

**Terapia combinada contra *Pseudomonas aeruginosa*
extensamente resistente en el modelo de infección de
muslo de ratón neutropénico**

Diana Karina Agredo Reyes¹

Diego Alfonso Sanchez Rodríguez¹

Omar Vesga²

Departamento de Enfermedades Infecciosas

Universidad de Antioquia

Julio 2020

Terapia combinada contra *Pseudomonas aeruginosa* extensamente resistente en el modelo de infección de muslo de ratón neutropénico

Autores

Diana Karina Agredo Reyes¹

Diego Alfonso Sanchez Rodríguez¹

Omar Vesga²

Asesor metodológico

Sigifredo Ospina

Departamento de Enfermedades Infecciosas

Universidad de Antioquia

Julio 2020

Terapia combinada contra *Pseudomonas aeruginosa* extensamente resistente en el modelo de infección de muslo de ratón neutropénico

Resumen

Introducción: la globalización y el consumo inadecuado de antibióticos ha favorecido la emergencia de resistencia antimicrobiana, con opciones de tratamiento cada vez más limitadas. Los bacilos Gram negativos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son un ejemplo claro de resistencia por la capacidad de expresar diferentes mecanismos de resistencia antibiótica, llegando a tasas de resistencia del 30% en el caso de infecciones por *P. aeruginosa*. El objetivo de este estudio es determinar combinaciones antibióticas que logren la mayor eficacia bactericida contra *P. aeruginosa* extensamente resistente (XDR) en un modelo animal.

Metodología: modelo de infección de muslo en ratón neutropénico. Se probaron múltiples combinaciones antibióticas que incluían desde 2 hasta 5 antimicrobianos (ceftazidime (CAZ), aztreonam (ATM), meropenem (MEM), amikacina (AMK), ciprofloxacina (CIP), polimixina B (PMB) y vancomicina (VAN)), empleando mínimo 5 dosis diferentes para cada combinación, en dosis que iban desde no efectivas (dosis mínima) hasta máxima efectiva (dosis máxima). Las combinaciones fueron evaluadas contra dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* XDR, cuya susceptibilidad (MIC y MBC) se determinó por medio de la técnica de microdilución en caldo. En el análisis se utilizó regresión no lineal (RNL) para definir la relación dosis-respuesta, ajustando el modelo sigmoideo de Hill.

Resultados: las combinaciones de antibióticos: CAZ + ATM y AMK; CAZ + ATM + AMK + CIP y MEM; y, PMB + AMK, demostraron ser eficaces en el tratamiento de *P. aeruginosa* XDR. El análisis de la combinación CAZ + ATM + AMK optimizada según el índice PK/PD (iPK/PD) de los betalactámicos y aminoglucósidos, mediante RNL arrojó parámetros farmacodinámicos (E_{max} , ED_{50} y N) estadísticamente significativos, logrando un E_{max} de $10 \log_{10}$ CFU/g, aunque con alta multicolinealidad. Las combinaciones de 5 antibióticos (AMK, CAZ, ATM, MEM y CIP) tuvieron un mejor ajuste a la RNL, con parámetros farmacodinámicos (PD) estadísticamente

¹ Fellows de tercer año del programa de enfermedades infecciosas de la Universidad de Antioquia, ² Especialista en enfermedades infecciosas y profesor de la sección de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín. Director de GRIPE.

significativos y sin multicolinealidad (E_{max} de 7.56 \log_{10} CFU/g). Otra combinación eficaz contra estas bacterias fue PMB + AMK, logrando superioridad frente a PMB en monoterapia al reducir la dosis requerida para alcanzar un mismo efecto bactericida (ED_{50} 7.54 (SE 3.81) versus ED_{50} 28.4 (4.66), p 0.0003 respectivamente), e igual de eficaz que combinaciones de tres (PMB + ATM + vancomicina (VAN)) y cuatro antibióticos (PMB + ATM + AMK + VAN).

Conclusión: en este estudio se demostró eficacia en el tratamiento de dos cepas de *P. aeruginosa* XDR, con tres combinaciones antibióticas (CAZ + ATM + AMK; CAZ + ATM + AMK + CIP + MEM; y PMB + AMK) que incluían fármacos con susceptibilidad disminuida (ATM) o completamente resistentes (CAZ, PMB, AMK, CIP, MEM), alcanzando efecto bactericida (reducción ≥ 3 logaritmos de CFU en 24 horas), siempre que se optimizaran los iPK/PD y las dosis de cada fármaco. No fue posible determinar el número de antibióticos ideal para una combinación, lo cual requiere de mayor experimentación con una mayor variedad de cepas XDR y combinaciones posibles.

