Pensilvania, USA, sin ningún precedente de viaje a esa zona. Los autores especulan sobre la posibilidad de la presencia de estos plásmidos en productos alimentarios importados de esas regiones puesto que, es en animales de granja donde más se ha detectado este tipo de resistencia<sup>167,169,170</sup>. Se han encontrado hasta la fecha muy pocos aislados en Europa que porten *fosA3*<sup>171,172</sup>.

### **1.6 Aparición de resistencias a fosfomicina *in vitro* e *in vivo***

Desde su descubrimiento, fosfomicina se ha relacionado con una rápida aparición *in vitro* de resistencia. En un estudio llevado a cabo en 1977, en el que se evaluaron un total de 109 aislados clínicos, se determinó que solamente el 7,3% de ellos no desarrollaban resistencia a fosfomicina *in vitro*. Además, el 50% de estos aislados tenían una alta frecuencia de mutación, de entre  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-6}$  bacterias<sup>173</sup>.

Sin embargo, no se observa este mismo fenómeno *in vivo*, puesto que a pesar de su uso en clínica, sin tener en cuenta la resistencia plasmídica, los porcentajes de sensibilidad se mantienen generalmente estables en los países en los que se utiliza. No existe una explicación única ni sencilla a este fenómeno. Nilsson y colaboradores modelaron matemáticamente la probabilidad de desarrollar resistencia a fosfomicina en vejiga durante el tratamiento<sup>174</sup>. El modelo muestra que durante un episodio típico de infección urinaria, la probabilidad de desarrollar resistencias es alta. Sin embargo, si esta resistencia viene asociada a una reducción en la tasa de crecimiento de los aislados, la probabilidad de desarrollar resistencia disminuye rápidamente puesto que estas cepas serán eliminadas por la orina antes de poder establecer la infección. Para determinar si la resistencia a fosfomicina provoca dicha reducción en el *fitness*

bacteriano, estos mismos autores seleccionaron un conjunto de cepas resistentes de origen clínico y otras generadas *in vitro*. Al caracterizar las mutaciones encontradas *in vitro* e *in vivo* se encontraron diferencias. La resistencia en los mutantes generados *in vitro* fue causada por mutaciones en *ptsI*, *cyaA*, *glpT*, *uhpA* / *T*, mientras que no se encontraron mutantes *cyaA* o *ptsI* *in vivo*. Sin embargo, todas las mutaciones causaron una disminución de la tasa de crecimiento tanto en medio de laboratorio como en orina, independientemente de la ausencia o presencia de fosfomicina<sup>174</sup>.

En un trabajo previo realizados por nuestro grupo, se utilizó un modelo dinámico de infección mediante el sistema de *hollow-fiber* para simular distintas dosificaciones humanizadas de fosfomicina frente a una cepa clínica de *E. coli* BLEE con CMI 1 µg/ml. En el trabajo, se observó, que pese a existir una reducción en la carga bacteriana al inicio del tratamiento, aparecieron mutantes resistentes a fosfomicina con los regímenes de dosificación de 12, 15, y 18 g/día<sup>175</sup>. (Figura 11).

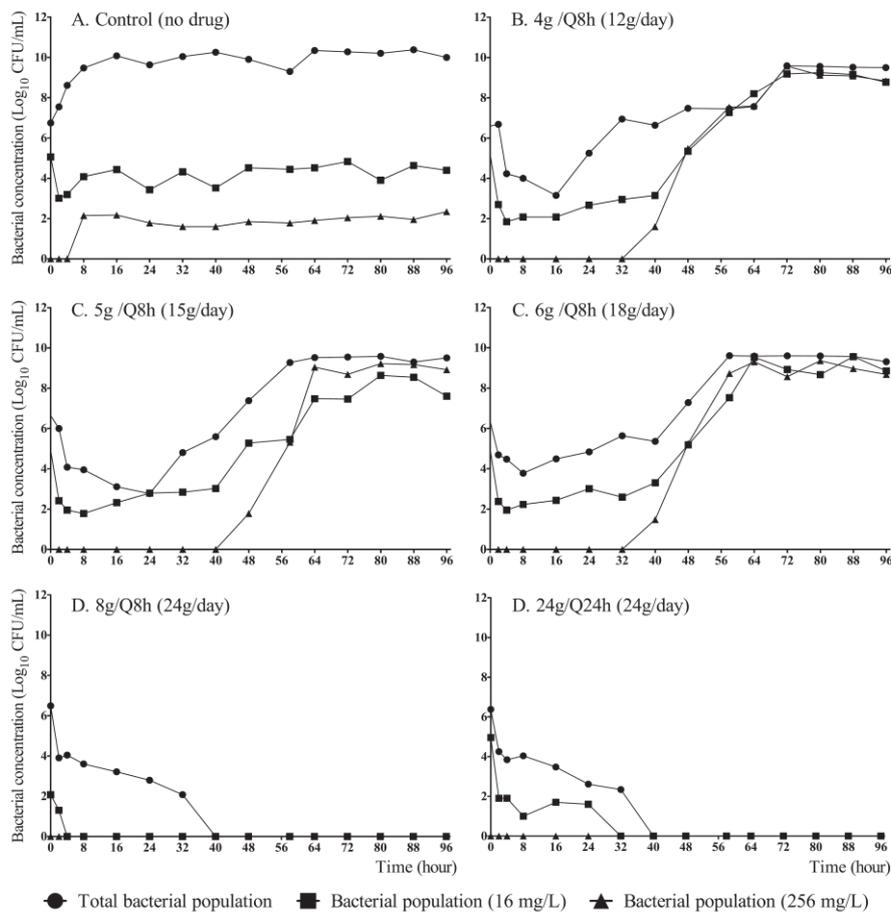


FIG 3 Dose range-finding for suppression of development of fosfomicin-resistant mutants and fractionation studies with strain Ec46 (MIC, 1 mg/liter).

Figura 11: Estudios de rangos de dosificaciones para la supresión de la aparición de mutantes resistentes. Cepa de *E. coli* con CMI 1 µg/ml<sup>175</sup>.

Otra hipótesis utilizada para explicar la discordancia entre la resistencia *in vitro* y la *in vivo* son variaciones en la virulencia de la bacteria relacionadas con la adquisición de la resistencia. Se ha visto que cepas resistentes a fosfomicina presentan una disminución en la capacidad adhesión que pueden ayudar a prevenir el establecimiento de la infección tanto en vejiga como en catéteres<sup>176</sup>.

A todo esto se ha de sumar el hecho de que fosfomicina se acumula en la vejiga para su eliminación. Esto hace que la concentración del fármaco aumente sustancialmente, produciendo una eliminación rápida del inóculo bacteriano e impidiendo la selección de mutantes resistentes. Como además la principal indicación de este antimicrobiano es para el tratamiento de este tipo de infecciones, podría ser una explicación para la alta tasa de éxito de este tratamiento cuando el microorganismo causante es *E. coli*<sup>177</sup>.

Es en el caso de infecciones causadas por *P. aeruginosa* donde se han reportado mayores tasas de fracasos terapéuticos (7-20%)<sup>178</sup>. Un estudio reciente ha mostrado la tendencia *in vitro* de 59 cepas de *P. aeruginosa* con CMI ≤64 µg/ml a adquirir resistencia a fosfomicina tras estar en contacto con el antimicrobiano, aún en el caso de inóculo bacteriano bajo<sup>179</sup>.

La mayoría de ensayos clínicos que han evaluado el tratamiento con fosfomicina lo han hecho en infección urinaria, en regímenes de una sola dosis, y si aparece resistencia a fosfomicina suele ser principalmente en aislados de *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. o *Enterobacter* spp<sup>178</sup>.

Recientemente, se ha publicado una revisión sistemática y metaanálisis en que se evaluó el uso de fosfomicina intravenosa<sup>180</sup>. En este trabajo se calculó un porcentaje medio de aparición de cepas resistentes durante el tratamiento del 3,4%, el cual se parece al encontrado para otras clases de antimicrobianos como penicilinas, aminoglucósidos o carbapenémicos. Esto confirma la alta discrepancia entre los resultados de aparición de resistencia *in vitro* e *in vivo*<sup>180</sup>.

### 1.7 Uso clínico de fosfomicina

En la actualidad, la Agencia española del medicamento y productos sanitarios (AEMPS), ha autorizado el uso de fosfomicina-trometamol para el tratamiento de las infecciones agudas no complicadas del tracto urinario inferior (como cistitis y uretritis no gonocócica), producidas por microorganismos sensibles a la fosfomicina y como profilaxis de infecciones urinarias después de una intervención quirúrgica y de prácticas transuretrales diagnósticas.

Con una biodisponibilidad de fosfomicina trometamol oral de 34-58%<sup>181</sup> la dosificación utilizada en la mayoría de países, incluyendo España es de 3 g/día en dosis única<sup>66</sup>. Aún y así, algunos autores recomiendan una dosificación superior (3 g cada 2-3 días)<sup>182</sup>. Las evidencias actuales no hacen necesario el ajuste de la dosis en subpoblaciones vulnerables como mujeres embarazadas, población de edad avanzada o pacientes con disfunción renal<sup>183,184</sup>. En población pediátrica sí se recomiendan dosificaciones inferiores ajustadas al peso del paciente<sup>185</sup>.

Por otro lado, en su forma de sal disódica se encuentra aprobada para su uso por vía intramuscular, tanto en infecciones del tracto genitourinario (pielitis, pielonefritis, endometritis y prostatitis) como en tracto respiratorio (agudización de broncopatías crónicas) e infecciones de tejidos blandos así como en profilaxis previa a exploraciones radiológicas con sondajes o catéteres.

Finalmente, la sal disódica en su formulación para administración intravenosa, se encuentra indicada para el tratamiento de infecciones urinarias complicadas (pielonefritis, hidronefrosis, abscesos renales y prostatitis), ginecológicas, respiratorias (broncopatías agudas o crónicas, abscesos pulmonares), del aparato digestivo (colecistitis, abscesos apendiculares, peritonitis, etc.), postquirúrgicas, septicemias, endocarditis y meningitis, así como en profilaxis quirúrgicas en traumatismos abiertos, cirugía abdominal, cardiovascular, neurocirugía, cirugía en enfermos con alto riesgo (trasplantes, inmunodeprimidos), hemodiálisis o diálisis peritoneal y en grandes quemados<sup>184</sup>.

Además, la formulación intravenosa, fosfomicina ha demostrado ser de gran utilidad para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas, así como para infecciones intraoculares debido a la excelente difusión del antimicrobiano en humor acuoso<sup>186</sup>.

En los casos de infecciones hospitalarias graves (septicemias, endocarditis, meningitis) la AEMPS hace la puntualización de que es indispensable utilizar la fosfomicina asociada a otro antimicrobiano para evitar al máximo la selección de mutantes resistentes<sup>184</sup>.

En nuestro país, la posología y forma de administración descrita en la ficha técnica de fosfomicina intravenosa para adultos es de 4 g cada 6-8 horas mediante en goteo de 1 hora.

En casos de insuficiencia renal se mantendrá constante la dosis de 4 g por administración, alargando el intervalo entre las mismas en función del aclaramiento de creatinina.

Sin embargo, las dosis de fosfomicina intravenosa varían considerablemente entre estudios y países. En Europa se ha utilizado a una dosis media de 181 mg/kg en Francia, 182 mg/kg en Alemania y Austria, y 220 mg/kg en España. Normalmente, esta dosis se divide en 2-3 dosis iguales. Sin embargo, en Japón, la dosis media es mucha más baja, con valores medios de 56 mg/kg por día<sup>180</sup>.

#### *1.7.1 Papel de la fosfomicina frente a bacterias multirresistentes.*

Existen estudios que demuestran que, pese a que fosfomicina es un buen antimicrobiano para la resolución de infecciones urinarias frente a bacterias sensibles, su uso en monoterapia no es suficiente si se trata de infecciones recurrentes o de causadas por bacterias multirresistentes en pacientes con comorbilidades significativas<sup>187,188</sup>. En la actualidad, la pauta habitual de administración, es en combinación, por ejemplo con cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos, colistina o aminoglucósidos<sup>180</sup>.

Un uso potencial para la fosfomicina intravenosa es el tratamiento de bacterias multirresistentes como *S. aureus* resistente a meticilina, enterococo VR o BGN multirresistentes, ya que, debido a su único mecanismo de acción, presenta sinergia

con una gran cantidad de antimicrobianos y la combinación ha demostrado ser una alternativa eficaz<sup>68</sup>. (Tabla 2).

Según un metaanálisis publicado en 2017 en el que se evalúan los resultados del uso de la fosfomicina intravenosa en 128 estudios publicados que incluyen más de 5.527 pacientes, los autores concluyen que no existe diferencia en cuanto a la eficacia clínica ni microbiológica en el tratamiento con fosfomicina frente a otros antimicrobianos, a pesar de que existan varios comparadores (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos), regímenes de tratamiento e indicaciones<sup>180</sup>. En este estudio se muestra una alta eficacia frente a *A. baumannii* si se usa en combinación con colistina, a pesar de la poca actividad propia de la fosfomicina frente a este microorganismo.

Actualmente, está en curso un ensayo clínico controlado aleatorizado multicéntrico denominado FOREST (EudraCT Number: 2013-002922-21) cuyo principal objetivo es demostrar la no inferioridad del tratamiento con fosfomicina comparado con meropenem para la resolución de bacteriemias de origen urinario causadas por *E. coli* BLEE. En este estudio, se compara tanto la eficacia clínica como la microbiológica y la seguridad del tratamiento con fosfomicina (4g cada 6h) y de meropenem (1g cada 8h) como de la terapia dirigida. Se espera que este estudio proporcione la evidencia científica necesaria para utilizar fosfomicina intravenosa con seguridad frente a este tipo de infecciones<sup>189</sup>.

Actividad de fosfomicina en combinación con los siguientes antibióticos			
Microorganismo	Sinergia	Indiferencia	Antagonismo
SARM	Cefazolina, vancomicina, rifampicina, carbapenémicos, cefmetazol, linezolid, quinupristina-dalfopristina, ácido fusídico, minociclina, tigeciclina, daptomicina	Aminoglucósidos, trimetoprim	Rifampicina
Enterococo VR	Daptomicina, teicoplanina, amoxicilina, linezolid, ampicilina, vancomicina, tigeciclina, rifampicina	Nitrofurantoina, minociclina	Ampicilina
<i>E. coli</i> BLEE	Carbapenémicos, aztreonam, colistina, aminoglucósidos, tigeciclina, colistina		
<i>K. pneumoniae</i> BLEE	Carbapenémicos, colistina, netilmicina, tigeciclina		
<i>K. pneumoniae</i> MDR	Carbapenémicos, aztreonam		
<i>K. pneumoniae</i> RC	Carbapenémicos, colistina, tigeciclina, netilmicina	Gentamicina	Colistina (productoras de OXA48)
<i>P. aeruginosa</i> RC	Carbapenémicos, colistina, aminoglucósidos, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacino.	Imipenem, ceftazidima, ciprofloxacino, gentamicina	
<i>P. aeruginosa</i> MDR	Carbapenémicos, colistina, tigeciclina, netilmicina	Aminoglucósidos, imipenem, ceftazidima, ciprofloxacino	
<i>Acinetobacter</i> OXA-23	Colistina, Sulbactam		
<i>Acinetobacter pan-resistente</i>	Polimixina B, minociclina, ceftriaxona	Cefixime, ceftriaxona, azitromicina, colistina, ertapenem, gentamicina, minociclina	

Tabla 2: Actividad sinérgica de fosfomicina en combinación con otros antimicrobianos frente a bacterias multirresistentes. SARM (*S. aureus* resistente a meticilina), enterococo VR (resistente a vancomicina), BLEE (beta lactamasa de espectro extendido), MDR (multirresistente), RC (resistente a carbapenémicos). Adaptación de Falagas et al. CMI 2016<sup>68</sup>

### 1.8 Estudios de sensibilidad. Técnicas y limitaciones.

La actividad de un antimicrobiano frente a bacterias se determina mediante la realización de un antibiograma. Los métodos de sensibilidad antimicrobiana tuvieron un gran desarrollo durante los años 40. Con la aparición de numerosas técnicas y debido al gran avance de las mismas pronto se hizo evidente la necesidad de estandarización. En 1961 la OMS publicó un informe sobre la metodología oficial para realizar los estudios de sensibilidad<sup>190,191</sup>.

En la actualidad, existen diferentes técnicas para la realización del antibiograma. Las más relevantes son: dilución en agar, microdilución en caldo y difusión en agar. Es importante la normalización de todos estos métodos para que los resultados sean reproducibles entre laboratorios<sup>139,192</sup>.

La mayoría de sistemas comerciales que se utilizan en la práctica diaria en los laboratorios de microbiología son adaptaciones, automatizadas o semiautomatizadas, de estas técnicas y proporcionan resultados esencialmente equivalentes a los métodos estandarizados de referencia.

#### 1.8.1 Dilución en agar

Este método se describió por primera vez en 1940 y a lo largo de esa década aparecen numerosas publicaciones en las que esta técnica ha sido aplicada para el estudio de sensibilidad de diferentes antimicrobianos frente a distintas especies bacterianas<sup>190</sup>.

La principal característica de este método es que el antimicrobiano a estudiar se encuentra diluido dentro del agar de la placa, donde posteriormente se inoculará el microorganismo a evaluar. Para lograr el rango de concentración deseado se prepara una serie de placas de medio Mueller Hinton agar con concentraciones crecientes en base 2 (por ejemplo, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ ) del antibiótico hasta encontrar la concentración mínima que inhibe el crecimiento bacteriano. Esta concentración es conocida con las siglas CMI y se expresa en  $\mu\text{g/ml}$  si se siguen los estándares de nomenclatura del comité americano CLSI y en  $\text{mg/L}$  si se siguen los estándares internacionales de EUCAST. Inóculos de múltiples microorganismos se pueden aplicar

simultáneamente sobre la superficie del medio utilizando un replicador de Steers. (Figura 12)

El dispositivo posee una serie de pinchos que al ser sumergidos en los pocillos que contienen el inóculo bacteriano depositan un volumen concreto en la placa con el medio de cultivo. Por un lado, los replicadores con dispensadores de 3 mm de diámetro colocan aproximadamente 2  $\mu\text{l}$  (rango entre 1-3  $\mu\text{l}$ ) en la superficie del agar, mientras que los que tiene dispensadores más pequeños de 1 mm, depositan entre 0,1-0,2  $\mu\text{l}$ . La mayoría de los replicadores existentes tienen capacidad para inocular 32-36 microorganismos, simultáneamente.



Figura 12: Replicador de Steers.

Para la preparación de una dilución en agar estandarizada es necesario el uso de un inóculo inicial de microorganismo a estudiar muy concreto. Para ello, se necesita partir de una suspensión con una turbidez de 0,5 McFarland obtenida de colonias aisladas de un cultivo fresco (24 horas). Una turbidez de 0,5 McFarland equivale aproximadamente a  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) de la mayoría de las especies bacterianas. La concentración de bacterias final para esta técnica es de  $10^4$  UFC por punto de inoculación. De esta manera, mediante la utilización de un replicador con pinchos de 3 mm de diámetro (2  $\mu\text{l}$ /dispensador) la suspensión 0,5 McFarland se diluirá 1:10 en solución salina ( $10^7$  UFC/ml). Por otro lado, si los dispensadores son de 1 mm (0,1-0,2  $\mu\text{l}$ /dispensador) la solución de 0,5 McFarland se emplea directamente.

Una vez inoculadas las placas, estas son secadas a temperatura ambiente e incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por un periodo de 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, los puntos

inoculados en las placas son observados visualmente y se establece la CMI como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. Esta técnica descarta las concentraciones en las que solo haya crecido una colonia aislada o en las que aparece un halo tenue en lugar de la inoculación<sup>139</sup>.

La técnica de dilución en agar continúa siendo el único método de referencia para determinar la CMI a fosfomicina, aunque con la peculiaridad de que se requiere la adición de 25 µg/ml de glucosa 6-fosfato (G6P) al medio de cultivo<sup>193</sup>. Aunque los comités no lo recogen actualmente, Díez-Aguilar y colaboradores demostraron, basándose en un trabajo de Castañeda-García y colaboradores<sup>96</sup>, que para determinar la CMI a fosfomicina para *P. aeruginosa* es indiferente la adición de G6P, puesto que este microorganismo no presenta el transportador específico utilizado por este azúcar.

Aunque también se recomienda esta técnica para determinar la CMI de muchos otros antimicrobianos no suele utilizarse en la práctica clínica al ser muy laboriosa y difícil de automatizar<sup>95,191</sup>.

### 1.8.2 Microdilución en caldo

La microdilución en caldo es hoy en día el método de referencia para determinar la CMI de la mayoría de los antimicrobianos. Su metodología está totalmente regulada y estandarizada por normativa ISO<sup>192</sup>

En esta técnica, al igual que ocurre con la dilución en agar, se utilizan concentraciones crecientes de antimicrobiano, que son enfrentadas al microorganismo a estudiar y por lo tanto se determina la CMI de manera cuantitativa. La diferencia es que en este caso, el antimicrobiano, se encuentra diluido en un caldo Mueller Hinton II (cationes ajustados). Estas diluciones, realizadas igualmente en base 2, son llevadas a cabo en placas de microdilución de 98 pocillos en las que uno de ellos se ha de reservar como control de crecimiento del microorganismo en ausencia de antimicrobiano y otro para control de esterilidad del proceso.

El inóculo inicial del microorganismo a testar, puede proceder tanto de colonias aisladas en medio sólido como de un caldo de crecimiento. Se parte de una suspensión 0,5

McFarland y se realizan las diluciones necesarias para obtener una concentración final de  $2-8 \times 10^5$  UFC/ml por pocillo de microdilución<sup>95</sup>.

La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en el pocillo usados como control positivo, donde se ha de observar una clara turbidez.

Generalmente se acepta un margen de discrepancia aceptable entre ensayos a la hora de determinar la CMI de  $\pm 1$  una dilución en base 2. (Figura 13)

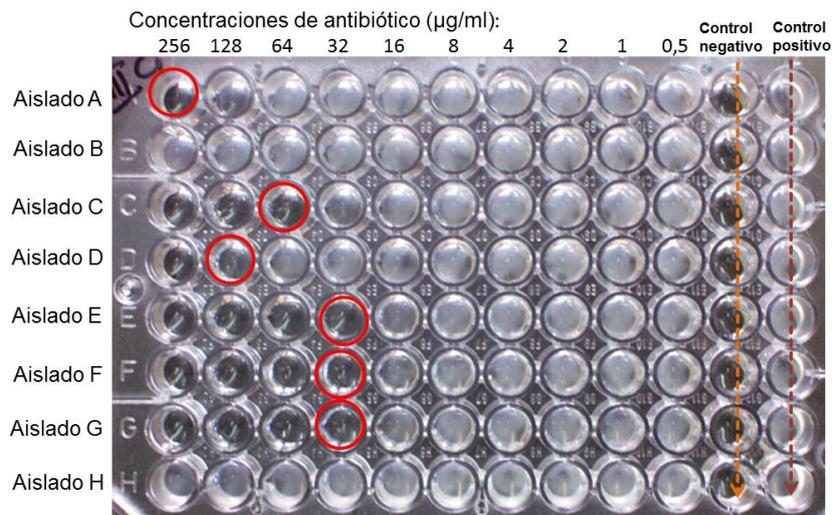


Figura 13: Resultado de test de sensibilidad por microdilución en caldo. La CMI de cada aislado se encuentra señalada con un círculo rojo. Por ejemplo, para el aislado A la CMI es de 256 µg/ml, para el B  $\geq 256$  µg/ml, para el C 64 µg/ml, para el D 128 µg/ml, para los aislados E, F y G 64 µg/ml, y para el H  $>256$  µg/ml.

### 1.8.3 Técnicas de difusión en agar

Estas técnicas se basan en la difusión del antimicrobiano a través del agar de la placa. El antimicrobiano se presenta normalmente deshidratado y embebido en un disco de celulosa o en una tira de plástico, según el método utilizado. El microorganismo (a una concentración de 0,5 McFarland) se dispone en la superficie de la placa a modo de césped, con anterioridad a la colocación de los discos o tiras. Cuando el antibiótico es colocado, este difunde y evita el crecimiento del microorganismo, quedando

delimitada una región de inhibición, que será el dato resultado de estas técnicas. A continuación se comentan las peculiaridades de las técnicas más extendidas:

#### *Disco-placa*

Este método se conoce con el nombre de Kirby-Bauer en referencia a los descubridores del mismo<sup>194,195</sup>. En 1975 este método se convirtió en la base de los estándares de difusión en disco del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, actual CLSI), que aun en la actualidad siguen vigentes.

La técnica consiste en depositar, sobre una superficie de agar previamente inoculada con un microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida de antibiótico. Una vez que el disco se pone en contacto con la superficie del agar, el antibiótico comienza a difundir radialmente a través del mismo formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación se observa un halo de inhibición alrededor del disco si el microorganismo inoculado no es capaz de crecer en contacto con el antibiótico. La cantidad de antibiótico será mayor en las proximidades del disco, mientras que a mayor distancia de este, menor será la concentración del antibiótico. De esta manera, el diámetro del halo de inhibición será proporcional a la sensibilidad de la bacteria. Los resultados son expresados en milímetros. (Figura 14)

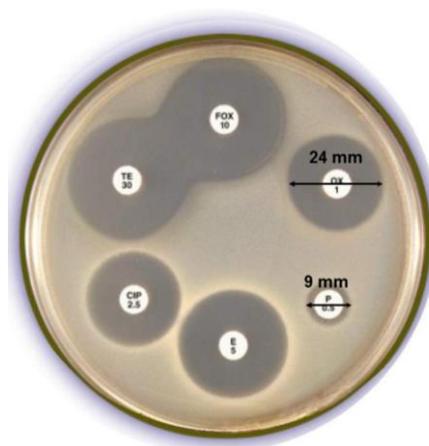


Figura 14: Antibiograma por disco-difusión. La medición se realiza en milímetros, contando el diámetro del halo de inhibición. Por ejemplo, para oxacilina (OX) el halo es de 24 mm, mientras que para penicilina (P) es de 9 mm.

El procedimiento, así como los medios de cultivo, la preparación del inóculo bacteriano, la lectura de los halos de inhibición y la interpretación de los resultados se encuentra estandarizado por parte de las guías internacionales<sup>139,196</sup>. Este método es fácil de realizar, rápido, barato y reproducible. Sus principales limitaciones son que no permite conocer el valor de CMI y la necesidad de 18-24 horas para conocer los resultados.

#### *Método de Epsilon test (Etest)*

El E-test se describió por primera vez en 1988 como un nuevo método para determinar la CMI mediante difusión en placa y fue posteriormente introducido en el mercado en el año 1991 tras ser aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)<sup>197,198</sup>.

Esta técnica sigue el mismo principio de difusión en agar del antibiótico, con la peculiaridad de que el antimicrobiano ahora se encuentra dispuesto en un gradiente sobre una tira plástica, de manera que la parte superior de esta encontramos una concentración más elevada que la inferior. Este rango de concentraciones es conocido y viene especificado en la superficie de la tira. Al poner en contacto la tira de E-test con la superficie de agar se produce de forma inmediata la difusión del antibiótico desde la tira hacia el agar, creándose un gradiente exponencial de concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de la placa, se observa una zona de inhibición con forma de elipse. En el punto donde la concentración de antibiótico no es suficiente para impedir el crecimiento de la bacteria inoculada acabará la elipse de inhibición. En el punto donde esa elipse entra en contacto con la tira de plástico es donde se lee el resultado de esta técnica. El resultado será la concentración de antibiótico que se encuentra a esa altura de la tira, por lo que obtendremos un valor de la CMI. (Figura 15)

Esta técnica se considera una alternativa para el estudio cuantitativo de sensibilidad a antimicrobianos, que además es sencillo, rápido y tiene una buena correlación con el método de referencia, sin embargo el coste de la técnica es más elevado que la anterior.

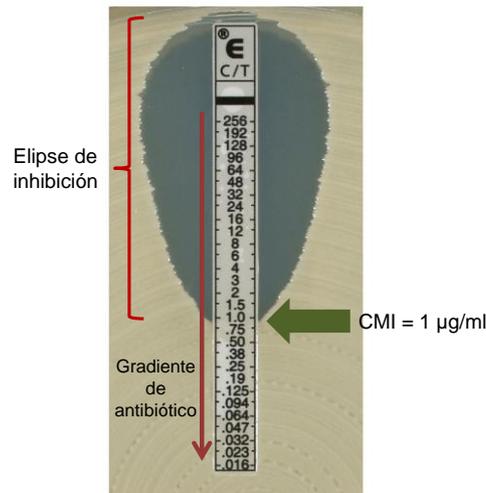


Figura 15: Antibiograma mediante Etest de ceftolozano/tazobactam (C/T)

### 1.9 Puntos de corte de sensibilidad/resistencia.

Los puntos de corte de sensibilidad frente a antimicrobianos son esenciales para la práctica diaria de un laboratorio clínico de microbiología. Estos puntos de corte se utilizan para clasificar a los patógenos causantes de infección entre sensibles y resistentes. Dependiendo de la metodología utilizada, estos puntos de corte se expresarán como concentración (mg/L) (si utilizamos técnicas como la microdilución, dilución en agar o dilución en gradiente) o en milímetros de diámetro de la zona de inhibición (si usamos la técnica de disco difusión). En general, todas las técnicas necesitan de estos puntos de corte para poder inferir sus resultados en criterios de sensibilidad o resistencia y poder así orientar el tratamiento clínico<sup>199</sup>.

El término sensibilidad o resistencia a un antibiótico es complejo y conlleva un significado diferente según si se aplica a un punto de vista microbiológico o clínico.

#### 1.9.1 Cepas salvajes y no salvajes: la resistencia microbiológica

Cuando se habla de sensibilidad o resistencia *in vitro* estos términos tienen una definición muy concreta. Una cepa sensible *in vitro* a un antibiótico es aquella cuyo crecimiento es inhibido por dicho fármaco a un rango de concentración concreto. De

manera opuesta, una cepa es resistente *in vitro*, si a una determinada concentración de antibiótico, no se inhibe su crecimiento y además se trata de una concentración mayor a la encontrada en la cepa salvaje<sup>199</sup>.

Desde un punto de vista puramente microbiológico no es correcto hablar de microorganismo sensibles, sino de cepas salvajes (*wild type*, WT). Se denominan cepas salvajes aquellas que no presentan mecanismos de resistencia adquiridos frente a un determinado antibiótico. La resistencia microbiológica se da en las cepas no salvajes, ya que poseen mecanismos de resistencia adquiridos o mutacionales frente al antibiótico estudiado. La información para establecer estos puntos de corte se obtiene de realizar un número entre moderado y alto de veces un test de sensibilidad *in vitro* estandarizado con cepas de una misma especie y posteriormente representar la distribución de valores de CMI para un antibiótico. Esta metodología también se ha utilizado para establecer puntos de corte epidemiológicos (ECOFF), en los que se determina un valor de CMI concreto para separar subpoblaciones de una misma especie entre salvajes y resistentes<sup>199,200</sup>.

En las siguientes imágenes se muestran ejemplos de las distribuciones de CMI para 5.117 aislados de *E. coli* (Figura 16) y 758 de *K. pneumoniae* (Figura 17) para fosfomicina según el comité EUCAST. Estos datos se obtienen al realizar la técnica de referencia para establecer la CMI (en este caso dilución en agar) de una colección de aislados de diferentes zonas geográficas. Las gráficas representan la frecuencia de aislados con igual CMI. De esta manera, se establece el ECOFF de *E. coli* para fosfomicina en 8 mg/L, y por lo tanto, se considerarán cepas salvajes aquellas que tengan una CMI  $\leq$  a 8 mg/L. Para *K. pneumoniae* podemos observar que las distribuciones de CMI para fosfomicina se mueven un rango de valores más elevados, variando entre 0.5 y  $\geq$  256 mg/L. Este comité no ha establecido un rango de ECOFF para *K. pneumoniae* a fosfomicina.

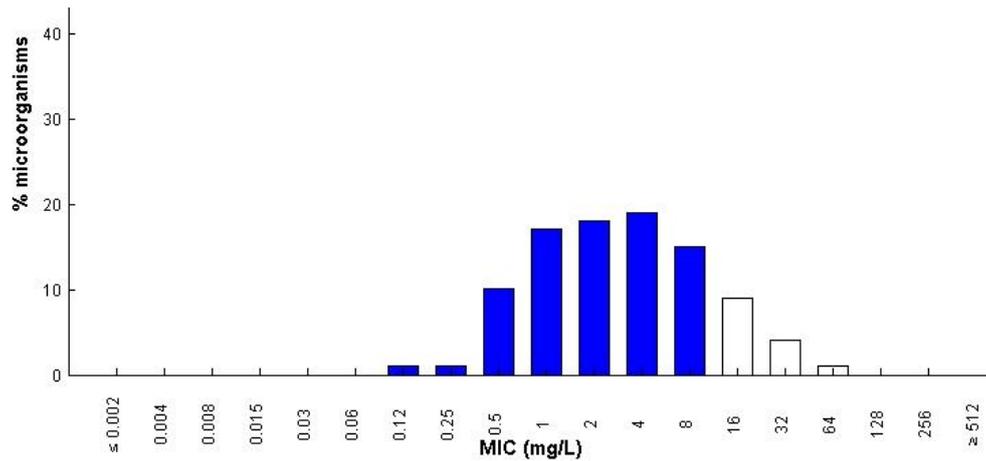


Figura 16: Distribuciones de CMI a fosfomicina en *E. coli*. El cambio de color de azul a blanco delimita el ECOFF de este microorganismo. Figura procedente del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website*.

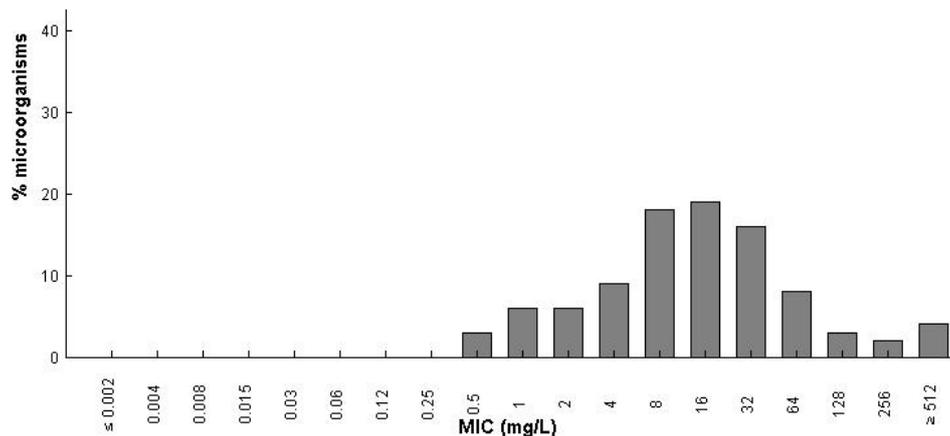


Figura 17: Distribuciones de CMI a fosfomicina para *K. pneumoniae*. Figura procedente del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website*.

### 1.9.2 Sensibilidad y resistencia clínica.

Los puntos de corte clínicos hacen referencia a la concentración de un antibiótico que es capaz de predecir la eficacia terapéutica de dicha droga cuando se utiliza para solventar una infección. Para ello contamos con tres posibles categorías:

- **Sensible:** Cuando la probabilidad de éxito terapéutico al tratar una infección causada por el microorganismo estudiado con un antibiótico determinado a

una dosificación concreta es muy alta. Se clasifican como sensibles utilizando unos valores de puntos de corte establecidos con una metodología técnica estandarizada (CMI o diámetro de halo de inhibición). Hay muchos factores que pueden afectar a la respuesta clínica de un antibiótico frente a un microorganismo, como por ejemplo la biodisponibilidad del fármaco en el lugar de la infección, la interacción con otros fármacos o las características intrínsecas del propio paciente. Por esta razón, los puntos de corte clínicos pueden ser variables y modificados en determinadas circunstancias<sup>200,201</sup>.

- **Intermedio:** Se clasifica a un microorganismo como de sensibilidad intermedia a un antimicrobiano cuando no se tiene seguridad del éxito terapéutico del mismo. Esta clasificación se utiliza por ejemplo cuando el tratamiento con ese antibiótico sólo es óptimo si este se concentra en la localización anatómica de la infección o si se usa a altas dosis. Esta categoría también es utilizada para intentar evitar pequeñas variaciones debidos a las técnicas de laboratorio utilizadas que podrían llegar a tener grandes repercusiones clínicas al causar discrepancias de categoría<sup>200,201</sup>.
- **Resistentes:** Un microorganismo se define como resistente a un antibiótico cuando la probabilidad de éxito terapéutico es muy baja. Como se ha comentado anteriormente, la clasificación dentro de esta categoría se obtiene utilizando valores de puntos de corte estandarizados que pueden verse modificados en determinadas circunstancias clínicas<sup>200,201</sup>.

De esta manera, un microorganismo salvaje puede ser o no sensible a un determinado antibiótico para la resolución de una infección, de la misma manera que las cepas no salvajes o que presentan algún mecanismo de resistencia adquirido pueden llegar a ser eliminadas con determinados antimicrobianos dependiendo de la dosis utilizada o la localización de la infección.

### *1.9.3 Comités internacionales: EUCAST y CLSI*

Los puntos de corte que definen la sensibilidad y resistencia para un antimicrobiano, así como el desarrollo metodológico de las distintas técnicas se encuentran estandarizadas a través de distintas agencias y comités a nivel nacional como por

ejemplo, *Clinical of Laboratory Standards Institute* (CLSI, Estados Unidos), *Société Française Microbiologie* (SFM, Francia), *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC, Reino Unido), *Deutsches Institut für Normung* (DIN, Alemania), Comité Español del Antibiograma (COESANT, España), entre otros. Sin embargo, es cierto que la mayoría de países han ido decantándose en los últimos años por los dos principales comités a nivel mundial como son EUCAST (Europa) y CLSI (EEUU).

EUCAST es el organismo encargado de la estandarización de las metodologías y actualización de los puntos de corte a nivel europeo y forma parte de la sociedad ESCMID. Está financiado por la propia ESCMID, la Unión Europea y los comités para el establecimiento de puntos de corte de varios países europeos. EUCAST suministra toda esta información de manera gratuita a través de su página web, y se actualiza anualmente. Otras funciones que también desempeña este comité es la estandarización de las técnicas de sensibilidad a antimicrobianos y el establecimiento de puntos de corte para los nuevos antimicrobianos en desarrollo<sup>200,202</sup>.

Por otro lado, CLSI se describe a sí misma como un grupo internacional, interdisciplinar y sin ánimo de lucro que trabajan para el desarrollo consensuado de estándares de laboratorio con el fin de asegurar la calidad de los resultados de aquellos que los apliquen de forma voluntaria. Por lo que al establecimiento de puntos de corte se refiere, la organización ha desarrollado y publicado algoritmos en los que se indican los procedimientos exactos que se han de seguir para determinar la CMI del microorganismo que testamos así como los puntos de corte que hemos de aplicar para clasificarlo como sensible, intermedio o resistente. El establecimiento de estos puntos de corte tiene en cuenta características *in vitro* de los fármacos como la estabilidad, la farmacocinética y la farmacodinamia, la distribución de diferentes CMI dependiendo del origen geográfico de las cepas y la correlación de los resultados de las pruebas *in vitro* con la respuesta clínica entre otros factores<sup>203,204</sup>.

Con respecto a fosfomicina, los puntos de corte de sensibilidad para enterobacterias presentan diferencias según el comité que se utilice para interpretar los resultados de sensibilidad.

Mientras que para métodos de dilución CLSI utiliza las tres categorías (sensible  $\leq 64$   $\mu\text{g/ml}$ , intermedio 128  $\mu\text{g/ml}$ , resistente  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ ) y solo aconseja informar estos

resultados para infecciones del tracto urinario originadas por *E. coli*, EUCAST no presenta la categoría de intermedio, situando el punto de corte de sensibilidad en  $\leq 32$   $\mu\text{g/ml}$  y de resistente en  $>32$   $\mu\text{g/ml}$ . Además, EUCAST recomienda evaluar fosfomicina para el tratamiento por vía oral de la infección de orina no complicada. (Tabla 3)

De la misma manera, los puntos de corte para las técnicas de disco-difusión en agar también difieren entre comités, siendo para CLSI diámetros de halo de inhibición  $\geq 16$  mm sensibles, entre 13-15 mm intermedios y menores de  $\leq 12$  mm resistente y para EUCAST únicamente son sensibles las cepas con más o 22 mm de halo de inhibición y el resto se consideran resistentes<sup>191,196</sup>. (Tabla 4)

Puntos de corte para métodos de microdilución ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Sensible	Intermedio	Resistente
CLSI	$\leq 64$	128	$\geq 256$
EUCAST	$\leq 32$		32

**Tabla 3:** Resumen de los puntos de corte para métodos de microdilución para Enterobacterias en fosfomicina para los comités CLSI y EUCAST.

Puntos de corte para disco-difusión en agar (mm)			
	Sensible	Intermedio	Resistente
CLSI	$\geq 16$	13-15	$\leq 12$
EUCAST	$\geq 24$		24

**Tabla 4:** Resumen de los puntos de corte para métodos de difusión en agar para Enterobacterias en fosfomicina para los comités CLSI y EUCAST.

En la última actualización de los protocolos EUCAST se hace una puntualización sobre la manera en la que se deben medir estos halos de inhibición, y recomienda ignorar las colonias aisladas que puedan aparecer dentro del halo. De este modo sólo se tiene en cuenta el diámetro del halo de inhibición de la población general para la determinación del punto de corte<sup>191</sup>. (Figura 17)

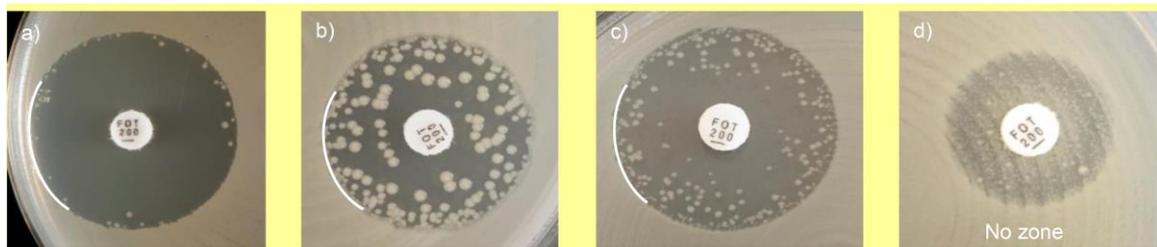


Figura 17: Ejemplos proporcionados por el comité EUCAST para la correcta medición de los diámetros de inhibición de fosfomicina en *E. coli*. Se recomienda ignorar las colonias aisladas en el interior del halo en los ejemplos A, B y C. La Figura D se considera que no existe zona de inhibición y por lo tanto se consideraría este aislado como resistente a fosfomicina<sup>191</sup>.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 Hipótesis

- 2.1.1 La pérdida de actividad de los transportadores UhpT y GlpT junto con alteraciones en su sistema de regulación causan resistencia a fosfomicina.
- 2.1.2 La CMI a fosfomicina es un buen predictor de la actividad de este antimicrobiano frente a *E. coli*.
- 2.1.3 La concentración del inóculo bacteriano juega un papel fundamental en la sensibilidad a fosfomicina, debido al enriquecimiento del cultivo, en subpoblaciones presentes en el inóculo inicial en cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.
- 2.1.4 Las diferencias en el inóculo inicial utilizado en las técnicas estandarizadas para la determinación de la sensibilidad a fosfomicina causan discrepancias en los valores de CMI.

## 2.2 Objetivos del estudio

### 2.2.1.1 Objetivos principales

- 1) Evaluar la contribución a la resistencia a fosfomicina de los genes implicados en el transporte intracelular de dicho antimicrobiano en un entorno genético controlado.
- 2) Demostrar el impacto de las diferencias en el inóculo inicial de los métodos de sensibilidad para la determinación de la CMI a fosfomicina.

### 2.2.1.2 Objetivos secundarios

- 1) Construir una colección isogénica de mutantes de delección simple ( $\Delta glpT$ ,  $\Delta uhpT$ ,  $\Delta cyaA$  y  $\Delta ptsI$ ) y doble delección ( $\Delta glpT-uhpT$ ,  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta glpT-ptsI$ ,

*ΔuhpT-cyaA*, *ΔuhpT-ptsI*, *ΔptsI-cyaA*) para evaluar su sensibilidad a fosfomicina.

- 2) Determinar la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a fosfomicina en la colección anterior y evaluar mediante curvas de letalidad la actividad de este antimicrobiano a concentraciones clínicamente relevantes.
- 3) Estudiar la CMI de cepas clínicas de *E. coli* y *K. pneumoniae* mediante dilución en agar y microdilución controlando el inóculo inicial de ambas técnicas.
- 4) Analizar los acuerdos de categoría clínica ente ambas técnicas en función de la metodología empleada.