Introducción

El mundo microbiano es la base de la ecología global, y la administración de antimicrobianos para el tratamiento y prevención de las enfermedades infecciosas, ha provocado una respuesta evolutiva de los microorganismos con el desarrollo de la resistencia antimicrobiana. La globalización del consumo de antibióticos y la diseminación de distintos fenómenos de protección microbiológica son los protagonistas de este fenómeno que actualmente constituye un problema de salud pública, ya reconocido desde 2013 por el CDC (*Centers for Diseases Control*) en su informe “*Antimicrobial Resistance Threat*” y desde 2014 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1,2), razón por la que en 2017, este último organismo emitió una alerta global y una serie de recomendaciones acerca del desarrollo de nuevos fármacos o el mejor uso de los ya existentes. Dichas recomendaciones incluyeron la publicación de la primera lista de prioridad global para la investigación de microorganismos con resistencia antimicrobiana, teniendo como eje central *Acinetobacter baumannii* complex, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacterias* (3), exponiendo a los bacilos Gram negativos (BGN) como la principal causa de la multirresistencia a nivel mundial (4,5). En el tratamiento de infecciones por BGN que exhiben mecanismos de resistencia, los carbapanems constituyen la primera línea de tratamiento; sin embargo, los BGN productores de carbapenemasas, especialmente las enterobacterias, suelen presentar fenotipos de multirresistencia y panresistencia que limitan drásticamente la opciones terapéuticas y como consecuencia presentan una elevada morbilidad y mortalidad (6).

Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter baumannii* complex son los microorganismos resistentes aislados con mayor frecuencia en diferentes áreas geográficas (5). *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos debido a la baja permeabilidad de la membrana externa y la presencia de sistemas de expulsión activa. Este germen puede desarrollar resistencia con gran facilidad mediante la expresión de mutaciones cromosómicas o bien, por adquisición de material genético exógeno, los cuales disminuyen la entrada del antibiótico a la célula, alteran el blanco molecular o inactivan el antimicrobiano utilizando enzimas hidrolíticas (7–9). Dentro de los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* que pueden incrementar la concentración inhibitoria mínima (MIC por su sigla en inglés) a los carbapenems, se incluyen la pérdida de porinas, especialmente OprD, y las bombas de expulsión activa (MexAB-OprM) que generan resistencia a múltiples fármacos (excepto polimixinas) (9). Otro mecanismo importante de resistencia es la producción de betalactamasas intrínsecas o adquiridas, del cual hacen parte las cefalosporinas AmpC (hiperproducción de la enzima), betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo Guyana (GES por su sigla en inglés), carbapenemasas tipo serina (A y D de la clasificación de Ambler) que corresponden a betalactamasas tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y OXA, respectivamente, y las carbapenemasas dependientes de zinc o metalo- β -lactamasas. Hasta 2012 se habían descrito más de 120 carbapenemasas que incluían las IMP de *P. aeruginosa*, KPC predominante en *K. pneumoniae*, las New Delhi metalo-beta-lactamasas (NDM) frecuentemente aisladas en enterobacterias, y las OXA en *A. baumannii* (10–12). La expresión de estos mecanismos genera microorganismos multiresistentes (MDR) los cuales son no susceptibles un antibiótico de tres grupos terapéuticos, extensamente resistentes (XDR) que son susceptibles solo a dos grupos terapéuticos o pandrogoresistentes (PDR), que son resistentes a todos los antibióticos disponibles (13).

En 2007, Villegas et al. reportaron KPC-2 en un aislamiento de *P. aeruginosa* por primera vez (14); y en los siguientes años, la diseminación universal de los clones con de alto riesgo de multirresistencia o extensamente resistentes (MDR/XDR) de *P. aeruginosa* han incrementado su prevalencia, con tasas entre 15% y 30%. En 2015, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades declaró que el 13.7% de los aislamientos de *P. aeruginosa* eran resistentes al menos a tres grupos de antimicrobianos, y el 5.5%, a cinco grupos. Por su parte, en Estados Unidos entre 2009 y 2010, la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN, por sus siglas en inglés) reportó tasas de resistencia para aminoglucósidos del 6%-10%; cefalosporinas de amplio espectro 10% a 28%; fluoroquinolonas 17% a 33%; piperacilina/tazobactam 7% a 19%; y carbapenems 11% a 30%. El fenómeno de multirresistencia se presentó entre el 5.3% al 17% de los aislamientos (10)(15)(16).