## **3. PUBLICACIONES**



## Primer artículo

*J Antimicrob Chemother*  
doi:10.1093/jac/dkw573

Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy

## Molecular insights into fosfomycin resistance in *Escherichia coli*

M. Ballestero-Téllez<sup>1-3,†</sup>, F. Docobo-Pérez<sup>2-4,\*†</sup>, I. Portillo-Calderón<sup>1,2</sup>, J. M. Rodríguez-Martínez<sup>2-4</sup>, L. Racero<sup>1</sup>, M. S. Ramos-Guelfo<sup>1</sup>, J. Blázquez<sup>2,5</sup>, J. Rodríguez-Baño<sup>1-3,6</sup> and A. Pascual<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Unidad intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBISe/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>3</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; <sup>5</sup>Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34-954556196; E-mail: fdacobop@yahoo.es  
†Both authors have contributed equally to the manuscript.

Received 4 October 2016; returned 1 December 2016; revised 5 December 2016; accepted 12 December 2016

**Objectives:** Fosfomycin activity in *Escherichia coli* depends on several genes of unknown importance for fosfomycin resistance. The objective was to characterize the role of *uhpT*, *glpT*, *cyaA* and *ptsI* genes in fosfomycin resistance in *E. coli*.

**Methods:** WT *E. coli* BW25113 and null mutants,  $\Delta uhpT$ ,  $\Delta glpT$ ,  $\Delta cyaA$ ,  $\Delta ptsI$ ,  $\Delta glpT-uhpT$ ,  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta glpT-ptsI$ ,  $\Delta uhpT-cyaA$ ,  $\Delta uhpT-ptsI$  and  $\Delta ptsI-cyaA$ , were studied. Susceptibility to fosfomycin was tested using CLSI guidelines. Fosfomycin mutant frequencies were determined at concentrations of 64 and 256 mg/L. Fosfomycin *in vitro* activity was tested using time-kill assays at concentrations of 64 and 307 mg/L (human  $C_{max}$ ).

**Results:** Fosfomycin MICs were: WT *E. coli* BW25113 (2 mg/L),  $\Delta glpT$  (2 mg/L),  $\Delta uhpT$  (64 mg/L),  $\Delta cyaA$  (8 mg/L),  $\Delta ptsI$  (2 mg/L),  $\Delta glpT-uhpT$  (256 mg/L),  $\Delta glpT-cyaA$  (8 mg/L),  $\Delta glpT-ptsI$  (2 mg/L),  $\Delta uhpT-cyaA$  (512 mg/L),  $\Delta uhpT-ptsI$  (64 mg/L) and  $\Delta ptsI-cyaA$  (32 mg/L). In the mutant frequency assays, no mutants were recovered from BW25113. Mutants appeared in  $\Delta glpT$ ,  $\Delta uhpT$ ,  $\Delta cyaA$  and  $\Delta ptsI$  at 64 mg/L and in  $\Delta uhpT$  and  $\Delta cyaA$  at 256 mg/L.  $\Delta glpT-ptsI$ , but not  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta uhpT-cyaA$  or  $\Delta uhpT-ptsI$ , increased the mutant frequency compared with the highest frequency found in each single mutant. In time-kill assays, all mutants regrew at 64 mg/L. Initial bacterial reductions of 2–4 log<sub>10</sub> cfu/mL were observed for all strains, except for  $\Delta uhpT-ptsI$ ,  $\Delta glpT-uhpT$  and  $\Delta uhpT-cyaA$ . Only  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  mutants were cleared using 307 mg/L.

**Conclusions:** Fosfomycin MIC may not be a good efficacy predictor, as highly resistant mutants may appear, depending on other pre-existing mutations with no impact on MIC.

### Introduction

The continuous increase of antibiotic resistance reported worldwide in Enterobacteriaceae, together with the lack of new active compounds, has made it necessary to rescue old antibiotics as an alternative strategy.<sup>1</sup> Fosfomycin, currently used for uncomplicated urinary tract infections,<sup>2</sup> has attracted renewed interest due to its proven efficacy in the management of difficult-to-treat infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae.<sup>3</sup>

Fosfomycin is able to inhibit the enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA), which catalyses the initial step in peptidoglycan biosynthesis. The way in which fosfomycin reaches the cytosol and blocks MurA activity is under the control of complex metabolic networks. Two membrane transporters, belonging to the major facilitator superfamily, have been described in fosfomycin intake.<sup>4</sup> UhpT is a hexose phosphate transporter and

GlpT is the major *Escherichia coli* uptake system for glycerol-3-phosphate. In both cases, transport occurs with the simultaneous counterflow of inorganic phosphate from the bacteria.<sup>5</sup> UhpT expression is mediated by a two-component regulatory system (UhpBC), together with the regulon-specific activator (UhpA), and by catabolite repression, through the action of the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex (CRP, also known as CAP), which regulates the transcription of >100 catabolic genes.<sup>6,7</sup> Expression of the *glpT* gene is under the control of the repressor GlpR and is positively regulated by cAMP-CRP and FNR (the primary transcriptional regulator that mediates the transition from aerobic to anaerobic growth).<sup>8</sup> The transcription activator cAMP-CRP also plays an important role in the regulatory phenomenon known as carbon catabolite repression, by which the expression of functions

Ballesterro-Téllez *et al.***Table 1.** Oligonucleotide primers employed

Amplified gene	Primer	Sequence	Amplicon size (bp)
<i>murA</i>	ECmurAF	5'-AACAGCAGACGGTCTATGG-3'	1542
	ECmurAR	5'-CCATGAGTTTATCGACAGAACG-3'	
<i>glpT</i>	ECglpTF	5'-GCGAGTCGCGAGTTTCATTG-3'	1785
	ECglpTR	5'-GGCAAATATCCACTGGCACC-3'	
<i>uhpA</i>	ECuhpAF	5'-GATCGCGGTGTTTTTCAG-3'	771
	ECuhpAR	5'-GATACTCCACAGGCAAAAC-3'	
<i>uhpB</i>	ECuhpBF	5'-GAAAGAGATTGCCGCCGAAC-3'	1712
	ECuhpBR	5'-CGATAGCGGGCATCAATTC-3'	
<i>uhpC</i>	ECuhpCF	5'-GGGTGGCACATTACACATTTCC-3'	1531
	ECuhpCR	5'-CCTGAAATGAATACCTGCGTGAG-3'	
<i>uhpT</i>	ECuhpTF	5'-TTTTTGAACGCCAGACACC-3'	1667
	ECuhpTR	5'-AGTCAGGGGCTATTTGATGG-3'	
<i>crp</i>	ECcrpF	5'-CCCTTCGACCCACTTCACTC-3'	1032
	ECcrpR	5'-AATCAGTCTGCGCCACATCG-3'	
<i>cyaA</i>	ECcyaAF	5'-AACCAGGCGCAAAAGTGG-3'	2772
	ECcyaAR	5'-ACCTTCTGGGATTTGCTGG-3'	
	ECcyaAintF	5'-GTGCGACGAAGAAGCATTACG-3'	
<i>ptsI</i>	ECcyaAintR	5'-ATTGCTCGCCGTTGAAGTGC-3'	1232
	ECptsIF	5'-GAAAGCGGTTGAACATCTGG-3'	
	ECptsIR	5'-TCCTTCTTGTCTCGGAAAC-3'	

for the use of secondary carbon sources and the activities of the corresponding enzymes are reduced in the presence of a preferred carbon source.<sup>9</sup> Carbon catabolite repression in *E. coli* is regulated by the central processing unit, the glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component of the glucose transporter (EIIAGlc). When phosphorylated, EIIAGlc binds and activates adenylate cyclase (*cyaA*), which leads to cAMP synthesis. High cAMP concentrations trigger the formation of cAMP-CRP complexes, which bind and activate the promoters of catabolic genes. EIIAGlc is phosphorylated by phosphoenolpyruvate in a reaction requiring PtsH and PtsI.

The complexity of regulation affecting fosfomycin uptake and activity reflects the potential role of many genes in the susceptibility to fosfomycin. Excluding plasmid-mediated fosfomycin resistance due to the presence of *fos* genes, different studies have related chromosomal mutations in *murA*, *uhpT*, *uhpA*, *glpT*, *cyaA* and *ptsI* genes to fosfomycin resistance in clinical isolates.<sup>10-13</sup> However, the contribution made by each chromosomal mutation to global fosfomycin resistance is not well understood because mutations in these genes are often present in combination. In addition, fosfomycin-resistant isolates have been described without mutations in the genes.<sup>10-13</sup> A better understanding of the development of fosfomycin resistance would help support the rational design of fosfomycin susceptibility breakpoints based on the ability of some mutants susceptible to fosfomycin to reach high levels of resistance.

In the present study, the contribution of genes implicated in the intracellular transport of fosfomycin (*uhpT*, *glpT*, *cyaA* and *ptsI*) was evaluated using single- and double-gene deletion mutants in an isogenic collection of *E. coli*. The results provided insights into the development of fosfomycin resistance in *E. coli*.

## Materials and methods

### Bacterial strains

*E. coli* (BW25133) single-gene deletion mutants ( $\Delta$ *glpT*,  $\Delta$ *uhpT*,  $\Delta$ *cyaA* and  $\Delta$ *ptsI*) associated with fosfomycin resistance were selected from the KEIO collection.<sup>14</sup> The kanamycin resistance determinant was subsequently removed from the chromosome, following the protocol of Cherepanov and Wackernagel.<sup>15</sup> Briefly, the pCP20 plasmid was electroporated into each KEIO clone. Transformants were selected on LB agar plates containing chloramphenicol (30 mg/L; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and incubated at 30°C for 20–24 h. Then, five colonies were grown on drug-free LB agar plates and incubated at 43°C for 18 h to eliminate the pCP20 plasmid. Double-gene deletion mutants ( $\Delta$ *glpT-uhpT*,  $\Delta$ *glpT-cyaA*,  $\Delta$ *glpT-ptsI*,  $\Delta$ *uhpT-cyaA*,  $\Delta$ *uhpT-ptsI* and  $\Delta$ *ptsI-cyaA*) were generated by phage P1vir transduction [Coli Genetic Stock Center (CGSC), Yale University] from the previously selected strains, as described.<sup>16</sup>

For each single- and double-gene deletion mutant, the *murA*, *glpT*, *uhpA*, *uhpB*, *uhpC*, *uhpT*, *ptsI*, *crp* or *cyaA* genes were PCR amplified using specific primers (Table 1) and sequenced to confirm gene deletion and the absence of other possible mutations related to fosfomycin resistance.

### Susceptibility tests

Susceptibility testing for fosfomycin was performed in triplicate by the agar dilution method, following CLSI guidelines. Briefly, a replicator pin 1 mm in diameter transferred an inoculum of 10<sup>4</sup> cfu/spot of bacterial suspension to the agar surface. Mueller-Hinton II agar (MHA) plates (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) containing 25 mg/L glucose-6-phosphate (G6P) (Sigma-Aldrich) and fosfomycin (Sigma-Aldrich) at concentrations ranging from 0.25 to 1024 mg/L were prepared. The plates were allowed to dry and then incubated in ambient air for 16–20 h at 35°C. The MIC recorded was the lowest concentration of antimicrobial agent that completely inhibited growth, disregarding a single colony or a faint haze caused by the inoculum. *E. coli* ATCC 25922 was used as the control strain. Testing of susceptibility to

Fosfomicin resistance in *E. coli***Table 2.** Fosfomicin MIC and mutant frequency, selecting at fosfomicin concentrations of 64 and 256 mg/L, for single- and double-gene deletion mutant strains

Strain	Fosfomicin MIC (mg/L)	Fosfomicin mutant frequency (mean $\pm$ SD)	
		selecting at 64 mg/L	selecting at 256 mg/L
BW 25113	2	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$
$\Delta glpT$	2	$1.3 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-5}$	$<10^{-9}$
$\Delta uhpT$	64	$2.9 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-6} \pm 1.4 \times 10^{-6}$
$\Delta cyaA$	8	$1.4 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$	$4.7 \times 10^{-6} \pm 4.2 \times 10^{-6}$
$\Delta ptsI$	2	$9.7 \times 10^{-7} \pm 7 \times 10^{-8}$	$<10^{-9}$
$\Delta glpT-uhpT$	256	ND	$9.6 \times 10^{-1} \pm 6 \times 10^{-1}$
$\Delta glpT-cyaA$	8	ND	$1.2 \times 10^{-6} \pm 8.2 \times 10^{-7}$
$\Delta glpT-ptsI$	2	ND	$9.4 \times 10^{-7} \pm 6.6 \times 10^{-7}$
$\Delta uhpT-cyaA$	512	ND	$7.9 \times 10^{-1} \pm 5.8 \times 10^{-1}$
$\Delta uhpT-ptsI$	64	ND	$6.1 \times 10^{-6} \pm 4.4 \times 10^{-6}$
$\Delta ptsI-cyaA$	32	ND	$2.4 \times 10^{-6} \pm 2.3 \times 10^{-6}$

ND, not done.

fosfomicin was interpreted according to CLSI breakpoints (resistant  $\geq 256$  mg/L, intermediate 128 mg/L and susceptible  $\leq 64$  mg/L).

### Fosfomicin mutant frequency

Mutant frequencies were assessed for the four single and six double mutants. WT strain *E. coli* BW25113 was included as a control. The mutant frequency for fosfomicin resistance was determined as follows. An overnight culture of each strain ( $\sim 10^9$  cfu/mL) was diluted 1:10<sup>7</sup> to avoid the presence of mutants in the initial culture. An initial inoculum of  $\sim 10^2$  cfu/mL was then incubated overnight in Mueller–Hinton broth (MHB) and subsequently placed on drug-free plates (to calculate the total bacterial concentration) and on MHA II-G6P plates containing fosfomicin (to estimate the subpopulation able to grow at this antimicrobial concentration). Mutants were isolated from MHA II-G6P plates supplemented with fosfomicin at concentrations of 64 and 256 mg/L for single-gene deletions and 256 mg/L for double-gene deletions. Plates were incubated for 48 h at 37°C. The experiments were performed in quintuplicate. Fosfomicin mutant frequencies of each single mutant and its corresponding double mutant were compared using ANOVA and the *post hoc* Tukey and Dunnett tests. Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 (IBM, Armonk NY, USA).  $P < 0.05$  was considered significant.

### In vitro fosfomicin activity by time–kill curves

*In vitro* fosfomicin activity was assessed by time–kill curves as follows. A starting bacterial inoculum of 10<sup>6</sup> cfu/mL was used and fosfomicin concentrations of 64 mg/L (the highest susceptible concentration according to current CLSI breakpoints) and 307 mg/L (mean maximum plasma concentration in humans observed at steady-state after a dose of 8 g fosfomicin every 8 h) were tested.<sup>17</sup> Experiments were performed in MHB II-G6P (20 mL). Bacterial growth was quantified at 0, 4, 24 and 48 h after incubation, with shaking at 37°C. Samples were properly diluted in 100-fold dilutions and plated on to MHA II plates to estimate viable numbers.

### Fosfomicin-resistant mutants from time–kill curves

When bacterial regrowth was observed after 48 h on the time–kill curves, up to five colonies were selected to assess the MIC of fosfomicin and genotype changes. The isolated mutants were serially passaged five times on fosfomicin-free plates to assess the stability of the phenotype. Fosfomicin

MIC was determined as previously stated. Owing to the stability of the resistance phenotype, mutants recovered from each condition were sequenced looking for additional mutations in *murA*, *glpT*, *uhpA*, *uhpB*, *uhpC*, *uhpT*, *ptsI*, *crp* and *cyaA* genes.

## Results

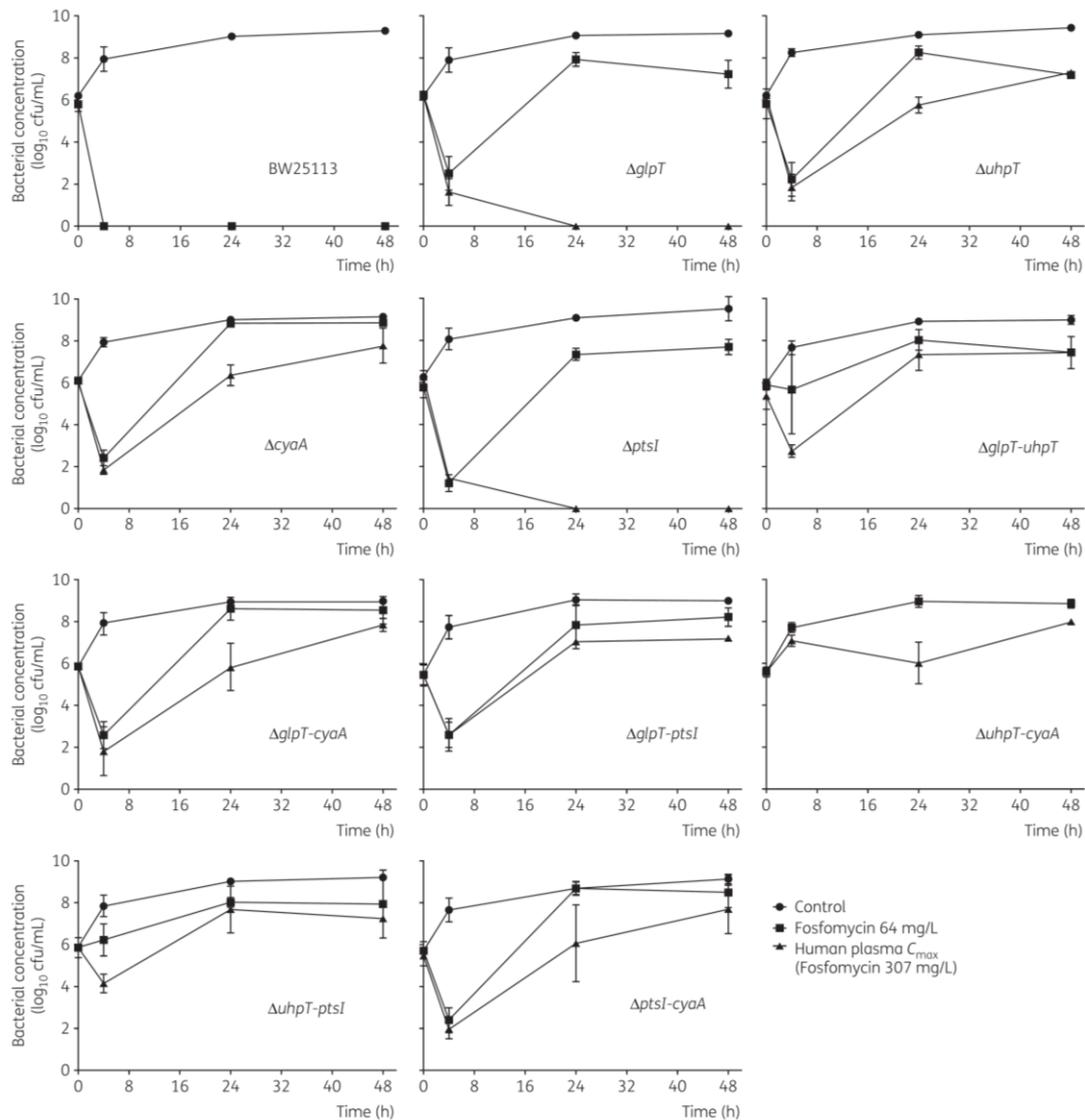
### Contribution of single and double mutants to fosfomicin resistance

The fosfomicin MICs for the isogenic collection are shown in Table 2. No increase in MIC was observed for the  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  strains with respect to the WT strain (2 mg/L). Of the single-gene deletion variants/mutants, only loss of the *cyaA* or *uhpT* genes caused a 4- and 32-fold increase, respectively, in the fosfomicin MIC. All the single-gene deletion mutants were susceptible to fosfomicin. The combined mutations of  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta glpT-ptsI$  and  $\Delta uhpT-ptsI$  showed no synergistic effect on fosfomicin resistance. However,  $\Delta ptsI-cyaA$ ,  $\Delta glpT-uhpT$  and  $\Delta uhpT-cyaA$  led to a 4–8-fold increase in the MIC of fosfomicin relative to the highest MIC of the single-gene mutant alone. In spite of carrying two deleted genes,  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta glpT-ptsI$ ,  $\Delta uhpT-ptsI$  and  $\Delta ptsI-cyaA$  were susceptible, while  $\Delta glpT-uhpT$  and  $\Delta uhpT-cyaA$  were resistant to fosfomicin according to CLSI guidelines.

### Variations in fosfomicin mutant frequency

Fosfomicin mutant frequencies for the isogenic collection at 64 and 256 mg/L are shown in Table 2. No mutants were recovered from the BW25113 strain at any of the fosfomicin concentrations tested. Inactivating mutations in the *glpT*, *cyaA* and *ptsI* genes led to the selection of mutants at 64 mg/L. However, neither the  $\Delta glpT$  nor  $\Delta ptsI$  strains was able to produce colonies at 256 mg/L, in contrast to  $\Delta cyaA$  and  $\Delta uhpT$ . The  $\Delta uhpT$  strain, with an MIC of 64 mg/L, showed a mutation frequency of  $2.9 \times 10^{-5}$  using the MIC for selection. This result would appear to indicate that, in this mutant, an MIC of 64 mg/L could be caused by part of the bacterial population. Conversely, a mutation frequency close to 1, observed

Ballestero-Téllez et al.



**Figure 1.** Time-kill curves for *E. coli* single-gene deletion mutants ( $\Delta glpT$ ,  $\Delta uhpT$ ,  $\Delta cyaA$  and  $\Delta ptsI$ ) and double-gene deletion mutants ( $\Delta glpT-uhpT$ ,  $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta glpT-ptsI$ ,  $\Delta uhpT-cyaA$ ,  $\Delta uhpT-ptsI$  and  $\Delta ptsI-cyaA$ ), using 64 and 307 mg/L fosfomycin.

in  $\Delta glpT-uhpT$  and  $\Delta uhpT-cyaA$  strains, with MICs of 256 and 512 mg/L respectively, indicates that the majority of the bacterial population share this susceptibility.

It is important to note the increase in the fosfomycin mutant frequency in the double mutant  $\Delta glpT-ptsI$  ( $9.4 \times 10^{-7}$ ) with respect to each single mutant ( $<10^{-9}$ ). The other double mutants ( $\Delta glpT-cyaA$ ,  $\Delta uhpT-ptsI$ ) did not significantly increase the mutant

frequency relative to the highest frequency observed in each single mutant.

#### **In vitro fosfomycin activity in time-kill curves**

The time-kill curves are represented in Figure 1. Fosfomycin showed rapid bactericidal activity against BW25113 at both

Fosfomycin resistance in *E. coli***Table 3.** Changes in susceptibility to fosfomycin and mutations found in recovered strains after the time–kill experiments using fosfomycin concentrations of 64 and 307 mg/L

Strain	Time–kill fosfomycin concentration (mg/L)	MIC (mg/L)		Mutation found
		original	final	
$\Delta glpT$	64	2	>1024	<i>uhpT</i> 1326delT frameshift
$\Delta uhpT$	64	64	>1024	<i>crp</i> 301_341del
	307			none
$\Delta cyaA$	64	8	>1024	<i>uhpB</i> 48delT frameshift
	307			<i>uhpC</i> (G81A Thr27Stop)
$\Delta ptsI$	64	2	>1024	<i>uhpT</i> (C1033T Gln345Stop)
$\Delta glpT$ - <i>uhpT</i>	64	256	>1024	none
	307			none
$\Delta glpT$ - <i>cyaA</i>	64	8	>1024	<i>uhpC</i> 541_548del
	307			<i>uhpB</i> (C784T Gln262Stop)
$\Delta glpT$ - <i>ptsI</i>	64	2	>1024	<i>uhpC</i> (A214C, Thr72Pro)
	307			<i>uhpB</i> (A543G Trp181Stop)
$\Delta uhpT$ - <i>cyaA</i>	64	512	>1024	none
	307			none
$\Delta uhpT$ - <i>ptsI</i>	64	64	>1024	<i>glpT</i> 659_724del
	307			<i>glpT</i> 659_724del
$\Delta ptsI$ - <i>cyaA</i>	64	32	>1024	<i>uhpB</i> (T764A Leu255Stop)
	307			<i>uhpT</i> 541_928del

concentrations tested. In our isogenic collection, a 2–4 log<sub>10</sub> cfu/mL reduction in colony count was observed within the first 4 h with both antibiotic concentrations, with the exception of the  $\Delta ptsI$ -*cyaA*,  $\Delta uhpT$ -*ptsI*,  $\Delta glpT$ -*uhpT* and  $\Delta uhpT$ -*cyaA* mutants with MICs of 32, 64, 256 and 512 mg/L, respectively. With the exception of WT *E. coli* BW25113, all strains evaluated using 64 mg/L fosfomycin showed regrowth, even though their MICs were below this concentration after 24 h incubation. Similar results were achieved using 307 mg/L fosfomycin, where all the mutants regrew, except for  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  mutants, the two with the lowest MICs (2 mg/L). It is noteworthy that the  $\Delta uhpT$  mutant, despite having an MIC of 64 mg/L, showed a high bacterial reduction using 1 × MIC of fosfomycin.

Overall, the results fit well with those obtained in the fosfomycin mutant frequency experiments. Those strains with a mutant frequency close to or >10<sup>-6</sup> for any fosfomycin concentration showed bacterial regrowth during the time–kill experiments.

**Mutant analysis**

Five colonies of each mutant recovered at the 24 h time point were selected. After five serial passages on fosfomycin-free plates, the stability of the mutants was confirmed. All recovered strains showed fosfomycin MICs of >1024 mg/L, regardless of the fosfomycin concentration at which they were selected or their initial susceptibility.

The characteristics of the fosfomycin-resistant strains are described in Table 3. Most of the mutations lay in the *uhp* operon, except when *uhpT* had previously been deleted. In these cases, mutations in *glpT* or *crp* were observed. No additional mutations were found in  $\Delta glpT$ -*uhpT* or  $\Delta uhpT$ -*cyaA*.

**Discussion**

Fosfomycin is a broad-spectrum bactericidal antibiotic, which requires intracellular transport to block the first step of peptidoglycan synthesis. Fosfomycin resistance has been associated with plasmid-encoded inactivating enzymes or chromosomal mutations in genes related to the fosfomycin target (*murA*) or to fosfomycin intake (*glpT*, *uhpA*, *uhpT*, *cyaA* or *ptsI*).<sup>10–13</sup> These mutations often appear in combination and the contribution of each gene to the fosfomycin resistance remains unknown. In the present study, the importance of the main chromosomal genes related to fosfomycin susceptibility was analysed. The results presented here show that the presence of these chromosomal mutations alone, or even in selected combinations, increases the MIC of fosfomycin, but does not confer resistance according to current susceptibility breakpoints (i.e. MIC <256 mg/L).<sup>18</sup> In our conditions, this means that fosfomycin resistance is not caused by a single-step mutation, but that a sequential process of mutations is required. This is important because the addition of G6P to the medium used for susceptibility testing may mask mutants unrelated to the hexose phosphate transporter (*UhpT*) and so yield low fosfomycin MIC values. In such cases, the presence of these single mutations may yield a fosfomycin-susceptible phenotype, but will facilitate the selection of highly resistant subpopulations when additional mutations appear; in this regard, this effect may be caused by deletions in the *glpT* or *ptsI* genes. WT *E. coli* BW25113 and the  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  strains had the same fosfomycin MIC, although the presence of these single mutations with no apparent effect on the MIC led to changes in mutant frequency from >10<sup>-9</sup> to 1.3 × 10<sup>-5</sup> ( $\Delta glpT$ ) or 9.7 × 10<sup>-7</sup> ( $\Delta ptsI$ ). As a result of this effect, BW25113,  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  strains behaved differently in the presence of fosfomycin.

Ballestero-Téllez *et al.*

Bacterial regrowth was observed in the time-kill experiments performed with  $\Delta glpT$  and  $\Delta ptsI$  strains when fosfomycin concentrations were 32 times (64 mg/L) higher than the MIC value (2 mg/L). This result was consistent with the mutant frequency observed for this fosfomycin concentration and an initial bacterial concentration of  $10^6$  cfu/mL (in 20 mL volume). Thus, bacterial subpopulations with increased MICs were present at the beginning of the assay and then selected for by the presence of fosfomycin. In the time-kill experiments, the absence of regrowth in higher concentrations (307 mg/L) occurred because the higher concentration of fosfomycin prevented the selection of highly resistant mutants, correlating also with the mutant frequency ( $>10^{-9}$ ) observed at concentrations of 256 mg/L.

The other single mutants,  $\Delta uhpT$  (MIC of 64 mg/L) and  $\Delta cyaA$  (MIC of 8 mg/L), both susceptible, behaved similarly, with regrowth at 64 and 307 mg/L fosfomycin, due to the appearance of mutations in the cAMP-CRP complex and *uhp* operon, respectively.

It should be noted that no additional mutations were found in  $\Delta glpT$ -*uhpT* or  $\Delta uhpT$ -*cyaA*. Taking into account their high fosfomycin MIC, this could indicate the existence of additional mechanisms in the cell that could lead to extremely high levels of resistance.

A limitation of the present study could be the use of a bacterial collection made up of gene deletions instead of point mutations. Using this strategy, comparison of  $\Delta murA$  mutants could not be performed as the *murA* gene is essential for cell viability and could not be deleted.<sup>14</sup> *murA* point mutations are not the most common mutation found in fosfomycin-resistant isolates.<sup>11–13</sup> The high frequency of mutations in the *uhp* operon could also be explained by the mutant selection conditions. The use of G6P with fosfomycin preferably selects mutants in the hexose phosphate transport system rather than others.

The use of fixed concentrations in the time-kill assays may not reflect the *in vivo* response of fosfomycin. Nevertheless, consistent with the present results, the importance of pre-existing subpopulations involved in fosfomycin therapeutic failure has been observed previously, both in our work and by other authors using *in vitro* dynamic infection models.<sup>19,20</sup> Thus, it is important to select a rational starting dose for fosfomycin aimed at eliminating subpopulations with increased MICs that are sometimes not detected in susceptibility tests but are able to acquire additional mutations and become highly resistant.

Finally, as the number of mutants and genes analysed was limited, and taking into account the complexity of the regulatory networks affecting the metabolic pathways involved, we were unable to exclude the role of other genes that affected the susceptibility to fosfomycin.

In conclusion, the fosfomycin MIC may not be a good predictor of efficacy. Highly resistant mutants may appear, depending on other pre-existing mutations that have no impact on the MIC obtained with commonly used susceptibility testing methods.

These findings provide information that contributes to a better understanding of the impact of different mutations on fosfomycin activity and point to the need for a method to evaluate fosfomycin activity *in vitro* that is able to predict the appearance of resistant mutants as they occur during fosfomycin therapy.

## Funding

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (PI13/01885 and PI 13/01282) and the Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Junta de Andalucía (PI-0044-2013), Spain. It was partly supported by the Plan Nacional de I + D + i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015)—co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF. F. D.-P. is supported by a VPPI-US fellowship from the University of Sevilla.

## Transparency declarations

J. R.-B. acts as scientific advisor for AstraZeneca, Merck and Achaogen, has been a speaker for AstraZeneca, Merck, Pfizer and Astellas, and has received funding for research from the COMBACTE, COMBACTE-CARE and COMBACTE-MAGNET projects, Innovative Medicines Initiative (IMI), funded by the European Union and EFPIA companies. All other authors: none to declare.

## References

- 1 Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G *et al.* Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev* 2016; **29**: 321–47.
- 2 Zhanel GG, Walkty AJ, Karlowsky JA. Fosfomycin: a first-line oral therapy for acute uncomplicated cystitis. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016; **2016**: 2082693.
- 3 Veve MP, Wagner JL, Kenney RM *et al.* Comparison of fosfomycin to ertapenem for outpatient or step-down therapy of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48**: 56–60.
- 4 Marger MD, Saier MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 13–20.
- 5 Ambudkar SV, Larson TJ, Maloney PC. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9083–6.
- 6 Kadner RJ, Murphy GP, Stephens CM. Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1992; **138**: 2007–14.
- 7 Merkel TJ, Nelson DM, Brauer CL *et al.* Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* gene. *J Bacteriol* 1992; **174**: 2763–70.
- 8 Yang B, Gerhardt SG, Larson TJ. Action at a distance for *glp* repressor control of *glpTQ* transcription in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 1997; **24**: 511–21.
- 9 Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 613–24.
- 10 Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O *et al.* Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2850–8.
- 11 Takahata S, Ida T, Hiraishi T *et al.* Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 333–7.
- 12 Tseng S-P, Wang S-F, Kuo C-Y *et al.* Characterization of fosfomycin resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS One* 2015; **10**: e0135864.
- 13 Li Y, Zheng B, Li Y *et al.* Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in mainland China. *PLoS One* 2015; **10**: e0135269.
- 14 Baba T, Ara T, Hasegawa M *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006; **2**: 2006.0008.

Fosfomycin resistance in *E. coli*

JAC

- 15** Cherepanov PP, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc<sup>R</sup> and Km<sup>R</sup> cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995; **158**: 9–14.
- 16** Thomason LC, Costantino N, Court DL. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr Protoc Mol Biol* 2007; **79**: 1.17.1–1.17.8.
- 17** Pfausler B, Spiss H, Dittrich P et al. Concentrations of fosfomycin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**: 848–52.
- 18** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- 19** Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A et al. Pharmacodynamics of fosfomycin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 5602–10.
- 20** VanScoy BD, McCauley J, Ellis-Grosse EJ et al. Exploration of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for fosfomycin efficacy using an in vitro infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7170–7.



## Segundo artículo

Contents lists available at [ScienceDirect](http://ScienceDirect)

## Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)

Original article

## Role of inoculum and mutant frequency on fosfomycin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in *Enterobacteriaceae*

M. Ballester-Téllez<sup>1,2,6</sup>, F. Docobo-Pérez<sup>2,3,4,\*</sup>, J.M. Rodríguez-Martínez<sup>2,3,4</sup>,  
M.C. Conejo<sup>3</sup>, M.S. Ramos-Guelfo<sup>1</sup>, J. Blázquez<sup>2,4</sup>, J. Rodríguez-Baño<sup>1,2,4,5</sup>,  
A. Pascual<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Unidad intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Biomedicina de Sevilla IBIS, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

<sup>4</sup> Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>5</sup> Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 July 2016

Received in revised form

4 November 2016

Accepted 22 December 2016

Available online xxx

Editor: G. Greub

## Keywords:

Bacterial subpopulation

Fosfomycin

Heteroresistance

Mutant frequency

Susceptibility test

## ABSTRACT

**Objectives:** Fosfomycin is re-evaluated as a treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* infections. However, MIC differences have been described among the different susceptibility testing. The aim was to study the role of the different inoculum size used in agar dilution with respect to broth microdilution, according to CLSI, in the fosfomycin MIC discrepancies.

**Methods:** Fosfomycin MICs were determined using agar dilution (reference) and broth microdilution in 220 *Escherichia coli* ( $n = 81$ ) and *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 139$ ) clinical isolates. Fosfomycin mutant frequencies were determined in 21 *E. coli* (MIC = 1 mg/L) and 21 *K. pneumoniae* (MIC = 16 mg/L). The emergence of resistant subpopulations of five *E. coli* strains (MIC = 1 mg/L) was monitored over the time by microdilution assay using 0, 4 and 8 mg/L of fosfomycin, and eight different inocula ( $5 \times 10^3$ – $3.91 \times 10^3$  CFU/well, 1 : 2 dilutions).

**Results:** For *E. coli*, 86.4% of categorical agreement (CA), 9.1% very major errors (VME), 3.3% major errors (ME) and 9.9% minor errors (mE) were found. For *K. pneumoniae*, CA was 51.1%, VME 15.7%, ME 28.4% and mE 25.2%. Essential agreement ( $\pm 1$ -log<sub>2</sub>) was observed in 55.45%. By microdilution, 35.9% of the MICs showed discrepancies of  $\geq 2$  dilutions. Initial inoculum used was 5.63 times higher in the microdilution method, in range with CLSI methodology for both techniques. Fosfomycin mutant frequencies were  $6.05 \times 10^{-5}$  (4  $\times$  MIC) to  $5.59 \times 10^{-7}$  (256  $\times$  MIC) for *E. coli*, and  $1.49 \times 10^{-4}$  (4  $\times$  MIC) to  $1.58 \times 10^{-5}$  (16  $\times$  MIC) for *K. pneumoniae*. Resistant subpopulations arose mainly after 8 h of incubation with inocula  $> 3.13 \times 10^4$  CFU/well.

**Conclusions:** The higher inoculum used in the microdilution method enriched the initial inoculum with resistant subpopulations and could partially explain the fosfomycin MIC discrepancies with respect to the agar dilution method. **M. Ballester-Téllez, CMI 2017;•1**

© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Fosfomycin is a first-line agent for the empirical treatment of acute uncomplicated cystitis in women [1]. Due to the shortage of new antimicrobial agents, there is a renewed interest in using fosfomycin for the treatment of serious systemic infections caused by multidrug-resistant bacteria [2–4]. Recent studies have

\*Corresponding author. F. Docobo-Pérez, Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

E-mail address: [fdocobop@yahoo.es](mailto:fdocobop@yahoo.es) (F. Docobo-Pérez).

<sup>6</sup> Both M. Ballester-Téllez and F. Docobo-Pérez contributed equally to the manuscript.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.022>

1198-743X/© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

shown that many extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* remain susceptible to fosfomicin [5–8].

The current susceptibility breakpoint for fosfomicin is set as  $\leq 64$  mg/L by CLSI, only for testing and reporting of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* urinary tract isolates. According to CLSI, the only approved MIC method for testing the fosfomicin susceptibility is agar dilution, using Mueller–Hinton agar plates supplemented with 25 mg/L of glucose-6-phosphate, whereas broth microdilution MIC testing should not be performed [9,10]. However, because agar dilution is a tedious and time-consuming method with respect to other susceptibility tests, it is not routinely used in the microbiology laboratories. In spite of broth microdilution being an inadvisable technique for fosfomicin, it is the base of most automated susceptibility tests. Moreover, different studies have shown disagreements in the fosfomicin susceptibility among broth microdilution, Etest or disc diffusion tests, with respect to the reference method [6,11,12]. Hence, it is not clear what is the most reliable technique to estimate fosfomicin susceptibility.

Fosfomicin heteroresistance has been described in *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* [13,14]. However, the role played by these subpopulations in the outcome of infections treated with fosfomicin, or the discrepancies observed in the fosfomicin susceptibility tests are not well known.

In this regard, we and other authors have recently observed, using *in vitro* infection models, how subpopulations with increased MIC may compromise the activity of fosfomicin due to the selection of highly resistant mutants, displacing the more susceptible populations, when the antimicrobial is present [4,15]. The amount of population with heterogeneous susceptibility depends on the mutant frequency and the total bacterial concentration.

The CLSI guidelines for performing the agar dilution and broth microdilution susceptibility test methods differ in the starting bacterial concentration and hence the concentration of heteroresistant subpopulations [9].

In the present work, we study the importance of the initial bacterial inoculum together with the fosfomicin mutant frequency in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates, as a factor contributing to the observed discrepancies in the fosfomicin MIC obtained by agar dilution and broth microdilution methods.

## Material and methods

### Strains

A total of 220 *E. coli* ( $n = 81$ ) and *K. pneumoniae* ( $n = 139$ ) isolates were recovered from urine, blood, bile or abdominal samples, in the Virgen Macarena University Hospital from January to July 2013. Microorganisms were identified using both a MicroScan system (Siemens, West Sacramento, CA, USA) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Germany), according to the manufacturer's instructions.

### Susceptibility tests methods

Agar dilutions were performed in triplicate following CLSI standards [9]. Bacterial cultures were adjusted to the 0.5 McFarland standard (c.  $1 \times 10^8$  to  $2 \times 10^8$  CFU/mL). Replicators with 1-mm pins that deliver 0.1–0.2  $\mu$ L (i.e.  $10^4$  CFU/spot) were used to place the bacterial suspension onto the agar surface within 15 min of preparation.

Mueller–Hinton II agar (MHA) plates (Becton–Dickinson, Sparks, MD, USA) containing 25 mg/L of glucose-6-phosphate (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) and fosfomicin (Sigma–Aldrich)

concentrations from 0.25 mg/L to 1024 mg/L were prepared. Plates were allowed to dry and incubated for 16–20 h in ambient air at 35°C.

MIC was recorded as the lowest concentration of antimicrobial agent that completely inhibits growth, disregarding a single colony or a faint haze caused by the inoculum [9].

Broth microdilution method was performed using two different starting inocula as follows [9]. Assays were performed using Mueller–Hinton II broth (MHB) supplemented with 25 mg/L glucose-6-phosphate. Fosfomicin concentrations ranged from 0.25 to 1024 mg/L. Initial bacterial densities of c.  $2 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  CFU/mL in 100  $\mu$ L of volume (i.e.  $2 \times 10^4$  to  $8 \times 10^4$  CFU/well) (according to the CLSI standards) or c.  $1 \times 10^5$  CFU/mL in 100  $\mu$ L of volume (i.e.  $1 \times 10^4$  CFU/well) (similar to the agar dilution starting inoculum) were used. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as control strains. Modal MIC was used in subsequent calculations. Initial bacterial inocula used for both techniques were quantified by plating 1 : 100 dilutions in MHA plates.

Categorical agreement (CA) was defined as test results within the same susceptibility category. Very major errors (VME) were defined as those in which the microdilution method result was susceptible and resistant by agar dilution method. Major errors (ME) were defined as those in which the microdilution method result was resistant and the agar dilution method result was susceptible. Finally, minor errors (mE) were defined as those in which either method reported a result as intermediate and the other method reported the result as susceptible or resistant. Denominators for calculating error rates, based on broth microdilution results, were as follows: the number of resistant isolates (VME rate), the number of susceptible isolates (ME rate), and the total number of isolates tested (CA and mE) [16]. Essential agreement was calculated by determining the number of test results that were within  $\pm 1$  doubling dilution of the MIC determined by the reference method. Agreements between agar dilution and broth microdilutions were evaluated by a Bland–Altman plot [17]. The Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparison tests were used for comparing MIC distributions obtained with the different methods and conditions. Statistical significance was established at a p value of  $< 0.05$ . Values for the  $\kappa$  coefficient, which gives a measure of the percentage of agreement between the categorical results of susceptibility testing methods, were interpreted according to classifications by Landis and Koch [18]. Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 (IBM, Chicago, IL, USA).

### Fosfomicin mutant frequency

The mutant frequencies were assessed in a subset of 21 *E. coli* (MIC = 1 mg/L) and 21 *K. pneumoniae* (MIC = 16 mg/L) isolates, with the lowest MIC found in our collection. The fosfomicin mutant frequency was determined as follows. An overnight culture of each strain (c.  $10^9$  CFU/mL) was diluted 1 :  $10^7$  to avoid the presence of mutants in the initial culture. Then, a starting inoculum of  $\sim 10^2$  CFU/mL was incubated overnight in MHB, and finally plated in drug-free (to calculate the total bacterial concentration) or drug-containing MHA plates (to estimate the subpopulation able to grow at this antimicrobial concentration).

Mutants were recovered in MHA plates supplemented with 25 mg/L of glucose-6-phosphate and a range of fosfomicin concentrations ( $4 \times$ ,  $16 \times$ ,  $64 \times$  and  $256 \times$  MIC for *E. coli* and  $4 \times$  and  $16 \times$  MIC for *K. pneumoniae*). After 48 h of incubation at 37°C, up to five colonies were picked and changes in the fosfomicin MIC were confirmed by the agar dilution method as previously described. The experiments were carried out in duplicate.

### Subpopulations growth monitoring

To evaluate the critical inoculum that selects resistant subpopulations, both resistant subpopulations and total bacterial population were monitored over the time for six *E. coli* strains. The strains were selected with a fosfomicin MIC of 1 mg/L to observe the appearance of wide susceptibility variations, and a range of fosfomicin mutant frequencies from  $10^{-4}$  to  $10^{-7}$  to cover the observed mutant frequency in the previous experiment.

The time-course of the bacterial growth was monitored over time by measuring each 60 min the increase in optical density at 595 nm during 24 h at 37°C, using the multimode microplate reader Infinite 200Pro (Tecan Group AG, Männedorf, Switzerland). Bacterial strains were grown in 96-well flat-bottom plates (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen, Germany) with MHB containing 25 mg/L of glucose-6-phosphate and fosfomicin concentrations of 0 mg/L (growth control), 4 mg/L or 8 mg/L. Eight different bacterial inocula were used in each assay and were prepared as follows. A 200-fold dilution from an adjusted 0.5 McFarland bacterial suspension (i.e.  $\sim 5 \times 10^5$  CFU/well) was used as starting inoculum, and then, 1 : 2 dilutions were subsequently performed. The bacterial concentrations in the microtitre plate ranged from  $5 \times 10^5$  CFU/well to  $3.91 \times 10^3$  CFU/well in a volume of 100  $\mu$ L. Each condition was replicated four times in each plate using the same overnight inoculum. After 24 h of incubation, selected fosfomicin-containing wells with bacterial growth were taken and fosfomicin MIC was determined by agar dilution as described above.

## Results

### Susceptibility testing

Using the agar dilution method as reference, 150 isolates were susceptible, nine intermediate and 63 resistant to fosfomicin according to the CLSI breakpoints (Table 1). The comparison between the modal MICs obtained with broth microdilution with those obtained using agar dilution made by the Bland–Altman analysis

(Fig. 1) revealed large limits of agreement between 2.78 and  $-4.68$  of the  $\log_2$ -transformed data of both measurements. The median MIC obtained by agar dilution, broth microdilution with standard inoculum and broth microdilution with low inoculum and were 32 mg/L, 128 mg/L and 32 mg/L ( $p < 0.01$ ), respectively. Higher dispersion of the MIC correlations was observed with the progressive increase of the MIC.