En cuanto al uso de nuevas opciones terapéuticas contra estas cepas MDR, se aprobaron ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam en 2014 y 2015, respectivamente (17). Ceftolozano-tazobactam tiene actividad contra bacterias Gram negativas aerobias y microaerofílicas, incluyendo *P. aeruginosa*, además es estable contra cepas productoras de BLEE y enzimas de tipo AmpC, y también es eficaz en el tratamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems no productoras de carbapenemasas (18). Ceftazidime-avibactam ofrece un amplio espectro de actividad contra bacterias productoras de BLEE, OXA-48, AmpC y KPC, sin embargo, estudios reciente tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado la emergencia de resistencia a estas dos combinaciones (19).

Existen pocos estudios *in vivo* que demuestren que una determinada combinación de antibióticos es más eficaz que otra contra cepas de *P. aeruginosa* MDR/XDR. *In vitro* la evaluación de combinaciones de betalactámicos asociados con amikacina, ha mostrado una actividad sinergista (definida como una reducción del recuento bacteriano mayor a $2 \log_{10}$ CFU/mL, comparado con el antibiótico en monoterapia que ejercía mayor efecto) contra *P. aeruginosa*, incluyendo cepas MDR (20). En el modelo mórdo de neumonía, otras combinaciones como colistina y rifampicina, han demostrado eficacia y, colistina más aztreonam e imipenem más tobramicina también fueron eficaces en el modelo del muslo de ratón neutropénico (21–23). Aunque se ha demostrado eficacia terapéutica de algunas combinaciones, es necesario establecer cuál es la mejor combinación antibiótica con base en el conocimiento y optimización de los parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de cada antibiótico. La importancia de dicha demostración está dada por la contribución al conocimiento en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR utilizando combinaciones de antibióticos con el fin de optimizar la eficacia y potencialmente disminuir toxicidad y costos. Teniendo en cuenta lo expuesto, nuestro objetivo es determinar combinaciones de antibióticos que logren el mayor efecto bactericida contra *P. aeruginosa* XDR en el modelo mórdo de infección de muslo de ratón neutropénico.

Materiales y métodos

Consideraciones éticas

El comité de ética para experimentación animal de la Universidad de Antioquia avaló y verificó el cumplimiento de las políticas institucionales.

Bacterias y medios

Se usaron 2 cepas clínicas de *P. aeruginosa* con un patrón de resistencia que afectaba más de 3 grupos de antimicrobianos (XDR) codificadas como GRP-0053

(obtenida de hemocultivo) y GRP-0134 (obtenida de aspirado traqueal). Para todos los experimentos, los microorganismos estuvieron almacenados a -80°C y fueron cultivados en medio líquido y sólido Müller-Hinton ajustado con cationes (Becton Dickinson, Sparks, MD) para realizar los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, y en medios líquido y sólido de Tripticasa soya (Becton Dickinson, Sparks, MD) para los experimentos en el modelo animal.

Agentes antimicrobianos

Todos los antibióticos se obtuvieron de establecimientos locales registrados legalmente. El producto original de ceftazidime (Fortum®) fue usado hasta agotar su disponibilidad en el país debido al vencimiento del registro INVIMA en 2018, a partir de esta fecha, fue necesario reemplazarlo por un producto genérico producido por el laboratorio Vitalis®, después de confirmar su equivalencia terapéutica contra el medicamento original. Esta situación también ocurrió con el producto innovador de aztreonam (Azactam®), que fue reemplazado por el producto genérico producido por laboratorios Fresenius. Los demás antibióticos utilizados fueron: amikacina, meropenem, ciprofloxacina, polimixina B y vancomicina. Las dosis de los medicamentos fueron calculadas como dosis total (DT) en mg/kg/día.

Pruebas de susceptibilidad

Se realizaron ensayos duplicados de microdilución en caldo según la metodología sugerida por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI por su sigla en inglés) para la medición de la concentración inhibitoria (MIC) y bactericida mínima (MBC) de las dos cepas de *P. aeruginosa* contra todos los antibióticos empleados en los experimentos (24). Para polimixina B se usó un método alternativo de microdilución en caldo (25). Se empleó *P. aeruginosa* ATCC 27853 como el control de calidad de los ensayos en todas las pruebas de susceptibilidad según el protocolo CLSI (26).

Modelo de infección de muslo en raton neutropénico

Inducción de la neutropenia: se utilizaron ratones hembras de 23 a 27 gramos de la cepa Udea:ICR(CD-2) criados bajo condiciones libres de patógenos múridos. La neutropenia profunda (≤ 100 neutrófilos/mm³) se indujo mediante la administración de dos dosis de ciclofosfamida intraperitoneal en los días -4 (150 mg/kg) y -1 (100 mg/kg) respectivamente, previo a la administración del inóculo bacteriano para provocar la infección (27).

Inducción de la infección: Los microorganismos almacenados en el ultra congelador fueron cultivados en una primera etapa en medio sólido para comprobar el fenotipo y ausencia de contaminación con otros microorganismos. En la segunda

etapa, en medio líquido hasta alcanzar una fase exponencial de crecimiento medida por espectrofotometría hasta una densidad óptica de $OD_{580} = 0.3$ (Spectro 22H, Labomed Inc., Culver City, CA, USA) equivalentes a $8 \log_{10}$ de bacterias por mL. Para cada cepa (GRP-0053, GRP-0134), los animales fueron sedados con isoflurano e inyectados en el muslo con 0.1 mL de una solución con una concentración bacteriana de $5 \log_{10}$ CFU/mL (inóculo), 16 horas después de la segunda dosis de ciclofosfamida. Con este inóculo se logró una infección diseminada con mortalidad del 100% entre las 18-24 horas posteriores a la infección.

Experimentos de farmacodinamia: se usaron grupos de 10 animales neutropénicos e infectados con cada una de las cepas para ser tratados durante 24 horas con combinaciones de antibióticos que incluyeron al menos 5 dosis totales (DT) por producto que oscilaron desde dosis no efectivas (dosis mínima) hasta máxima efectiva (dosis máxima). La dosis máxima fue definida como la máxima tolerada en murinos, y que permitiera su aplicación en un volumen no superior a 0.2 mL por dosis, teniendo en cuenta el límite de solubilidad del fármaco (datos establecidos en la literatura). Una vez establecida la dosis máxima para cada antibiótico, las dosis subsiguientes fueron calculadas realizando diluciones 1:2 o 1:4 a partir de la máxima, como se describe en el **Anexo 1 del suplemento**. Cada dosis definida fue dividida para 24 horas, y administrada según el esquema que más optimizara el iPK/PD del antibiótico y fue administrada mediante inyecciones subcutáneas en un volumen de 0.1 o máximo 0.2 mL a subgrupos de 2 ratones, iniciando 2 horas después de la inoculación (hora 0 del modelo).

Los iPK/PD asociados con la eficacia antibiótica en ratones y humanos con función renal normal ya han sido determinados (27,28). Antibióticos cuyo iPK/PD es dependiente del tiempo de exposición (índice $T_{>MIC}$) como los betalactámicos se administraron cada 1 hora (q1h), cada 1.5 horas (q1.5h) o cada 3 horas (q3h). Los antibióticos cuya eficacia depende principalmente de la concentración (C_{max}/MIC) o del área bajo la curva (AUC/MIC) como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, polimixinas o glicopéptidos se emplearon q3h o q6h. Aparte, se dejó en cada experimento un grupo de 2 animales control (infectados no tratados) para cuantificar las bacterias al inicio del tratamiento (0h), y al finalizarlo (24h). Estos últimos recibieron solución salina isotónica en igual volumen y con la misma frecuencia que los demás productos. Los animales que llegaron vivos a las 24 horas del modelo, fueron sacrificados por dislocación cervical al completar el tratamiento, los muslos fueron disecados bajo condiciones asépticas y homogenizados independientemente en solución salina, y diluidos hasta alcanzar un volumen total de 10 mL. Posteriormente, de cada muestra se hicieron diluciones seriadas 1 en 10 y se sembraron aliquotas de 10 μ L en platos de agar que fueron incubados en atmósfera

aerobia a 37°C durante 18-24h. El límite de detección para la cuantificación de las unidades formadoras de colonias fue de 100 CFU/muslo, los resultados fueron consignados en tablas de Excel para el análisis estadístico posterior.