The starting bacterial concentration of the microdilution method with standard inoculum was 5.63-fold higher than the agar dilution method. This result was in range with the ratio (two-fold to eight-fold) between the initial bacterial concentration set by the CLSI guidelines for the agar dilution method ( $10^4$  CFU/spot) and the broth microdilution method ( $2 \times 10^4$  to  $8 \times 10^4$  CFU/well, i.e.  $2 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  CFU/mL for a 100- $\mu$ L assay volume).

The percentages of agreement between both methods at different inocula are shown in Table 1 for *E. coli* and *K. pneumoniae*. An increase of the  $\kappa$ -values from 0.210 (0.169 for *E. coli* and 0.209 for *K. pneumoniae*) to 0.361 (0.298 for *E. coli* and 0.345 for *K. pneumoniae*) were observed with the reduction of the starting inoculum in the microdilution method. This indicates a fair agreement between the two techniques with independence of the bacterial concentration used. However, essential agreement ( $\pm 1$ -log<sub>2</sub>) increased from 55.3%, using the standard inoculum in broth microdilution method, to 75.6% when the low inoculum was used.

### Fosfomicin mutant frequency

Similar mutant frequencies were found for *E. coli* and *K. pneumoniae* for 4 $\times$  and 16 $\times$  MIC. Fosfomicin mean (95% lower–upper CI) mutant frequencies among the *E. coli* clinical isolates were:  $6.05 \times 10^{-5}$  ( $1.92 \times 10^{-5}$  to  $1.02 \times 10^{-4}$ , 4  $\times$  MIC),  $5.21 \times 10^{-6}$  ( $1.82 \times 10^{-6}$  to  $8.6 \times 10^{-6}$ , 16  $\times$  MIC),  $4.37 \times 10^{-6}$  ( $1.41 \times 10^{-6}$  to  $7.33 \times 10^{-6}$ , 64  $\times$  MIC), and  $5.59 \times 10^{-7}$  ( $1.82 \times 10^{-7}$  to  $9.36 \times 10^{-7}$ , 256  $\times$  MIC). For *K. pneumoniae* the values were:  $1.49 \times 10^{-4}$  ( $4.43 \times 10^{-5}$  to  $2.53 \times 10^{-4}$ , 4  $\times$  MIC), and  $1.58 \times 10^{-5}$  ( $1.75 \times 10^{-6}$  to  $2.99 \times 10^{-5}$ , 16  $\times$  MIC). Individual results are plotted in Fig. 2. The large range of mutant frequencies

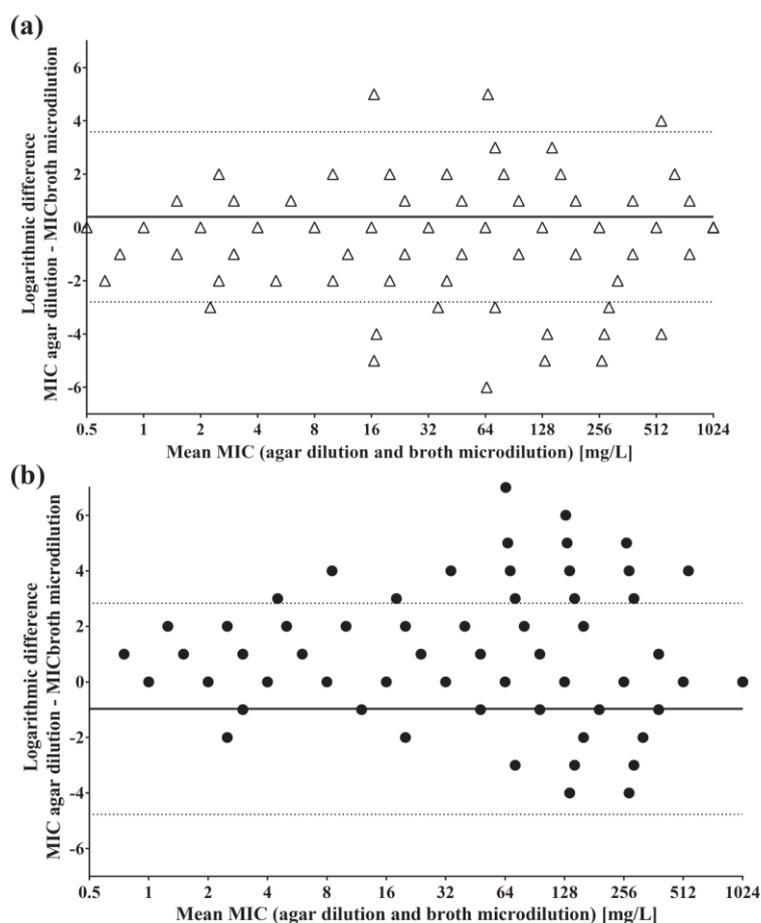
**Table 1**

Fosfomicin susceptibility performed by agar dilution method and percentage of agreement between agar dilution and broth microdilution methods using different inocula

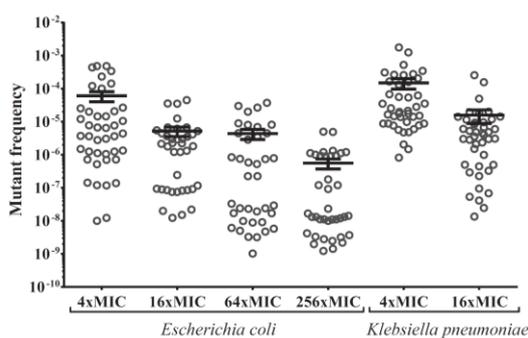
<i>Escherichia coli</i> (n = 81)		Susceptible	Intermediate	Resistant
		n = 59	n = 9	n = 13
Agreement	Inoculum	n	%	95% CI
Categorical agreement	SI	68	83.95	7.99
	LI	66	81.48	8.46
Very major error	SI	1	7.69	14.49
	LI	2	15.38	19.61
Major error	SI	4	6.78	6.41
	LI	0	0	0
Minor error	SI	12	14.81	7.74
	LI	15	18.52	8.46
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 139)		Susceptible	Intermediate	Resistant
		n = 90	n = 0	n = 49
Agreement	Inoculum	n	%	95% CI
Categorical agreement	SI	72	51.80	8.31
	LI	119	85.61	5.83
Very major error	SI	8	16.33	10.35
	LI	11	22.45	11.68
Major error	SI	24	26.67	9.14
	LI	3	3.33	3.71
Minor error	SI	35	25.18	7.22
	LI	6	4.32	3.38

SI: standard inoculum ( $5 \times 10^5$  CFU/mL, i.e.  $5 \times 10^4$  CFU/well).

LI: low inoculum ( $10^5$  CFU/mL, i.e.  $10^4$  CFU/well).



**Fig. 1.** Bland–Altman analysis of agreement between agar dilution ( $10^4$  CFU/spot) and broth microdilution performed with (a) low inoculum ( $10^5$  CFU/mL, i.e.  $10^4$  CFU/well) similar to the agar dilution method or (b) standard inoculum ( $2 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  CFU/mL, i.e.  $2 \times 10^4$  to  $8 \times 10^4$  CFU/well). The differences of the  $\log_2$ -transformed MICs obtained by agar dilution and broth microdilution are plotted against their mean MIC values. The solid line represents the mean of the differences, the dotted lines indicate the lower and upper limits of the 95% CI.



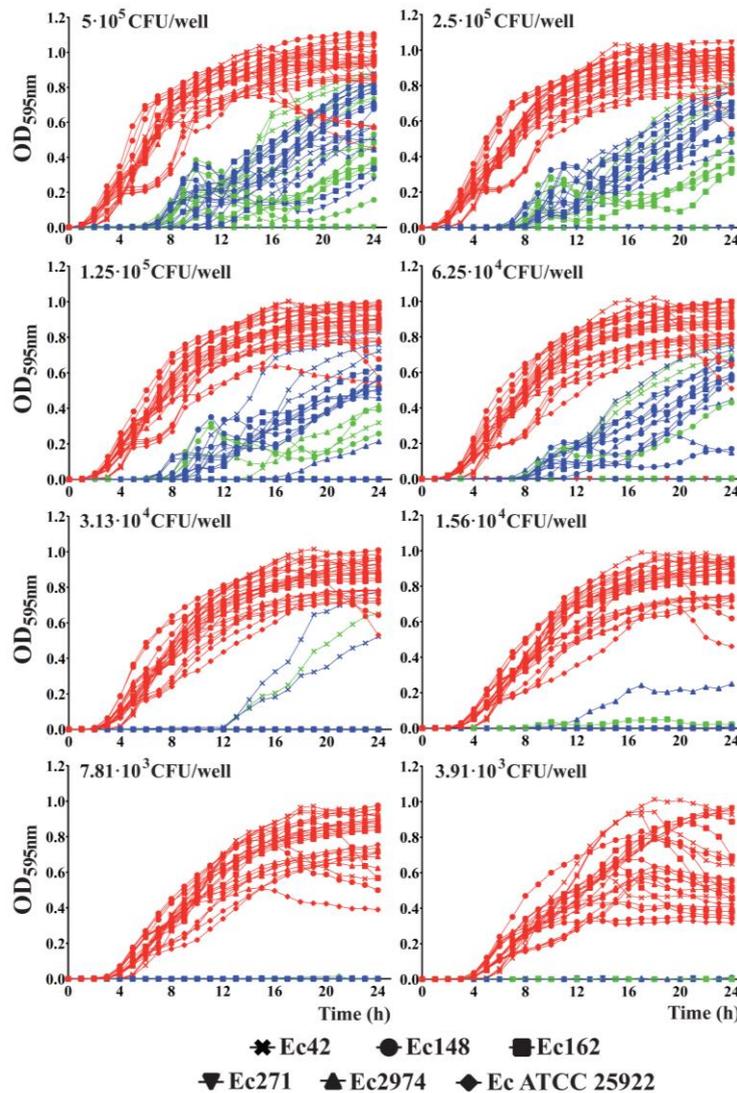
**Fig. 2.** Fوسفomycin mutant frequency at different concentrations of 21 *Escherichia coli* (MIC = 1 mg/L) and 21 *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 16 mg/L) clinical isolates. Horizontal bars and whiskers represent the mean and SD, respectively. Open grey circles denote each independent result.

observed (from  $10^{-3}$  to  $10^{-9}$ ) indicates a heterogeneous mutational status among the clinical isolates.

Reductions in the susceptibility were confirmed in all the mutants tested. Increments from six to ten doubling dilutions were observed for *E. coli* and from two to six or more (i.e.  $\geq 1024$  mg/L) for *K. pneumoniae*.

#### Subpopulations growth monitoring

The fosfomycin mutant frequency of the selected strains were as follows: Ec42,  $4.75 \times 10^{-4}$ ; Ec148,  $2.37 \times 10^{-5}$ ; Ec162,  $1.19 \times 10^{-6}$ ; Ec271,  $1.31 \times 10^{-7}$ ; Ec2974  $4.64 \times 10^{-6}$ ; *E. coli* ATCC 25922,  $2.1 \times 10^{-5}$ . Mutants able to grow at 4 mg/L and 8 mg/L ( $4 \times$  and  $8 \times$  MIC) were detectable 6–8 h after the beginning of the experiments (Fig. 3). This indicates a low but not negligible amount of resistant subpopulations within the total bacterial population. Skipped wells (i.e. growth observed at 8 mg/L, but not at 4 mg/L) were predominantly observed using high inocula resulting in low reproducibility of the assay even within the same replica. This suggests a very low proportion of mutants with increased MIC at



**Fig. 3.** Subpopulation growth monitoring over time, at different initial bacterial inocula. Total bacterial population (no fosfomicin) is shown by red lines. Resistant subpopulations able to grow at 4 mg/L (blue lines) and 8 mg/L (green lines) of fosfomicin (4 × and 8 × MIC) are shown for Ec42, Ec148, Ec162, Ec271, Ec2974 and *Escherichia coli* ATCC 25922 strains (all with MIC = 1 mg/L). Each line represents the growth of a single experiment. Experiments were carried out in quadruplicate using the same overnight inoculum.

the beginning of the experiment. A starting inoculum  $<3.13 \times 10^4$  CFU/well showed an important reduction in the amount of mutant subpopulation with increased MIC. The presence of these subpopulations correlated well with the mutant frequency of each strain and the inoculum used. The susceptibility of the strains recovered from the fosfomicin-containing wells showed MIC increments from 16 × to 256 ×, with respect to its original value.

**Discussion**

Antimicrobial heteroresistance is the occurrence of variable responses to antibiotics from bacterial cells within the same population. This phenotype has been described for many

microorganisms and antimicrobials [19]. Fosfomicin heteroresistance has been studied in *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* [13,14]. Nevertheless, little is known in *Enterobacteriaceae* and neither the clinical implications, nor its role in susceptibility tests has been studied.

For other antimicrobials, such as colistin or vancomycin, a reduced efficacy of these antimicrobials in infections with the presence of heteroresistant subpopulations has been observed [20,21]. *In vitro* studies have shown lower fitness in fosfomicin-resistant mutants; however, these results have not been evaluated *in vivo*, or for longer periods where compensatory mutations may occur re-establishing the biological cost of these mutations [22].

According to the CLSI guidelines, the agar dilution technique is the reference method to determine the MIC to fosfomicin [10]. Nevertheless, many authors have shown a lack of correlation in the fosfomicin MICs determined by different susceptibility methods [6,12,23]. In this sense, we observed in the present and previous studies, that broth microdilution often shows MIC values higher than those obtained by agar dilution [12]. Because the broth microdilution method is the base of most automated susceptibility test systems, it is important to understand the underlying factors of these discrepancies. In the present work, we have studied the role of the different starting inocula used in the broth microdilution and agar dilution methods. Whereas the recommended initial inoculum is set to  $10^4$  CFU/spot in the agar dilution method, a range of  $2 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  CFU/mL (i.e.  $2 \times 10^4$  to  $8 \times 10^4$  CFU/well in 100  $\mu$ L) is accepted for the standard broth microdilution [10]. This implies that the starting inoculum in the broth microdilution method is from two-fold to eight-fold higher than that used in the agar dilution. In this sense, we have seen a better essential agreement between both methods when similar initial inoculum is used. Also, we have observed in our collection of clinical *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, using fosfomicin concentrations above the MIC ( $4 \times$  MIC) a mean frequency of mutants of  $6.05 \times 10^{-5}$  (from  $4.8 \times 10^{-4}$  to  $1 \times 10^{-8}$ ) and  $1.49 \times 10^{-4}$  (from  $1.77 \times 10^{-3}$  to  $8.21 \times 10^{-7}$ ), respectively. Taking into consideration these results, pre-existing mutants are present in the starting inoculum of the fosfomicin susceptibility testing. Hence, subtle variations in this bacterial burden may enrich the culture with resistant subpopulations producing variations in the result of the susceptibility test. Therefore, only the strains with high or low mutant frequency show better reproducibility in the fosfomicin susceptibility testing, whereas strains with a mutant frequency closed to the initial inoculum used show low reproducibility.

In the present work, we have demonstrated this fact by monitoring over time the subpopulations' growth of different strains in the presence of fosfomicin concentrations above the MIC. Using the standard inoculum for susceptibility testing, the amount of initial resistant subpopulations is low, and this is the reason for skipped wells and the low reproducibility within the same assay. This phenomenon is not restricted to *Enterobacteriaceae* and has been commonly described by other authors, especially when disc diffusion or Etest are performed, where scattered colonies within the inhibition zones in disc diffusion or the ellipsoid inhibition zone in Etest are frequently found [6,24]. In this sense, Diez-Aguilar *et al.* have recently shown better essential and categorical agreements between the reference method and Etest or disc diffusion, reducing  $2\text{-log}_{10}$  the initial bacterial concentration [24]. We have also observed better essential and categorical agreements between the agar dilution method and the broth microdilution method when similar inocula are used. However, in our view this procedure is risky, as resistant subpopulations are removed from the susceptibility assay but they could be present at the infection site. Performing the susceptibility test with higher inocula will reduce the discrepancies by increasing the mutants in the assay. It must be noted that the clinical implication of this measure is not clear. For example, following this methodology, fosfomicin resistance would be overestimated and in low inoculum infections caused by fosfomicin heteroresistant strains, fosfomicin could be efficacious due to the absence of resistant subpopulations.

Our study, again, raises the question of whether the current agar dilution method is the appropriate reference technique to determine fosfomicin susceptibility. To the best of our knowledge, nobody has studied the correlation between clinical outcome and the fosfomicin MIC determined with different susceptibility testing methods, including agar dilution. In this regard, we and other authors have previously shown that an inadequate

fosfomicin therapy rapidly selects the subpopulations with increased MIC, displacing the more susceptible ones [4,15]. In conclusion, *in vivo* studies should be performed to evaluate the clinical impact of the fosfomicin heteroresistance. Meanwhile, susceptibility testing, either in broth or agar, should be carried out with higher bacterial inocula to capture the whole resistance present in the bacterial population.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (PI13/01885 and PI13/01282) and the Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI-0044-2013), Spain. It was partially supported by Plan Nacional de I+D+i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015)—co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF.

Fernando Docobo-Pérez is supported by a VPPi-US fellowship from the University of Sevilla.

#### Transparency declaration

JRB acts as scientific advisor for AstraZeneca, Merck and Achaogen, and was speaker for AstraZeneca, Merck, Pfizer and Astellas. He received funding for research from 115523 COMBACTE-NET, 115620 COMBACTE-CARE, and 115737 COMBACTE-MAGNET projects, Innovative Medicines Initiative (IMI), funded by the European Union and EFPIA companies.

#### References

- [1] Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the infectious diseases society of America and the European society for microbiology and infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2011;52:e103–20.
- [2] Gardiner BJ, Mahony AA, Ellis AG, Lawrentschuk N, Bolton DM, Zeglinski PT, et al. Is fosfomicin a potential treatment alternative for multidrug-resistant gram-negative prostatitis? *Clin Infect Dis* 2014;58:e101–5.
- [3] Rosso-Fernandez C, Sojo-Dorado J, Barriga A, Lavin-Alconero L, Palacios Z, Lopez-Hernandez I, et al. Fosfomicin versus meropenem in bacteraemic urinary tract infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* (FOREST): study protocol for an investigator-driven randomised controlled trial. *BMJ Open* 2015;5. e007363–e007363.
- [4] Docobo-Pérez F, Drusano GL, Johnson A, Goodwin J, Whalley S, Ramos-Martín V, et al. Pharmacodynamics of fosfomicin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:5602–10.
- [5] Hirsch EB, Raux BR, Zucchi PC, Kim Y, McCoy C, Kirby JE, et al. Activity of fosfomicin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:642–7.
- [6] Kaase M, Szabados F, Anders A, Gatermann SG. Fosfomicin susceptibility in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Germany. *J Clin Microbiol* 2014;52:1893–7.
- [7] Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:240–3.
- [8] Li Y, Zheng B, Li Y, Zhu S, Xue F, Liu J. Antimicrobial susceptibility and molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical *Escherichia coli* isolates in mainland China. *PLoS One* 2015;10:e0135269.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. CLSI document M07–A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI document M100–S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- [11] López-Cerero L, de Cueto M, Díaz-Guerrero MA, Morillo C, Pascual A. Evaluation of the Etest method for fosfomicin susceptibility of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:810–2.
- [12] de Cueto M, López L, Hernández JR, Morillo C, Pascual A. *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.
- [13] Walsh CC, McIntosh MP, Peleg AY, Kirkpatrick CM, Bergen PJ. *In vitro* pharmacodynamics of fosfomicin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:3042–50.
- [14] Engel H, Gutiérrez-Fernández J, Flückiger C, Martínez-Ripoll M, Mühlemann K, Hermoso JA, et al. Heteroresistance to fosfomicin is predominant in streptococcus pneumoniae and depends on the murA1 gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2801–8.
- [15] VanScoy BD, McCauley J, Ellis-Grosse EJ, Okusanya OO, Bhavnani SM, Forrest A, et al. Exploration of the pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships for fosfomicin efficacy using an *in vitro* infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7170–7.
- [16] Murray PR, Niles AC, Heeren RL. Comparison of a highly automated 5-h susceptibility testing system, the Cobas–Bact, with two reference methods: Kirby–Bauer disk diffusion and broth microdilution. *J Clin Microbiol* 1987;25:2372–7.
- [17] Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 1995;346:1085–7.
- [18] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159.
- [19] El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:191–207.
- [20] Claeys KC, Lagnf AM, Hallesy JA, Compton MT, Gravelin AL, Davis SL, et al. Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – does vancomycin heteroresistance matter? *Antimicrob Agents Chemother* 2016. AAC.02388–15.
- [21] Hernan RC, Karina B, Gabriela G, Marcela N, Carlos V, Angela F. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:188–91.
- [22] Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2850–8.
- [23] Díez-Aguilar M, Morosini M-I, del Campo R, García-Castillo M, Zamora J, Cantón R. *In vitro* activity of fosfomicin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 Spanish hospitals: establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5701–3.
- [24] Díez-Aguilar M, Martínez-García L, Cantón R, Morosini MI. *In vitro* susceptibility testing of fosfomicin in *Pseudomonas aeruginosa*, do we need a new standard for diffusion methods? *Antimicrob Agents Chemother* 2015. AAC.02237–15.

## **4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS**



#### 4.1 Primer artículo

*Contribución de cada mutación simple o en combinación a la resistencia a fosfomicina en E. coli.*

La CMI a fosfomicina de la cepa silvestre (*E. coli* BW 25133), utilizada para generar la colección de mutantes de delección fue de 2 µg/ml, utilizando la técnica de referencia. Los mutantes de delección para los transportadores principales de fosfomicina UhpT y GlpT presentaron valores de CMI de 64 y 2 µg/ml, respectivamente. En ambos casos y utilizando los puntos de corte CLSI, las dos cepas fueron clasificadas como sensibles. La delección individual de los genes *cyaA* y *ptsI*, que intervienen en la regulación de los dos transportadores, mostraron valores igualmente dentro de la categoría de la sensibilidad con una CMI de 8 y 2 µg/ml, respectivamente. Finalmente, las CMI de los dobles mutantes generados fueron las siguientes:  $\Delta glpT\text{-}uhpT$  256 µg/ml,  $\Delta glpT\text{-}cyaA$  8 µg/ml,  $\Delta glpT\text{-}ptsI$  2 µg/ml,  $\Delta uhpT\text{-}cyaA$  512 µg/ml,  $\Delta uhpT\text{-}ptsI$  64 µg/ml,  $\Delta ptsI\text{-}cyaA$  32 µg/ml, por lo que únicamente se consideran resistentes los mutantes  $\Delta glpT\text{-}uhpT$  y  $\Delta uhpT\text{-}cyaA$  512 µg/ml.