Se realizaron experimentos con combinaciones basadas en ceftazidime contra la cepa GRP-0053 que incluían ceftazidime, aztreonam y amikacina, y contra la cepa GRP-0134 empleando ceftazidime, aztreonam, meropenem, ciprofloxacina y amikacina, además experimentos basados en polimixinas contra la cepa GRP-0053 con los antibióticos polimixina B, aztreonam, vancomicina y amikacina. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Combinaciones, dosis total y esquemas de administración contra cepas de Pseudomonas aeruginosa
Grupo 1: cepa GRP- 0053
Ceftazidime + aztreonam + amikacina cada 6 horas
Ceftazidime + aztreonam cada 1 horas y amikacina cada 6 horas
Ceftazidima y aztreonam cada 1 horas
Ceftazidime cada 1 hora y amikacina cada 6 horas
Ceftazidime + aztreonam cada 1 horas y amikacina cada 6 horas
Grupo 2: cepa GRP- 0134
Ceftazidime + aztreonam + amikacina cada 6 horas
Ceftazidime + aztreonam cada 3 horas y amikacina + ciprofloxacina cada 6 horas
Ceftazidime + azteonam + meropenem cada 3 horas y amikacina + ciprofloxacina cada 6 horas
Grupo 3: cepa GRP-0053
Pplimixina B cada 3 horas
Polimixina B + aztreonam cada 3 horas
Polimixina B + aztreonam + vancomicina cada 3 horas y amikacina cada 6 horas
Polimixina B cada 3 horas y amikacina cada 6 horas
Polimixina B + aztreonam y vancomicina cada 3 horas

Análisis estadístico

El efecto neto antibacteriano (variable dependiente, E) de cada una de las 5 dosis totales de las combinaciones de antibióticos (variable independiente, D) fue calculado mediante la resta del número de CFU/g de los controles no tratados a las 24h (para este modelo un muslo pesa 1 g), del número de CFU/g persistente en los animales tratados. Como E implica la muerte bacteriana, éste es un número negativo excepto en las dosis ineficaces en las que eventualmente puede ser positivo e incluso mayor que los controles no tratados. Para generar una curva sigmoidea dosis-respuesta se usó regresión no lineal de mínimos cuadrados (RNL) ajustando la ecuación de Hill $E = \frac{E_{max} \times D^N}{1 + D^N}$, donde **E** es el efecto, y **D** es la dosis

$$(ED_{50}^N + D^N)$$

total en 24 horas. Estas dos variables permiten calcular los tres parámetros farmacodinámicos (PD) principales: E_{max} que es el efecto máximo que cuantifica la eficacia, ED_{50} la dosis que produce el 50% del E_{max} , y define la potencia y N la pendiente de Hill que define la sensibilidad de la relación dosis-respuesta. Todos los parámetros (E_{max} , ED_{50} y N) fueron estimados con el programa SigmaPlot 14.0®, (SPSS Inc., Chicago, IL). Dado que el análisis de los datos mediante RNL evaluó el efecto de la combinación (hasta 5 fármacos con dosis diferentes cada uno), fue necesario categorizar las dosis como máxima, casi máxima, media, casi mínima y mínima, cuyos valores numéricos se encuentran descritos en el **Anexo 1. del suplemento**. Lo anterior explica porque el valor de ED_{50} no corresponde a un valor real sino a un número proporcional al efecto de la combinación, por tanto no puede ser interpretado literalmente. La calidad de las regresiones fue evaluada mediante el coeficiente de determinación (R^2 ajustado), el error estándar del estimado (Sy/x), el test de normalidad de los residuos (Shapiro-Wilk) y la homoscedasticidad (varianza constante). La ausencia de multicolinearidad fue evaluada mediante el factor de inflación de la varianza (VIF, por sus siglas en inglés); así un parámetro se consideró inválido si la RNL fallaba en cualquiera de las presunciones de normalidad, homoscedasticidad o no multicolinearidad (29). Un valor de $P < 0.05$ fue requerido para considerar una diferencia estadísticamente significativa. La línea de bacteriostasis establecida para evaluar la eficacia en las combinaciones corresponde al crecimiento neto (G) obtenido de sustraer el número de bacterias presentes en los muslos al inicio del tratamiento del valor obtenido a las 24 horas en los ratones no tratados. Adicionalmente, el efecto bactericida *in vivo* se definió como la capacidad del antimicrobiano de matar $\geq 3 \log_{10}$ CFU/g en 24 horas, valores extrapolados de datos *in vitro* (30).

Resultados

Se realizaron 25 experimentos, probando 9 combinaciones distintas de antibióticos. Las dosis, esquemas de administración y combinaciones se describen en la **Tabla 1** y **Anexo 1.** del suplemento.