*Variaciones en la frecuencia de aparición de mutantes*

Empleando la cepa parenteral BW 25113 no se obtuvieron mutantes en ninguna de las concentraciones de fosfomicina utilizadas (64 y 256 µg/ml). Sin embargo, todas las cepas con una única delección generaron mutantes capaces de crecer a 64 µg/ml de fosfomicina y presentaron una alta frecuencia de aparición de mutantes a esta concentración:  $\Delta glpT$   $1,3 \times 10^{-5} \pm 1,3 \times 10^{-5}$ ;  $\Delta uhpT$   $2,9 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-5}$ ;  $\Delta cyaA$   $1,4 \times 10^{-5} \pm 1,7 \times 10^{-5}$ ;  $\Delta ptsI$   $9,7 \times 10^{-7} \pm 1,7 \times 10^{-8}$ . Por otro lado, cuando se realizó el estudio elevando la concentración de fosfomicina a 256 µg/ml, únicamente los mutantes  $\Delta uhpT$  y  $\Delta cyaA$  fueron capaces de generar mutantes, con una frecuencia de  $2,7 \times 10^{-6} \pm 1,4 \times 10^{-6}$  y  $4,7 \times 10^{-6} \pm 4,2 \times 10^{-6}$ , respectivamente.

Las cepas con delecciones en dos de los genes, fueron capaces de generar todas ellas mutantes a una concentración de fosfomicina de 256 µg/ml, con las siguientes

frecuencias:  $\Delta glpT-uhpT$   $9,6 \times 10^{-1} \pm 6 \times 10^{-1}$ ;  $\Delta glpT-cyaA$   $1,2 \times 10^{-6} \pm 8,2 \times 10^{-7}$ ;  $\Delta glpT-ptsI$   $9,4 \times 10^{-7} \pm 6,6 \times 10^{-7}$ ;  $\Delta uhpT-cyaA$   $7,9 \times 10^{-1} \pm 5,8 \times 10^{-1}$ ;  $\Delta uhpT-ptsI$   $6,1 \times 10^{-6} \pm 4,4 \times 10^{-6}$ ;  $\Delta ptsI-cyaA$   $2,4 \times 10^{-6} \pm 2,3 \times 10^{-6}$ .

El hecho de que  $\Delta uhpT$ , con una CMI de 64  $\mu\text{g/ml}$ , presentara una frecuencia de aparición de mutantes en una concentración de 64  $\mu\text{g/ml}$  de fosfomicina de  $2,9 \times 10^{-5} \pm 1,6 \times 10^{-5}$ , podría indicar que solamente una parte de la población total presenta dicha CMI. Por otro lado, los dobles mutantes que presentaron una CMI más elevada presentan frecuencias de aparición de mutantes en 256  $\mu\text{g/ml}$  de fosfomicina próximas a 1, lo que demostraría que la mayor parte de la población comparte esa CMI.

#### *Actividad in vitro de fosfomicina: curvas de letalidad*

La rápida actividad bactericida de fosfomicina quedó reflejada en los resultados de las curvas de letalidad de la cepa BW25113 para ambas concentraciones testadas (64 y 307  $\mu\text{g/ml}$ ). Esa rápida reducción del inóculo inicial se observó para la mayoría de las cepas de la colección estudiada, con disminuciones de entre 2-4  $\log_{10}$  ufc/ml tras 4 horas en presencia del antimicrobiano. Evidentemente, este efecto no se apreció o fue menor para los mutantes  $\Delta uhpT-ptsI$ ,  $\Delta glpT-uhpT$  y  $\Delta uhpT-cyaA$  con CMIs de 64, 256 y 512  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Pasadas 4 horas, todas las cepas isogénicas, incluso aquellas con valores de CMIs más bajos, lograron recrecer a una concentración de 64  $\mu\text{g/ml}$  del antimicrobiano.

El mismo efecto se produjo a la concentración más alta testada de fosfomicina (307  $\mu\text{g/ml}$ ), excepto para las cepas  $\Delta glpT$  y  $\Delta ptsI$  (ambas con una CMI idéntica a la cepa parenteral BW25113 de 2  $\mu\text{g/ml}$ ), en las que si se logró esterilizar el cultivo a las 24 horas.

El inóculo bacteriano inicial para la realización de las curvas de letalidad fue de  $10^6$  ufc/ml, por lo que los recrecimientos observados parecieron estar en relación con los resultados de los ensayos de frecuencia de aparición de mutantes. Por lo tanto, los recrecimientos observados fueron posiblemente originados por subpoblaciones con CMI incrementada presentes al inicio del ensayo de las curvas de letalidad.

#### *Análisis de los mutantes obtenidos en la curva de letalidad*

Para todas las cepas isogénicas que presentaron recrecimiento en el punto de las 24 horas de las curvas de letalidad, se seleccionaron 5 colonias y se confirmó la estabilidad de estos mutantes mediante pases consecutivos en placas sin antibiótico.

Todos los mutantes recuperados, independientemente de su genotipo y de la concentración de fosfomicina utilizada en la curva de letalidad, presentaron una CMI mayor de 1024 µg/ml para este antimicrobiano.

Tras la caracterización mediante PCR y secuenciación de estos mutantes se comprobó que la mayoría de ellos presentaban mutaciones relacionadas con la regulación de *uhpT*, con la excepción de los casos en los que la cepa isogénica de la que procedían era precisamente  $\Delta uhpT$ . En estos casos, las mutaciones encontradas se localizaron en los genes *glpT* o *crp*.

No se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados en el caso de los mutantes procedentes de las cepas  $\Delta glpT-uhpT$  y  $\Delta uhpT-cyaA$ .

## 4.2 Segundo artículo

### *Comparación entre los métodos de sensibilidad a fosfomicina.*

Se testaron un total de 220 aislados clínicos mediante dilución en agar (método de referencia) para determinar la sensibilidad a fosfomicina.

Se clasificaron como sensibles 150 de ellos, con sensibilidad intermedia 9 y resistentes a fosfomicina 63, según los puntos de corte del CLSI.

Al comparar estos resultados de CMI obtenidos mediante el método de referencia con los de la técnica de microdilución en caldo en aislados de *E. coli* se obtuvieron un 86,4% de acuerdos de categoría, un 9,1% de errores máximos, un 3,3% de errores mayores y un 9,9% de errores menores. Para *K. pneumoniae* estos valores fueron respectivamente de 51,1%, 15,7%, 28,4% y 25,2%.

Además, se observó de manera global, que al determinar la CMI mediante la microdilución en caldo, el 35,9% de las cepas mostraron discrepancias de CMI superiores a  $\pm 1$  dilución, respecto a las obtenidas mediante dilución en agar.

Por otro lado, se determinó también la CMI a fosfomicina utilizando la microdilución en caldo con dos inóculos diferentes, el estandarizado, (5,63 veces superior al utilizado en la dilución en agar), y con uno que igualaba el inóculo de la dilución en agar.

Finalmente, la reducción en el inóculo inicial de la microdilución en caldo que iguala el empleado en la técnica de referencia, permitió mejorar las discrepancias entre ambas técnicas, con un aumento en el valor  $\kappa$  de 0,210 a 0,361 y de los acuerdos de categoría del 55,3% a un 75,6%.

### *Frecuencia de aparición de mutantes*

En primer lugar, la frecuencia de aparición de mutantes fue similar entre *E. coli* y *K. pneumoniae*, en términos proporcionales a su CMI. La frecuencia de aparición de mutantes para cepas de *E. coli* en concentraciones de fosfomicina 4 veces superiores a su CMI fue de  $6,05 \times 10^{-5}$ , mientras que para concentraciones de fosfomicina 16 veces

superiores a su CMI fue de  $5,21 \times 10^{-6}$ . Para *K. pneumoniae* los resultados fueron de  $1,49 \times 10^{-4}$  a 4 veces su CMI y  $1,58 \times 10^{-5}$  a 16 veces la CMI. Por otro lado, la frecuencia de aparición de mutantes fue muy heterogénea en cepas con una misma CMI inicial hallándose en un rango de entre  $10^{-3}$  y  $10^{-9}$ . Los mutantes generados presentaron todos valores de CMI muy superiores a las cepas originales.

#### *Monitorización del crecimiento de las subpoblaciones*

La monitorización del crecimiento bacteriano de un conjunto de aislados clínicos de *E. coli* con CMI de  $1 \mu\text{g/ml}$ , a diferentes concentraciones de fosfomicina y empleando distintos inóculos bacterianos, permitió observar la aparición de subpoblaciones con sensibilidad disminuida respecto a la cepa original. El recrecimiento de estas subpoblaciones resistentes se volvió detectable por el sistema de lectura, alrededor de las 4-10 horas tras iniciar el ensayo, mostrándose un desplazamiento de la curva de crecimiento hacia la derecha en comparación con el control de crecimiento. Estas subpoblaciones comenzaron a aparecer al utilizar inóculos iniciales superiores a  $3,13 \times 10^4$  ufc/ml. De nuevo, los resultados obtenidos fueron concordantes la frecuencia de aparición de mutantes obtenida para esos aislados a las concentraciones utilizadas.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL



El interés global que existe actualmente en recuperar antimicrobianos antiguos para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes es fruto de la escasez de alternativas terapéuticas con las que contamos para hacer frente a este tipo de bacterias<sup>205</sup>. La multirresistencia a antimicrobianos es un problema de salud pública internacional, y el poder rescatar herramientas eficaces como son los antimicrobianos antiguos (la fosfomicina entre ellos) es una de las estrategias propuestas por organismos internacionales como la OMS o el ECDC para hacer frente a este problema<sup>29,31,64</sup>.

Aunque la fosfomicina es un antibiótico descubierto en 1969, aún existen muchas lagunas en el conocimiento de la respuesta de las bacterias a este antimicrobiano así como los mecanismos de adquisición de resistencias al mismo. Además, a pesar de tener un buen espectro de acción y escasos efectos adversos, la facilidad con la que aparecían resistencias en los ensayos *in vitro* junto con la aparición de nuevos fármacos más prometedores en la misma época hizo que este antimicrobiano pasara a quedar marginado como herramienta terapéutica a finales del siglo XX, exceptuando su uso para infecciones urinarias no complicadas. Su escaso uso ha determinado que numerosas bacterias multirresistentes sigan siendo sensibles a fosfomicina, como en el caso de enterobacterias productoras de BLEA o productoras de carbapenemasas<sup>141</sup>. Prueba del actual interés por este antimicrobiano es el incremento en la producción científica, pasando de 462 entradas de “*fosfomycin*” en la base de datos PubMed en la década de los 90 a 860 en los últimos siete años<sup>206</sup>.

La resistencia a fosfomicina se ha asociado a enzimas inactivantes de codificación plasmídica así como a mutaciones en genes cromosómicos, ya sea MurA (diana de la fosfomicina) o el conjunto de genes que intervienen en el transporte intracelular de la droga (*glpT*, *uhpT*, *cyaA* o *ptsI*)<sup>68,82</sup>. A pesar de conocer que estos genes se encuentran involucrados en la resistencia desde hace décadas, no se conoce el papel que juegan dichas mutaciones en la resistencia a fosfomicina. La mayoría de los trabajos publicados, en los que se ha intentado correlacionar la resistencia a fosfomicina con mutaciones en genes específicos, abarcaron un número muy reducido de genes, o en muchos casos encontraron mutaciones en varios de ellos. Esto ha hecho difícil

establecer el grado de implicación de estos genes en la pérdida de sensibilidad a fosfomicina en las bacterias de manera individualizada<sup>174</sup>. Además, la mayor parte de estos estudios se han realizado en el continente asiático, donde la resistencia mediada por plásmidos está ampliamente extendida, enmascarando el efecto de los mecanismos cromosómicos de resistencia a fosfomicina<sup>92,152</sup>.

Con este trabajo se pretende esclarecer la contribución de cada uno de los genes *glpT*, *uhpT*, *cyaA* o *ptsI* a la disminución de la sensibilidad a fosfomicina en *E. coli*. Al haber utilizado una colección isogénica todos los mutantes de delección generados comparten la misma base genética y por lo tanto las variaciones en la sensibilidad observadas entre ellos se deberán únicamente a la inactivación del gen analizado.

Los resultados anteriormente expuestos demuestran, sorprendentemente, que ninguna de las delecciones simples realizadas en los principales genes descritos en la literatura como causantes de la pérdida de sensibilidad a fosfomicina logran convertir a la cepa parenteral en resistente a este antimicrobiano. Además, los mutantes con dobles delecciones también son mayoritariamente sensibles, siendo únicamente  $\Delta glpT$ -*uhpT* y  $\Delta uhpT$ -*cyaA* clasificados como resistentes a fosfomicina según la normativa CLSI<sup>139</sup>. En nuestras condiciones experimentales esto hecho podría significar que la resistencia a fosfomicina no se debe a una única mutación sino a un proceso secuencial mediante el cual la suma del efecto de alteraciones en diferentes genes finalmente produce cepas resistentes al antimicrobiano. Este hecho es importante ya que la metodología utilizada para testar la CMI a fosfomicina podría estar enmascarando alguna de estas mutaciones iniciales. La adición de glucosa-6-fosfato al medio parece ocultar el aumento en la CMI de aislados con mutaciones que no afecten a UhpT. Por ejemplo, la cepa con la mutación en el transportador GlpT presentó una CMI de 2 µg/ml, la misma que la cepa parental BW2113, sin mutaciones. Esta CMI podría estar disminuida debido a la adición de glucosa-6-fosfato al medio, hecho que produce la sobreexpresión del otro transportador de fosfomicina (UhpT) propiciando una mayor entrada del antimicrobiano dentro de la bacteria y, por lo tanto, volviéndola más sensible. De esta manera, aunque la bacteria tenga inactivado un transportador (GlpT) de fosfomicina, la sobreexpresión del segundo (UhpT) es suficiente como para reestablecer la sensibilidad, comportándose fenotípicamente como una bacteria sin

mutaciones. La importancia del transportador UhpT se pone de manifiesto en el aumento en la CMI que produce, ya que es la mutación puntual estudiada que produce un mayor aumento de la CMI, pudiendo significar que esta sea la principal vía de entrada del antimicrobiano a la bacteria.

En los aislados en los que la mutación no se sitúa en el gen *uhpT*, pero sí en otros genes (por ejemplo en *glpT* o *ptsI*), la bacteria muestra un fenotipo sensible. Sin embargo, este genotipo puede facilitar la selección de subpoblaciones altamente resistentes al antimicrobiano cuando una segunda mutación aparece. Prueba de ello son las cepa parental BW25133,  $\Delta glpT$  y  $\Delta ptsI$  comparten la misma CMI, pero presentan diferencias en sus frecuencias de aparición de mutantes, siendo  $>10^{-9}$  para BW25113,  $1,3 \times 10^{-5}$  para  $\Delta glpT$  y  $9,7 \times 10^{-7}$  para  $\Delta ptsI$ . Esto significaría que cepas con la misma CMI se comportarán de manera distinta al entrar en contacto con fosfomicina, hecho que queda demostrado en los ensayos de letalidad. Cuando las cepas con los genes *glpT* y *ptsI* inactivados, se cultivaron en concentraciones de fosfomicina 32 veces mayores a su CMI, se observó un descenso inicial en la carga bacteriana para posteriormente evidenciar el crecimiento de subpoblaciones con altos niveles de resistencia a fosfomicina ( $>1024 \mu\text{g/ml}$ ).

Por otro lado, la ausencia de recrecimiento observado al aumentar la concentración de fosfomicina a  $307 \mu\text{g/ml}$ , podría ser explicada por las que altas concentraciones utilizadas. Esta concentración fue suficiente para erradicar la subpoblaciones preexistentes y previno por lo tanto la selección de mutantes de alto nivel de resistencia.

Hay que tener en cuenta que el inóculo inicial utilizado en las curvas de letalidad fue de  $10^6$  ufc/ml (volumen de 20 ml) y que la frecuencia de aparición de mutantes en  $64 \mu\text{g/ml}$  de fosfomicina, para los cepas con deleciones simples, comprende un rango que va de  $1,3 \times 10^{-5}$  a  $9,7 \times 10^{-7}$  por lo que coincide con el hecho de que todas ellas sean capaces de recrecer en las curvas de letalidad realizadas a esa concentración puesto que subpoblaciones bacterianas con una CMI incrementada a fosfomicina ya estarían presentes en el inicio del ensayo.

Esto se correlacionaría también con la frecuencia de aparición de mutantes ( $<10^{-9}$ ) observada a 256  $\mu\text{g/ml}$  de fosfomicina.

Los otros dos mutantes simples creados,  $\Delta uhpT$  y  $\Delta cyaA$  presentaron una CMI de 64  $\mu\text{g/ml}$  y 8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Ambas cepas fueron sensibles a fosfomicina y se comportaron de manera similar en las curvas de letalidad, recreciendo tanto a 64 como a 307  $\mu\text{g/ml}$  de fosfomicina. Esto fue debido a la aparición de segundas mutaciones en el complejo CRP-AMPC o en los genes relacionados con la regulación de UhpT.

Es importante destacar que, en los dobles mutantes  $\Delta glpT-uhpT$  y  $\Delta uhpT-cyaA$ , a pesar de recrecer en las curvas de letalidad y obtener un CMI final mayor a la inicial, no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes estudiados. Esto hace pensar en la posibilidad de que existan mecanismos de resistencia adicionales en la bacteria capaces de producir resistencia de alto nivel a fosfomicina.

Teniendo en cuenta el inóculo bacteriano empleado, la frecuencia de aparición de mutantes de las cepas seleccionadas y las concentraciones de antimicrobiano utilizado, la presencia de subpoblaciones al inicio de los ensayos era un fenómeno plausible como se demostró posteriormente.

Sin embargo, una limitación de este trabajo es la utilización de una colección de mutantes realizada mediante un protocolo de delección completa de los genes y no por mutaciones puntuales como se observa en algunos aislados clínicos. Este protocolo imposibilita, por ejemplo, el estudio del mutante  $\Delta murA$ , ya que se trata de un gen esencial para la viabilidad de la bacteria. Por otro lado, en la mayoría de aislados clínicos secuenciados en otros trabajos, la proteína MurA, no presenta mutaciones. Únicamente se ha demostrado que la sobreexpresión de esta proteína causa resistencia a fosfomicina aunque hasta la fecha no se ha descrito en cepas clínicas<sup>92,117,152,207</sup>. En la mayoría de estos trabajos, las mutaciones que con más frecuencia se observan en cepas clínicas, se encuentran relacionadas con el transportador UhpT y su regulación. Sin embargo es cierto, que las condiciones en las que se seleccionan la mayoría de los aislados resistentes a fosfomicina pueden sesgar el tipo de mutante obtenido. Esto es debido a que tanto los discos como los Etest

contienen glucosa-6-fosfato y por lo tanto estas condiciones favorecen la selección de mutantes relacionados con la vía de adquisición de hexosas-6-fosfato. Nilsson y colaboradores compararon las mutaciones en algunos genes relacionados con resistencia a fosfomicina en cepas de origen clínico con las mutaciones de cepas resistentes obtenidas por presión antibiótica en el laboratorio<sup>174</sup>. Estos investigadores concluyeron que las mutaciones encontradas difieren según el origen de los aislados, puesto que *in vivo* no encuentran mutaciones en los genes *cyaA* o *ptsI*. Tras comprobar en nuestra colección de deleciones isogénicas que la pérdida de estos dos genes sólo genera CMI a fosfomicina de 8 y 2 µg/ml respectivamente no es de extrañar que no fueran encontradas ya que se siguieron los puntos de corte de CLSI para la selección de dichas cepas clínicas resistentes a fosfomicina.

Otra limitación de este trabajo es el número limitado de genes estudiados. En la resistencia a fosfomicina participa una compleja red de regulación de multitud de genes metabólicos, por lo que no podemos excluir que existan otros genes implicados en la reducción de la sensibilidad a este antimicrobiano. A pesar de ello, este trabajo es el estudio que más genes has estudiado en relación con la resistencia a fosfomicina hasta la fecha.

Por otro lado, el uso de concentraciones fijas de antibiótico en los ensayos de curvas de letalidad puede que no refleje exactamente la respuesta *in vivo* a fosfomicina. Sin embargo, estos resultados obtenidos en las curvas de letalidad, concuerdan con nuestro trabajo previo realizado mediante ensayos de *hollow-fiber*. La importancia de las subpoblaciones preexistentes en el inóculo inicial se puso de manifiesto en el fracaso terapéutico de distintos regímenes con fosfomicina en este sistema experimental. Posteriormente, otros grupos han publicado resultados similares y en concordancia con nuestro trabajo<sup>175,208-210</sup>.

Por otro lado, el poder establecer una CMI fiable y reproducible es un punto clave para el uso racional de cualquier antimicrobiano, ya que es ese valor el utilizado para clasificar como sensible o resistente a un aislado, y por lo tanto poder guiar el tratamiento antimicrobiano.

Siguiendo la actual normativa del CLSI, la única técnica de referencia para establecer la CMI a fosfomicina es la dilución en agar<sup>95</sup>. Esta es una técnica tediosa y difícil de automatizar, por lo que en la práctica clínica la mayoría de laboratorios utilizan sistemas automatizados que simulan la microdilución en caldo. Existen diversos estudios que analizan las discrepancias de los resultados de sensibilidad a fosfomicina según la técnica utilizada. En ellos, se puede observar como la microdilución en caldo tiende a generar resultados de CMI mayores a los obtenidos por la técnica de referencia. Esto se traduce en un informe de cepas con mayor grado de resistencia a fosfomicina, al encontrarse estas técnicas más ampliamente distribuidas en los laboratorios de microbiología<sup>211-213</sup>.

Estas discrepancias en los valores de CMI se relacionan en ocasiones con el fenómeno de la heterorresistencia, que se define como la aparición de una respuesta variable a los antimicrobianos por parte de bacterias aisladas dentro de una misma población bacteriana<sup>214</sup>. Este fenotipo ha sido descrito para fosfomicina en *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa*<sup>179,215</sup>, pero se conoce poco sobre la heterorresistencia a fosfomicina en enterobacterias.

Para antimicrobianos como la colistina o la vancomicina sí se ha demostrado un menor éxito microbiológico a la hora de tratar infecciones producidas por poblaciones heterorresistentes pero hasta la fecha, no existen datos sobre la implicación clínica de estas subpoblaciones en el tratamiento con fosfomicina<sup>216,217</sup>.

En algunos estudios previos se ha concluido, coincidiendo con nuestros resultados, que los mutantes preexistentes en el inóculo inicial son los causantes de los recrecimientos bacterianos en ensayos en los que se expone a las bacterias a fosfomicina por periodos más o menos largos de tiempo. Estos resultados difieren también según la especie de bacteria estudiada y la concentración del inóculo inicial, pero siempre generan mutantes resultantes de alto nivel de resistencia al antimicrobiano de igual manera que sucede en nuestra colección de mutantes isogénicos<sup>175,208,209</sup>.

En el segundo manuscrito que conforma esta tesis doctoral se muestra que las diferencias permitidas entre los inóculos iniciales en las dos técnicas para establecer la CMI a fosfomicina (dilución en agar y microdilución), son suficientes para producir

resultados discordantes debido a la existencia de subpoblaciones con sensibilidad disminuida al inicio de dichas técnicas.

Mientras que el inóculo establecido para realizar una técnica de dilución en agar es de  $10^4$  ufc/por punto de inoculación, para la técnica de microdilución en caldo se permite un rango que varía entre  $2-8 \times 10^5$  ufc/ml (lo que supondría  $2-8 \times 10^4$  ufc por pocillo de 100  $\mu$ l) <sup>95</sup>. Esta diferencia significa que en la microdilución en caldo se utiliza entre 2 y 8 veces un inóculo superior que en la dilución en agar.

En este estudio, queda demostrado que una mejor correlación entre los resultados entre ambas técnicas se puede conseguir al igualar los inóculos iniciales (el valor  $\kappa$  aumenta de 0,210 a 0,361) siendo más marcado para cepas de *K. pneumoniae*. En la colección estudiada, los valores de CMI de fosfomicina para *K. pneumoniae* fueron más altos que para *E. coli* por lo que variaciones de 1 o 2 diluciones pueden suponer un cambio en el acuerdo de categoría, pudiendo ser esa la causa de los mejores resultados obtenidos para *K. pneumoniae* al igualar inóculos.

Al calcular la frecuencia de aparición de mutantes de las cepas clínicas estudiadas, para *E. coli* se obtienen tasas que van desde 4,8 mutantes por cada  $10^4$  bacterias a 1 de cada  $10^8$  con una meda de 6,05 de cada  $10^5$  bacterias. De esta manera, si utilizamos un inóculo inicial para hacer la microdilución de alrededor de 10.000 ufc/ml, estamos introduciendo mutantes al inocular la CMI. Este hecho se muestra con más claridad en los aislados de *K. pneumoniae*, con una media de frecuencia de aparición de mutantes de 1,49 de cada  $10^4$  bacterias, lo que se correlaciona con una mayor proporción de discordancias en los valores de CMI (el acuerdo de categoría pasa de ser un 51,8% utilizando el inóculo estándar a un 85,6% igualando los inóculos de las técnicas).

Considerando estos resultados, mutantes preexistentes están presentes en el inóculo inicial utilizado para realizar los test de sensibilidad a fosfomicina, por lo que pequeñas variaciones en la concentración de dicho inóculo pueden aumentar la proporción de mutantes con sensibilidad disminuida a fosfomicina. Afianza esta conclusión el hecho de que son aquellas cepas con una baja frecuencia de aparición de mutantes las que presentan un mayor grado de reproducibilidad entre técnicas, mientras que con las

cepas que presentan una frecuencia de aparición de mutantes cercana a la concentración del inóculo inicial se obtienen resultados menos reproducibles.

En este trabajo se decidió monitorizar el comportamiento de las subpoblaciones resistentes a diferentes concentraciones de fosfomicina, utilizando inóculos iniciales con concentraciones decrecientes a la mitad para cada determinación. Utilizando esta metodología se pudo observar como las subpoblaciones resistentes aumentaron a lo largo del tiempo, llegando a alcanzar valores detectables de forma más tardía que la población total. Con la disminución del inóculo inicial de forma progresiva, se observó como el recrecimiento de cepas resistentes terminó por desaparecer. Esto fue debido a que el inóculo utilizado fue tan bajo que redujo la probabilidad de que contuviera mutantes resistentes en el ensayo.

En el caso de fosfomicina, hemos demostrado que la aparición de crecimiento en pocillos salteados de las placas de microdilución puede ser debido a la inoculación, en el pocillo del ensayo, de mutantes con sensibilidad disminuida. Estos mutantes preexistentes en el inóculo inicial se encuentran en una proporción tan baja que a veces son inoculados en un pocillo con menor concentración de fosfomicina y generan CMI bajas y en otras ocasiones en pocillos con mayores concentraciones. Esto produce grandes dificultades a la hora de interpretar los resultados de la microdilución.

Este fenómeno también ha sido observado por otros autores utilizando técnicas como la difusión en disco o en Etest, en las que se observa como colonias aisladas dentro de la zona de inhibición <sup>211,212</sup>. En este sentido, se han propuesto diferentes soluciones para poder interpretar los resultados. El comité EUCAST, en su última actualización, recomienda no tener en cuenta las colonias salteadas dentro del halo de inhibición, cuando se utiliza la técnica disco-difusión con el fin de obtener resultados más reproducibles <sup>191</sup>. En este sentido, Díez-Aguilar y colaboradores proponen reducir el inóculo inicial en  $2 \text{ Log}_{10} \text{ ufc/ml}$ , puesto que de esta manera consiguen un aumento de los acuerdos de categoría y una disminución de los errores entre la técnica de dilución en agar y la difusión en disco o Etest <sup>211</sup>. Con este trabajo se corrobora este hecho, puesto que al disminuir el inóculo inicial logramos de igual manera mejorar la concordancia entre técnicas.

Sin embargo, consideramos que ambas estrategias son arriesgadas, ya que estamos descartando los resultados que generan los mutantes preexistentes en el cultivo y hasta la fecha no existe evidencia científica generada a partir de ensayos clínicos que apoye esta decisión. No se conoce, qué es lo que sucede en el curso de una infección real con estas subpoblaciones, sobre todo en aquellas que clásicamente se consideran de alta carga bacteriana como es el caso de los abscesos, neumonías u osteomielitis.

En ensayos realizados en el sistema *hollow-fiber*, capaces de simular *in vitro* diferentes dosificaciones de antibiótico con tal de asemejar la exposición de la bacteria al antimicrobiano a lo que sucede *in vivo*, se han demostrado que es necesario utilizar concentraciones altas de fosfomicina para lograr evitar la aparición de mutantes resistentes. Aún y así, existen discrepancias sobre cuál ha de ser esa concentración. En el ensayo de VanScoy y colaboradores, consiguen eliminar estas subpoblaciones con una dosificación de 4g cada 8 horas<sup>208</sup>, mientras que en un trabajo anterior realizado por Docobo y colaboradores es necesario una dosis de 8g cada 8 horas para lograrlo<sup>175</sup>. La explicación a dicha diferencia se debe a la cepa utilizada en cada estudio. En el primero, se utiliza la cepa de colección *E. coli* ATCC 25922, con una sensibilidad muy baja a fosfomicina y sin mutaciones de bajo nivel de resistencia, mientras que en el segundo se trató de un aislado clínico con mutaciones en GlpT.

En un artículo recientemente publicado, se valida la hipótesis de la ventana de selección de mutantes *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal para fosfomicina frente a las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. En este trabajo, se exponen dichas bacterias a concentraciones por encima de su CMI pero por debajo de la concentración preventiva de mutantes y en las curvas de letalidad se observa un recrecimiento de las cepas, de igual manera que en trabajos previos. Sin embargo, en el modelo animal, se observan diferencias entre las dos especies. Mientras que en el modelo por *E. coli* la infección consigue resolverse con dosis superiores a 30 mg/kg/día, la producida por *P. aeruginosa* no se consigue aclarar con ninguna de las dosificaciones testadas y la infección se va enriqueciendo en mutantes con CMIs más elevadas<sup>210</sup>.

Otro aspecto de extrema relevancia, se encuentra relacionado con la optimización del tratamiento antimicrobiano. La posibilidad de diseñar un tratamiento optimizado

con fosfomicina, viene dado a través de un mejor conocimiento de los parámetros farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD), que rigen la actividad de este antimicrobiano. En este sentido, se han realizado algunas aproximaciones en los últimos años. Si bien es cierto que se han realizado distintos estudios farmacocinéticos con fosfomicina<sup>218, 219, 220</sup>, únicamente existe un trabajo que ha evaluado en pacientes críticos la variabilidad de las concentraciones de la administración intravenosa de este antimicrobiano, mediante un análisis de farmacocinética poblacional<sup>221</sup>.

Por otro lado, distintos trabajos han tratado de conocer el parámetro farmacodinámico, que mejor predice la actividad de fosfomicina. Dos de estos trabajos emplearon un modelo de *in vitro* de infección dinámica de *hollow-fiber*<sup>175,208</sup>. En el primero de ellos, se sugiere que el cociente área bajo la curva entre la CMI (AUC/CMI) podría ser el parámetro predictor de eficacia, basado en la supresión de subpoblaciones emergentes. Sin embargo, el diseño de este trabajo no estaba encaminado a concretar este objetivo. El segundo de estos trabajos, empleando estudios de rango de dosis y fraccionamiento de dosis concluye que es el tiempo por encima de la RIC (*resistance inhibitory concentration*, concentración inhibitoria de resistencia, T>RIC). Sin embargo, en este trabajo existen algunas debilidades que no permiten aseverar estas conclusiones. Por un lado las relaciones entre la actividad de fosfomicina y los parámetros AUC/CMI o T>RIC, no permiten claramente decantarse por este segundo parámetro. Por otro lado, en los ensayos, sólo evalúan un periodo de 24 h en el que además no se monitoriza la evolución de las subpoblaciones con CMI incrementada. Finalmente, Lepak y colaboradores en un modelo murino de infección de muslo, de nuevo evaluaron estos parámetros mediante estudios de fraccionamiento de dosis *in vivo*<sup>209</sup>. La conclusión de estos autores es que el AUC/CMI es el parámetro FD que predice la eficacia de fosfomicina. Aunque estos resultados se encuentran en consonancia con nuestro trabajo previo<sup>175</sup>, es importante destacar que la eficacia de nuevo se ha evaluado en un período de 24h, que clásicamente y para otros antimicrobianos ha resultado suficiente, pero para fosfomicina pudiera no ser predictor a largo plazo debido al recrecimiento de estas subpoblaciones con CMI incrementada.

Debido a todo lo anteriormente expuesto, si reducimos el inóculo inicial para que las técnicas de sensibilidad puedan ser más reproducibles, podemos estar infraestimando las subpoblaciones resistentes, pero a su vez, utilizando un inóculo inicial elevado, podríamos estar amplificando subpoblaciones resistentes que acabarán generando resultados resistentes, lo que podría acarrear el no uso de este antimicrobiano para infecciones de bajo inóculo o en localizaciones donde se produce una acumulación del fármaco, situaciones en la que este podría ser una buena herramienta terapéutica.

Por todo lo anteriormente expuesto, los trabajos que componen la presente tesis doctoral ponen de nuevo en cuestión distintos aspectos en relación fosfomicina, como son la idoneidad del uso de la dilución en agar como técnica de referencia para el estudio de la sensibilidad a fosfomicina. Además, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han contribuido a la comprensión de los mecanismos moleculares de la resistencia a fosfomicina y ponen de manifiesto la necesidad de evaluar un método *in vitro* reproducible capaz de predecir la aparición de mutantes resistentes.

Finalmente, estos trabajos muestran la necesidad de realizar estudios *in vivo* que permitan evaluar el impacto clínico de las subpoblaciones con CMI incrementada a fosfomicina durante el tratamiento y la capacidad de estas subpoblaciones de condicionar la caracterización de puntos de corte de farmacodinámicos predictores de eficacia basados en la CMI.

## 6. CONCLUSIONES



- 1- Las mutaciones que causan pérdida de función de los genes codificantes para los transportadores de fosfomicina (*uhpT*, *glpT*), así como de los principales genes relacionados con la regulación de su entrada en la bacteria (*cyaA* y *ptsI*), no producen aumentos en los valores de CMI de fosfomicina considerados como resistentes aplicando los puntos de corte de sensibilidad antibiótica de CLSI.
- 2- Únicamente la pérdida de función en el gen *uhpT* provocaron resistencia a fosfomicina según los puntos de corte establecidos por EUCAST.
- 3- Las combinaciones de dobles deleciones que implican la inactivación del transportador UhpT determinan valores de CMIs a fosfomicina considerados como resistentes aplicando los puntos de corte de CLSI o EUCAST.
- 4- La CMI a fosfomicina no es un buen predictor de la actividad de este antimicrobiano frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, debido a que pequeñas variaciones en la concentración del inóculo inicial causan discrepancia entre las distintas técnicas de sensibilidad a antimicrobianos.
- 5- La tasa de frecuencia de aparición de mutantes resistentes a fosfomicina observada en *E. coli* y *K. pneumoniae* es tan alta, que la probabilidad de introducir mutantes resistentes en el propio inóculo inicial durante la realización de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos hace poco reproducibles dichas técnicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Levy Hara G, S. A. *Uso y abuso de los antibióticos. ¿Dónde estamos y adónde queremos llegar?* (2006).
2. European Center for Disease Prevention and Control. (2014). at <[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/table\\_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx)>
3. Comunicación de la Comisión Europea al Parlamento Europeo y al Consejo. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. (2011). at <<https://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/1/2017/ES/COM-2017-339-F1-ES-MAIN-PART-1.PDF>>
4. Madec, J.-Y., Haenni, M., Nordmann, P. & Poirel, L. ESBL/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? *Clin. Microbiol. Infect.* (2017). doi:10.1016/j.cmi.2017.01.013
5. Schwaber, M. J. & Carmeli, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 913–20 (2007).
6. Hampton, T. Novel Programs and Discoveries Aim to Combat Antibiotic Resistance. *JAMA* **313**, 2411–3
7. Morata, L., Mensa, J. & Soriano, A. New antibiotics against gram-positives: present and future indications. *Curr. Opin. Pharmacol.* **24**, 45–51 (2015).
8. Cosgrove, S. E. *et al.* Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 53–9 (2003).
9. Correa, L. *et al.* A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infect. Dis.* **13**, 80 (2013).
10. Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E. & Vardakas, K. Z. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1170–5 (2014).
11. Seara, N. *et al.* Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 169–73 (2015).
12. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. (2017). at <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>
13. Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 565–591 (2015).
14. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva, Switzerland. (2014).

15. Read, A. F. & Woods, R. J. Antibiotic resistance management. *Evol. Med. public Heal.* **2014**, 147 (2014).
16. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* **40**, 277–283 (2015).
17. The antibiotic alarm. *Nature* **495**, 141–141 (2013).
18. Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A. & Ben Moussa, M. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Med. Mal. Infect.* **44**, 400–4 (2014).
19. Chong, Y., Ito, Y. & Kamimura, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1499–504 (2011).
20. Nordmann, P. & Poirel, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 821–30 (2014).
21. van der Bij, A. K. & Pitout, J. D. D. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2090–100 (2012).
22. Alós, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **33**, 692–699 (2015).
23. López-Cerero, L. [Role of the hospital environment and equipment in the transmission of nosocomial infections]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **32**, 459–64
24. López-Cerero, L. *et al.* Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44**, 538–40 (2014).
25. Dautzenberg, M. J. D., Ossewaarde, J. M., de Greeff, S. C., Troelstra, A. & Bonten, M. J. M. Risk factors for the acquisition of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a hospital outbreak setting: a matched case-control study. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2273–9 (2016).
26. Yusuf, E. *et al.* OXA-48 Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Household Contact of a Previously Infected Patient: Person-to-Person Transmission or Coincidental Community Acquisition? *Microb. Drug Resist.* **22**, 134–6 (2016).
27. Borah, V. V., Saikia, K. K. & Hazarika, N. K. First report on the detection of OXA-48  $\beta$ -lactamase gene in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection isolated from a patient in a Tertiary Care Hospital in Assam. *Indian J. Med. Microbiol.* **34**, 252–3
28. Eurosurveillance. at  
<<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22643>>
29. WHO. Antimicrobial resistance. Policy package. (2016). at  
<<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/policy-package>>

- july2016.pdf?ua=1>
30. CDC. Antibiotic Resistance Solutions Initiative. (2017). at <<https://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/>>
  31. ECDC. Antimicrobial resistance strategies and action plans. (2017). at <[http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated\\_infections/guidance-infection-prevention-control/Pages/antimicrobial-resistance-strategies-action-plans.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare-associated_infections/guidance-infection-prevention-control/Pages/antimicrobial-resistance-strategies-action-plans.aspx)>
  32. AEMPS. Plan Nacional Resistencia Antibióticos. (2015). at <<https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/plan-estrategico-antibioticos/home.htm>>
  33. Plan nacional de acción de los Estados Unidos para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos. (2015). at <[http://www.microbiologiaysalud.org/wp-content/uploads/2015/04/National\\_Action\\_Plan\\_for\\_Combating\\_Antibiotic-Resistant\\_Bacteria.pdf](http://www.microbiologiaysalud.org/wp-content/uploads/2015/04/National_Action_Plan_for_Combating_Antibiotic-Resistant_Bacteria.pdf)>
  34. Plan national d’alerte sur les antibiotiques. (2016). at <[http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan\\_antibiotiques\\_2011-2016\\_DEFINITIF.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_antibiotiques_2011-2016_DEFINITIF.pdf)>
  35. WHO. at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>
  36. Aggarwal, R. & Goel, A. Hepatitis A: epidemiology in resource-poor countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **28**, 488–96 (2015).
  37. Watson, J. A. *et al.* Does targeting children with hygiene promotion messages work? The effect of handwashing promotion targeted at children, on diarrhoea, soil-transmitted helminth infections and behaviour change, in low- and middle-income countries. *Trop. Med. Int. Health* (2017). doi:10.1111/tmi.12861
  38. Wang, Z., Lapinski, M., Quilliam, E., Jaykus, L.-A. & Fraser, A. The effect of hand-hygiene interventions on infectious disease-associated absenteeism in elementary schools: A systematic literature review. *Am. J. Infect. Control* (2017). doi:10.1016/j.ajic.2017.01.018
  39. Huang, C., Ma, W. & Stack, S. The hygienic efficacy of different hand-drying methods: a review of the evidence. *Mayo Clin. Proc.* **87**, 791–8 (2012).
  40. Neo, J. R. J. Construct validity-Current issues and recommendations for future hand hygiene research. *Am. J. Infect. Control* (2017). doi:10.1016/j.ajic.2017.01.028
  41. Bassetti, M. *et al.* Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med.* (2017). doi:10.1007/s00134-017-4878-x
  42. Owens, R. C. Antimicrobial stewardship: concepts and strategies in the 21st century. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**, 110–28 (2008).
  43. CDC. Core elements of hospital antibiotic stewardship programs. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2014. (2014). at

- <<http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html>>
44. Lee, C.-R., Cho, I., Jeong, B. & Lee, S. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**, 4274–4305 (2013).
  45. Moehring, R. W. & Anderson, D. J. Antimicrobial Stewardship as Part of the Infection Prevention Effort. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **14**, 592–600 (2012).
  46. Beardsley, J. R. *et al.* Show Me the Money: Long-Term Financial Impact of an Antimicrobial Stewardship Program. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **33**, 398–400 (2012).
  47. Cantas, L. *et al.* A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* **4**, 96 (2013).
  48. Anderson, A. D., Nelson, J. M., Rossiter, S. & Angulo, F. J. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb. Drug Resist.* **9**, 373–9 (2003).
  49. Cuny, C. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 109–17 (2010).
  50. Horton, R. A. *et al.* Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3715–9 (2011).
  51. Done, H. Y., Venkatesan, A. K. & Halden, R. U. Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? *AAPS J.* **17**, 513–24 (2015).
  52. Nhung, N. T., Cuong, N. V., Thwaites, G. & Carrique-Mas, J. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiot. (Basel, Switzerland)* **5**, (2016).
  53. Lam, T. J. G. M., Jansen, J. & Wessels, R. J. The RESET Mindset Model applied on decreasing antibiotic usage in dairy cattle in the Netherlands. *Ir. Vet. J.* **70**, 5 (2017).
  54. Boucher, H. W. *et al.* 10 x '20 Progress--Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1685–1694 (2013).
  55. Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. & Astilean, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **12**, 22 (2013).
  56. IMI. Innovative medicines initiative. (2011). at <<http://www.imi.europa.eu/content/nd4bb>>
  57. FDA. Antibacterial Task Force: How CDER is establishing and promoting new approaches to antibacterial drug developmen. (2014). at

- <<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/ucm406769.htm>>
58. Shields, R. K. *et al.* Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne blaKPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2016). doi:10.1128/AAC.02097-16
  59. Lozano, C. & Torres, C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **35 Suppl 1**, 2–8 (2017).
  60. WHO: La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/>
  61. Falagas, M. E. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomicin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 497–9 (2010).
  62. Vardakas, K. Z., Legakis, N. J., Triarides, N. & Falagas, M. E. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomicin: a systematic review of the literature. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 269–85 (2016).
  63. Greig, S. L. & Scott, L. J. Intravenous Minocycline: A Review in *Acinetobacter* Infections. *Drugs* **76**, 1467–1476 (2016).
  64. Theuretzbacher, U. & Paul, M. Revival of old antibiotics: structuring the re-development process to optimize usage. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 878–80 (2015).
  65. AIDA project. at <<http://www.aida-project.eu/>>
  66. Zayyad, H., Eliakim-Raz, N., Leibovici, L. & Paul, M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2017). doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.021
  67. Hendlin, D. *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science* **166**, 122–3 (1969).
  68. Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G. & Vardakas, K. Z. Fosfomicin. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 321–47 (2016).
  69. Cameron, S., McLuskey, K., Chamberlayne, R., Hallyburton, I. & Hunter, W. N. Initiating a crystallographic analysis of recombinant (S)-2-hydroxypropylphosphonic acid epoxidase from *Streptomyces wedmorensis*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 534–6 (2005).
  70. Hidaka, T., Iwakura, H., Imai, S. & Seto, H. Studies on the biosynthesis of fosfomicin. 3. Detection of phosphoenol-pyruvate phosphomutase activity in a fosfomicin high-producing strain of *Streptomyces wedmorensis* and characterization of its blocked mutant NP-7. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **45**, 1008–10 (1992).
  71. Gupta, K. *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by

- the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **52**, e103-20 (2011).
72. Pérez, D. S., Tapia, M. O. & Soraci, A. L. Fosfomicin: Uses and potentialities in veterinary medicine. *Open Veterinary Journal* **4**, 26–43 (2014).
  73. Gobernado, M. Fosfomicina. *Rev Esp Quimioter.* **16**, 15–40 (2003).
  74. Kahan, F.M.; Kahan, J.S.; Cassidy, P.J.; Kropp, H. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann. NY Acad. Sci.* **235**, 364–386 (1974).
  75. Skarzynski, T.; Mistry, A.; Wonacott, A.; Hutchinson, S.E.; Kelly, V. . Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomicin. *Structure* **4**, 1465–1474 (1996).
  76. Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Krekel, F., Luger, K. & Amrhein, N. Role of the loop containing residue 115 in the induced-fit mechanism of the bacterial cell wall biosynthetic enzyme MurA. *Biochemistry* **39**, 2164–73 (2000).
  77. Eschenburg, S., Priestman, M. & Schönbrunn, E. Evidence that the fosfomicin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J. Biol. Chem.* **280**, 3757–63 (2005).
  78. Brown, E.D.; Vivas, E.I.; Walsh, C.T.; Kolter, R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4194–4197 (1995).
  79. Marquardt, J.L.; Brown, E.D.; Lane, W.S.; Haley, T.M.; Ichikawa, Y.; Wong, C.H.; Walsh, C. T. Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase by the antibiotic fosfomicin. *Biochemistry* **33**, (1994).
  80. Ambudkar, S. V, Larson, T. J. & Maloney, P. C. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**, 9083–6 (1986).
  81. Marger MD, S. M. J. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci.* **18**, 13–20 (1993).
  82. Castañeda-García A, Blázquez J, R.-R. A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomicin Resistance. *Antibiotics* **16**, 217–36 (2013).
  83. McCoy, A. J., Sandlin, R. C. & Maurelli, A. T. In vitro and in vivo functional activity of *Chlamydia* MurA, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase involved in peptidoglycan synthesis and fosfomicin resistance. *J. Bacteriol.* **185**, 1218–28 (2003).
  84. De Smet, K. A., Kempell, K. E., Gallagher, A., Duncan, K. & Young, D. B. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomicin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **145** ( Pt 1, 3177–84 (1999).
  85. Kumar, S., Parvathi, A., Hernandez, R. L., Cadle, K. M. & Varela, M. F.

- Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from *Vibrio fischeri* that confers high fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **191**, 425–9 (2009).
86. Gisin, J., Schneider, A., Nägele, B., Borisova, M. & Mayer, C. A cell wall recycling shortcut that bypasses peptidoglycan de novo biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 491–493 (2013).
  87. Borisova, M., Gisin, J. & Mayer, C. Blocking peptidoglycan recycling in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates intrinsic resistance to fosfomycin. *Microb. Drug Resist.* **20**, 231–7 (2014).
  88. Tsuruoka, T. & Yamada, Y. Characterization of spontaneous fosfomycin (phosphonomycin)-resistant cells of *Escherichia coli* B in vitro. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **28**, 906–11 (1975).
  89. Winkler, H. H. A hexose-phosphate transport system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 231–40 (1966).
  90. Guth, A., Engel, R. & Tropp, B. E. Uptake of glycerol 3-phosphate and some of its analogs by the hexose phosphate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **143**, 538–9 (1980).
  91. Boos, W. Binding protein-dependent ABC transport system for glycerol 3-phosphate of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **292**, 40–51 (1998).
  92. Takahata, S. *et al.* Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 333–337 (2010).
  93. Grimm, H. In vitro investigations with fosfomycin on Mueller-Hinton agar with and without glucose-6-phosphate. *Infection* **7**, 256–9 (1979).
  94. European committee on Antimicrobial Susceptibility. Testing, EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0. (2017).
  95. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. M07-A10. (2015).
  96. Castañeda-García, A., Rodríguez-Rojas, A., Guelfo, J. R. & Blázquez, J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **191**, 6968–74 (2009).
  97. Scotti, M. *et al.* Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. *Nat. Med.* **12**, 515–7 (2006).
  98. Huang, Y. Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. *Science (80-. )*. **301**, 616–620 (2003).
  99. Lemieux, M. J., Huang, Y. & Wang, D.-N. The structural basis of substrate translocation by the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 405–12 (2004).

100. Lemieux, M. J., Huang, Y. & Wang, D. N. Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. **54 Suppl 1**, i43-6 (2005).
101. Santoro, A. *et al.* Interaction of fosfomicin with the glycerol 3-phosphate transporter of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 1323–9 (2011).
102. Yang, B. & Larson, T. J. Multiple promoters are responsible for transcription of the glpEGR operon of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* **1396**, 114–26 (1998).
103. Cozzarelli, N. R., Freedberg, W. B. & Lin, E. C. Genetic control of L-alpha-glycerophosphate system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **31**, 371–87 (1968).
104. Wong, K. K. & Kwan, H. S. Transcription of glpT of *Escherichia coli* K12 is regulated by anaerobiosis and fnr. *FEMS Microbiol. Lett.* **94**, 15–18 (1992).
105. Lin, E. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 535–78 (1976).
106. Xavier, K. B., Kossmann, M., Santos, H. & Boos, W. Kinetic analysis by in vivo <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance of internal Pi during the uptake of sn-glycerol-3-phosphate by the pho regulon-dependent Ugp system and the glp regulon-dependent GlpT system. *J. Bacteriol.* **177**, 699–704 (1995).
107. Kadner, R. J. & Shattuck-Eidens, D. M. Genetic control of the hexose phosphate transport system of *Escherichia coli*: mapping of deletion and insertion mutations in the uhp region. *J. Bacteriol.* **155**, 1052–61 (1983).
108. Eiglmeier, K., Boos, W. & Cole, S. T. Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the glpT gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the glycerol-3-phosphate transport protein with components of the hexose-6-phosphate transport system. *Mol. Microbiol.* **1**, 251–8 (1987).
109. Lloyd, A. D. & Kadner, R. J. Topology of the *Escherichia coli* uhpT sugar-phosphate transporter analyzed by using TnphoA fusions. *J. Bacteriol.* **172**, 1688–1693 (1990).
110. Chen, Q. & Kadner, R. J. Effect of Altered Spacing between uhpT Promoter Elements on Transcription Activation. *J. Bacteriol.* **182**, 4430–4436 (2000).
111. Island, M. D. & Kadner, R. J. Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **175**, 5028–5034 (1993).
112. Merkel, T. J., Nelson, D. M., Brauer, C. L. & Kadner, R. J. Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* uhpT gene. *J. Bacteriol.* **174**, 2763–2770 (1992).
113. Görke, B. & Stülke, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 613–24 (2008).
114. Sakamoto, Y., Furukawa, S., Ogihara, H. & Yamasaki, M. Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (*cya*) mutants of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2030–3 (2003).

115. Cordaro, J. C. *et al.* Fosfomycin resistance: selection method for internal and extended deletions of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **128**, 785–93 (1976).
116. Ohkoshi, Y. *et al.* Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Biomed Res. Int.* **2017**, 5470241 (2017).
117. Couce, A. *et al.* Genomewide overexpression screen for fosfomycin resistance in *Escherichia coli*: MurA confers clinical resistance at low fitness cost. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2767–9 (2012).
118. Fu, Z. *et al.* Prevalence of Fosfomycin Resistance and Mutations in murA, glpT, and uhpT in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Blood and Cerebrospinal Fluid Samples. *Front. Microbiol.* **6**, 1544 (2015).
119. Silver, L. L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, (2017).
120. Rigsby, R. E., Fillgrove, K. L., Beihoffer, L. A. & Armstrong, R. N. Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods Enzymol.* **401**, 367–79 (2005).
121. Armstrong, R. N. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**, 13625–32 (2000).
122. Suárez, J. E. & Mendoza, M. C. Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 791–5 (1991).
123. León, J., García-Lobo, J. M., Navas, J. & Ortiz, J. M. Fosfomycin-resistance plasmids determine an intracellular modification of fosfomycin. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1649–55 (1985).
124. Llana, J. *et al.* Plasmid-mediated fosfomycin resistance is due to enzymatic modification of the antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 163–4 (1985).
125. García-Lobo, J. M. & Ortiz, J. M. Tn292I, a transposon encoding fosfomycin resistance. *J. Bacteriol.* **151**, 477–9 (1982).
126. Bernat, B. A., Laughlin, L. T. & Armstrong, R. N. Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry* **36**, 3050–5 (1997).
127. Bernat, B. A., Laughlin, L. T. & Armstrong, R. N. Elucidation of a monovalent cation dependence and characterization of the divalent cation binding site of the fosfomycin resistance protein (FosA). *Biochemistry* **38**, 7462–9 (1999).
128. Beharry, Z. & Palzkill, T. Functional analysis of active site residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**, 17786–91 (2005).
129. Etienne, J., Gerbaud, G., Fleurette, J. & Courvalin, P. Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomycin resistance gene fosB. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 119–22 (1991).

130. Zilhao, R. & Courvalin, P. Nucleotide sequence of the fosB gene conferring fosfomicin resistance in Staphylococcus epidermidis. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 267–72 (1990).
131. Cao, M., Bernat, B. A., Wang, Z., Armstrong, R. N. & Helmann, J. D. FosB, a cysteine-dependent fosfomicin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **183**, 2380–3 (2001).
132. Gaballa, A. *et al.* Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6482–6 (2010).
133. Roberts, A. A. *et al.* Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomicin resistance in Staphylococcus aureus. *Biochem. J.* **451**, 69–79 (2013).
134. Fillgrove, K. L., Pakhomova, S., Newcomer, M. E. & Armstrong, R. N. Mechanistic diversity of fosfomicin resistance in pathogenic microorganisms. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 15730–1 (2003).
135. Fillgrove, K. L., Pakhomova, S., Schaab, M. R., Newcomer, M. E. & Armstrong, R. N. Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomicin resistance protein, FosX, from Listeria monocytogenes. *Biochemistry* **46**, 8110–20 (2007).
136. Kobayashi, S., Kuzuyama, T. & Seto, H. Characterization of the fomA and fomB gene products from Streptomyces wedmorensis, which confer fosfomicin resistance on Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 647–50 (2000).
137. Wu, Y.-J. *et al.* Fosfomicin induced structural change in fosfomicin resistance kinases FomA: molecular dynamics and molecular docking studies. *J. Mol. Model.* **20**, 2236 (2014).
138. Lu, C.-L. *et al.* Antimicrobial Susceptibilities of Commonly Encountered Bacterial Isolates to Fosfomicin Determined by Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4295–4301 (2011).
139. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 12th Edition, M02-A12. (2017).
140. Leclercq, R. *et al.* EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 141–60 (2013).
141. Sastry, S. & Doi, Y. Fosfomicin: Resurgence of an old companion. *J. Infect. Chemother.* **22**, 273–80 (2016).
142. Daniel, D. S., Lee, S. M., Gan, H. M., Dykes, G. A. & Rahman, S. Genetic diversity of Enterococcus faecalis isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *J. Infect. Public Health* (2017). doi:10.1016/j.jiph.2017.02.006
143. Tang, H.-J. *et al.* In vitro efficacy of fosfomicin-based combinations against

- clinical vancomycin-resistant Enterococcus isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **77**, 254–7 (2013).
144. Hirsch, E. B. *et al.* Activity of fosfomicin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **46**, 642–7 (2015).
145. Charfi, F., Smaoui, H. & Kechrid, A. Non-susceptibility trends and serotype coverage by conjugate pneumococcal vaccines in a Tunisian paediatric population: a 10-year study. *Vaccine* **30 Suppl 6**, G18-24 (2012).
146. Kresken, M. *et al.* Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 63.e1-5 (2016).
147. Villar, H. E. *et al.* Frequency and antibiotic susceptibility patterns of urinary pathogens in male outpatients in Argentina. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 699–704 (2014).
148. Kamei, J. *et al.* Prevalence and characteristics of fecal antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in a cohort of Japanese men undergoing prostate biopsy. *Int. J. Urol.* (2017). doi:10.1111/iju.13308
149. Sultan, A. *et al.* Increasing antimicrobial resistance among uropathogens: Is fosfomicin the answer? *Urol. Ann.* **7**, 26–30
150. Hoang, P. H. *et al.* Antimicrobial resistance profiles and molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from healthy adults in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J. Vet. Med. Sci.* (2017). doi:10.1292/jvms.16-0639
151. Jiang, Y. *et al.* Dissemination of a clone carrying a fosA3-harboring plasmid mediates high fosfomicin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 66–70 (2015).
152. Li, Y. *et al.* Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomicin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. *PLoS One* **10**, e0135269 (2015).
153. Betrán, A., Cortés, A. M. & López, C. [Evaluation of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in urinary tract infections in Primary Care Barbastro Sector (Huesca)]. *Rev. Esp. Quimioter.* **28**, 263–6 (2015).
154. Treviño, M. *et al.* [Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* producing urinary tract infections in Galicia (Spain)]. *Rev. Esp. Quimioter.* **29**, 86–90 (2016).
155. Hernández Marco, R. *et al.* [Community-acquired febrile urinary tract infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in hospitalised infants]. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* (2016). doi:10.1016/j.eimc.2016.01.012
156. Moya-Dionisio, V. *et al.* [Uropathogen pattern and antimicrobial susceptibility in

- positive urinary cultures isolates from paediatric patients]. *Rev. Esp. Quimioter.* **29**, 146–50 (2016).
157. Khan, I. U. *et al.* In vitro activity of fosfomicin tromethamine against extended spectrum beta-lactamase producing urinary tract bacteria. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **24**, 914–7 (2014).
158. Maraki, S. *et al.* In vitro susceptibility and resistance phenotypes in contemporary Citrobacter isolates in a University Hospital in Crete, Greece. *Infect. Dis. (London, England)* 1–8 (2017). doi:10.1080/23744235.2017.1297896
159. Wachino, J., Yamane, K., Suzuki, S., Kimura, K. & Arakawa, Y. Prevalence of fosfomicin resistance among CTX-M-producing Escherichia coli clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomicin-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3061–4 (2010).
160. Endimiani, A. *et al.* In Vitro Activity of Fosfomicin against bla(KPC)-Containing Klebsiella pneumoniae Isolates, Including Those Nonsusceptible to Tigecycline and/or Colistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 526–529 (2010).
161. Vasoo, S. *et al.* In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam, Aztreonam-Avibactam, and a Panel of Older and Contemporary Antimicrobial Agents against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7842–6 (2015).
162. Livermore, D. M. *et al.* What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 415–9 (2011).
163. Demir, T. & Buyukguclu, T. Fosfomicin: In vitro efficacy against multidrug-resistant isolates beyond urinary isolates. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **8**, 164–168 (2017).
164. Lee, S.-Y. *et al.* Prevalence of acquired fosfomicin resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding fosA3. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2843–7 (2012).
165. Ho, P.-L. *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary Escherichia coli isolates. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1707–13 (2013).
166. Hou, J. *et al.* Dissemination of the fosfomicin resistance gene fosA3 with CTX-M  $\beta$ -lactamase genes and rmtB carried on IncFII plasmids among Escherichia coli isolates from pets in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2135–8 (2012).
167. He, D. *et al.* Chromosomal location of the fosA3 and blaCTX-M genes in Proteus mirabilis and clonal spread of Escherichia coli ST117 carrying fosA3-positive IncHI2/ST3 or F2:A-B- plasmids in a chicken farm. *Int. J. Antimicrob. Agents* (2017). doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.12.009
168. Sato, N., Kawamura, K., Nakane, K., Wachino, J.-I. & Arakawa, Y. First detection

- of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb. Drug Resist.* **19**, 477–82 (2013).
169. Xie, M. *et al.* Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Retail Meat That Harbor *bla*CTX-M and *fosA3* Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2450–5 (2016).
170. Alrowais, H. *et al.* Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*, Pennsylvania, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2045–7 (2015).
171. Villa, L. *et al.* *IncA/C* Plasmid Carrying *bla*(NDM-1), *bla*(CMY-16), and *fosA3* in a *Salmonella enterica* Serovar *Corvallis* Strain Isolated from a Migratory Wild Bird in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6597–600 (2015).
172. Mendes, A. C. *et al.* Importation of Fosfomycin Resistance *fosA3* Gene to Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 346–8 (2016).
173. Courtieu, A. L., Drugeon, H. & Billaudel, S. Susceptibility to fosfomycin of hospital strains isolated in Nantes (France). Frequency of mutation to resistance. *Chemotherapy* **23 Suppl 1**, 25–36 (1977).
174. Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G. & Andersson, D. I. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2850–8 (2003).
175. Docobo-Pérez, F. *et al.* Pharmacodynamics of fosfomycin: insights into clinical use for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5602–10 (2015).
176. Marchese, A., Gualco, L., Debbia, E. A., Schito, G. C. & Schito, A. M. In vitro activity of fosfomycin against gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomycin resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22 Suppl 2**, 53–9 (2003).
177. Schito, G. C. Why fosfomycin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *Int. J. Antimicrob. Agents* **22 Suppl 2**, 79–83 (2003).
178. Karageorgopoulos, D. E., Wang, R., Yu, X.-H. & Falagas, M. E. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 255–68 (2012).
179. Walsh, C. C., McIntosh, M. P., Peleg, A. Y., Kirkpatrick, C. M. & Bergen, P. J. In vitro pharmacodynamics of fosfomycin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 3042–50 (2015).
180. Grabein, B., Graninger, W., Rodríguez Baño, J., Dinh, A. & Liesenfeld, D. B. Intravenous fosfomycin-back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. *Clin. Microbiol. Infect.* (2016). doi:10.1016/j.cmi.2016.12.005
181. Patel, S. S., Balfour, J. A. & Bryson, H. M. Fosfomycin 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* **53**, 637–56 (1997).
182. Michalopoulos, A. S., Livaditis, I. G. & Gougoutas, V. The revival of fosfomycin. *Int. J. Infect. Dis.* **15**, e732-9 (2011).
183. Keating, G. M. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Drugs* **73**, 1951–66 (2013).
184. Agencia española del medicamento y productos sanitarios. at <<https://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>>
185. Marzouk, M., Ferjani, A., Haj Ali, M. & Boukadida, J. [Profile and susceptibility to antibiotics in urinary tract infections in children and newborns from 2012 to 2013: Data from 1879 urine cultures]. *Arch. Pediatr.* **22**, 505–9 (2015).
186. Forestier, F. *et al.* Ocular penetration kinetics of fosfomycin administered as a one-hour infusion. *Eur. J. Ophthalmol.* **6**, 137–42
187. Qiao, L.-D. *et al.* Evaluation of three-dose fosfomycin tromethamine in the treatment of patients with urinary tract infections: an uncontrolled, open-label, multicentre study. *BMJ Open* **3**, e004157 (2013).
188. Matsumoto, T., Muratani, T., Nakahama, C. & Tomono, K. Clinical effects of 2 days of treatment by fosfomycin calcium for acute uncomplicated cystitis in women. *J. Infect. Chemother.* **17**, 80–6 (2011).
189. Rosso-Fernández, C. *et al.* Fosfomycin versus meropenem in bacteraemic urinary tract infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* (FOREST): study protocol for an investigator-driven randomised controlled trial. *BMJ Open* **5**, e007363 (2015).
190. Wheat, P. F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J. Antimicrob. Chemother.* **48 Suppl 1**, 1–4 (2001).
191. EUCAST, *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 7.0.* (2017). at <[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)>
192. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems-susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility testing device. Part 1: Reference Method for Testing the In Vitro Activity of Antimi. *Infect. Dis. Int. Stand. 20776-1. Geneva, Switz. Int. Stand. Organ.* (2006).
193. Barry, A. L. & Fuchs, P. C. In vitro susceptibility testing procedures for fosfomycin tromethamine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1235–8 (1991).
194. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.* **36**, 49–52 (1966).
195. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493–6

- (1966).
196. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 6.0 2017. at <[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Version\\_5/Manual\\_v\\_6.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test\\_final.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_5/Manual_v_6.0_EUCAST_Disk_Test_final.pdf)>
  197. Bolmström, A., Arvidson, S., Ericsson, M., and Karlson, A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms, abstr. 1209, p. 325, in 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. *28th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Am. Soc. Microbiol.*
  198. Brown, D. F. & Brown, L. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 185–90 (1991).
  199. Turnidge, J. & Paterson, D. L. Setting and Revising Antibacterial Susceptibility Breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 391–408 (2007).
  200. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. Clinical breakpoints. at <[www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)>
  201. ECDC. SURVEILLANCE REPORT, Antimicrobial resistance surveillance in Europe. (2014). at <[www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)>
  202. Kahlmeter, G. & Brown, D. F. J. Harmonization of antimicrobial breakpoints in Europe — Can it be achieved? *Clin. Microbiol. Newsl.* **26**, 187 (2004).
  203. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. at <<http://clsi.org>>
  204. Jenkins, S. G. & Jerris, R. C. Critical Assessment of Issues Applicable to Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* **49**, S5–S10 (2011).
  205. Infectious Diseases Society of America (IDSA) *et al.* Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.* **52 Suppl 5**, S397-428 (2011).
  206. PubMed. at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>
  207. Tseng, S.-P. *et al.* Characterization of Fosfomycin Resistant Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolates from Human and Pig in Taiwan. *PLoS One* **10**, e0135864 (2015).
  208. VanScoy, B. D. *et al.* Exploration of the Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for Fosfomycin Efficacy Using an In Vitro Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7170–7 (2015).
  209. Lepak, A. J. *et al.* In vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of ZTI-01 (Fosfomycin for Injection) in the Neutropenic Murine Thigh Infection Model against E. coli, K. pneumoniae, and P. aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017). doi:10.1128/AAC.00476-17
  210. Pan, A.-J. *et al.* Validation of the mutant selection window hypothesis with

- fosfomicin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro and in vivo comparative study. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **70**, 166–173 (2017).
211. Díez-Aguilar, M. *et al.* In vitro activity of fosfomicin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 Spanish hospitals: establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5701–3 (2013).
212. Kaase, M., Szabados, F., Anders, A. & Gatermann, S. G. Fosfomicin susceptibility in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Germany. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1893–7 (2014).
213. de Cueto, M., López, L., Hernández, J. R., Morillo, C. & Pascual, A. In vitro activity of fosfomicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 368–70 (2006).
214. El-Halfawy, O. M. & Valvano, M. A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 191–207 (2015).
215. Engel, H. *et al.* Heteroresistance to fosfomicin is predominant in *Streptococcus pneumoniae* and depends on the *murA1* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2801–8 (2013).
216. Claeys, K. C. *et al.* Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Does Vancomycin Heteroresistance Matter? *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1708–16 (2016).
217. Rodriguez, C. H. *et al.* Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **65**, 188–91 (2009).
218. Pfausler, B. *et al.* Concentrations of fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 848–852 (2004).
219. Sauermann, R. *et al.* Antibiotic Abscess Penetration: Fosfomicin Levels Measured in Pus and Simulated Concentration-Time Profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4448–4454 (2005).
220. Legat, F. J. *et al.* Penetration of Fosfomicin into Inflammatory Lesions in Patients with Cellulitis or Diabetic Foot Syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 371–374 (2003).
221. Parker, S. L. *et al.* Population Pharmacokinetics of Fosfomicin in Critically Ill Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6471–6476 (2015).