Pruebas de susceptibilidad *in vitro*

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad (MIC y MBC) de los diferentes antibióticos empleados contra ambas cepas de *P. aeruginosa* se presentan en la **Tabla 2**. Las dos cepas fueron resistentes a todos los antibióticos probados, sin embargo la MIC de ATM se encontró en el rango de la sensibilidad intermedia en la cepa GRP-0053. Los controles de calidad de *P. aeruginosa* contra los antibióticos evaluados presentaron valores dentro del rango aceptado por CLSI.

Tabla 2. Concentración inhibitoria mínima (MIC)* y bactericida mínima (MBC)* de seis de los siete antibióticos evaluados contra las cepas de *P. aeruginosa*.

	<i>P. aeruginosa</i> GRP-0053		<i>P. aeruginosa</i> GRP-0134	
	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
Aztreonam (ATM)	8 – 16	8 – 16	32	32
Ceftazidime (CAZ)	512 - 1024	512 – 1024	1024	1024
Amikacin (AMK)	512	512	512	512
Ciprofloxacina (CIP)	32	32	128 - 256	128 – 256
Meropenem (MEM)	256	256	1024	1024
Polimixina B (PMB)	4	4	4	4

*La determinación de la MIC y MBC se realizó mediante técnica de microdilución en caldo, para polimixina B se siguieron las recomendaciones de CLSI. Vancomicina no fue evaluado por la resistencia intrínseca conocida de los bacilos Gram negativos a este fármaco.

Farmacodinamia *in vivo*

Los animales tuvieron 4.79 - 5.1 log₁₀ CFU/g y 8.9 - 9.25 log₁₀ CFU/g al iniciar (0h) y finalizar (24h) el tratamiento, respectivamente; con un rango de crecimiento neto (G) tanto para GRP-0053 y GRP-0134 entre 3.85 y 4.44 log₁₀ CFU/g en 24 horas. Como se mencionó previamente, tres grupos de combinaciones fueron probados. El primer grupo (ceftazidime + aztreonam + amikacina) contra la cepa GRP-0053 fue evaluado en tres combinaciones diferentes: 1) ceftazidime + aztreonam, 2) aztreonam + amikacina, y 3), ceftazidime + aztreonam + amikacina, empleando para los betalactámicos, esquemas de dosificación cada 1h, cada 1.5h o cada 6h y para los aminoglucósidos cada 6h. La magnitud de los parámetros farmacodinámicos (E_{max} , ED_{50} y N) de todas las combinaciones se muestran en la **Tabla 3** y se ilustran en la **Figura 1, 2 y 3**. Las regresiones no lineales de las combinaciones presentadas pasaron las pruebas de normalidad, y varianza constante.

La combinación ceftazidime + aztreonam presentó un efecto antibacteriano de – 4.10 log₁₀ CFU/g a dosis máxima, que superó levemente la bacteriostasis (G = 4.07 log₁₀ UFC/g), y un E_{max} de 4.38 log₁₀ CFU/g (error estandar del estimado (SE) 0.26), con todos los parámetros PD estadísticamente significativos y sin multicolinealidad. La combinación ceftazidime + amikacina aunque alcanzó el E_{max} , no sobrepasó la bacteriostasis, indicando que aumentar la dosis o ajustar el esquema de dosificación no matará más bacterias (*Ver panel A y B en la Figura 1*). Por otra parte, la combinación ceftazidime + aztreonam + amikacina administrada sin optimizar el iPK/PD de los betalactámicos (q6h) no alcanzó efecto bacteriostático, esta ineficacia fue superada administrando los betalactámicos cada 1h, teniendo en cuenta su iPK/PD ($T_{>MIC}$). Esta vez, la ecuación de Hill ajustó, sin embargo tanto la

E_{max} (10 log₁₀ CFU/g, SE 0.78) como la ED₅₀ (237 CFU/g, SE 42.7) adolecen de alta multicolinealidad (VIF mayor de 10), explicada por la imposibilidad para determinar la E_{max} con precisión, lo cual requiere de experimentos empleando dosis más bajas a la mínima y dosis más altas a la máxima probadas, que permitan dibujar una gráfica sigmoidea que logre establecer la E_{max} con precisión, eliminando así la multicolinealidad o interdependencia de los datos. La dosis máxima en esta combinación esterilizó los muslos (límite de detección en medio sólido de 100 CFU/g). El hecho de que la regresión no haya logrado encontrar la E_{max} , sugiere la posibilidad de mejorar el efecto con dosis más altas. (Ver parámetros PD en la *Tabla 3*, y en la *Figura 1*, *páneles C y D*).

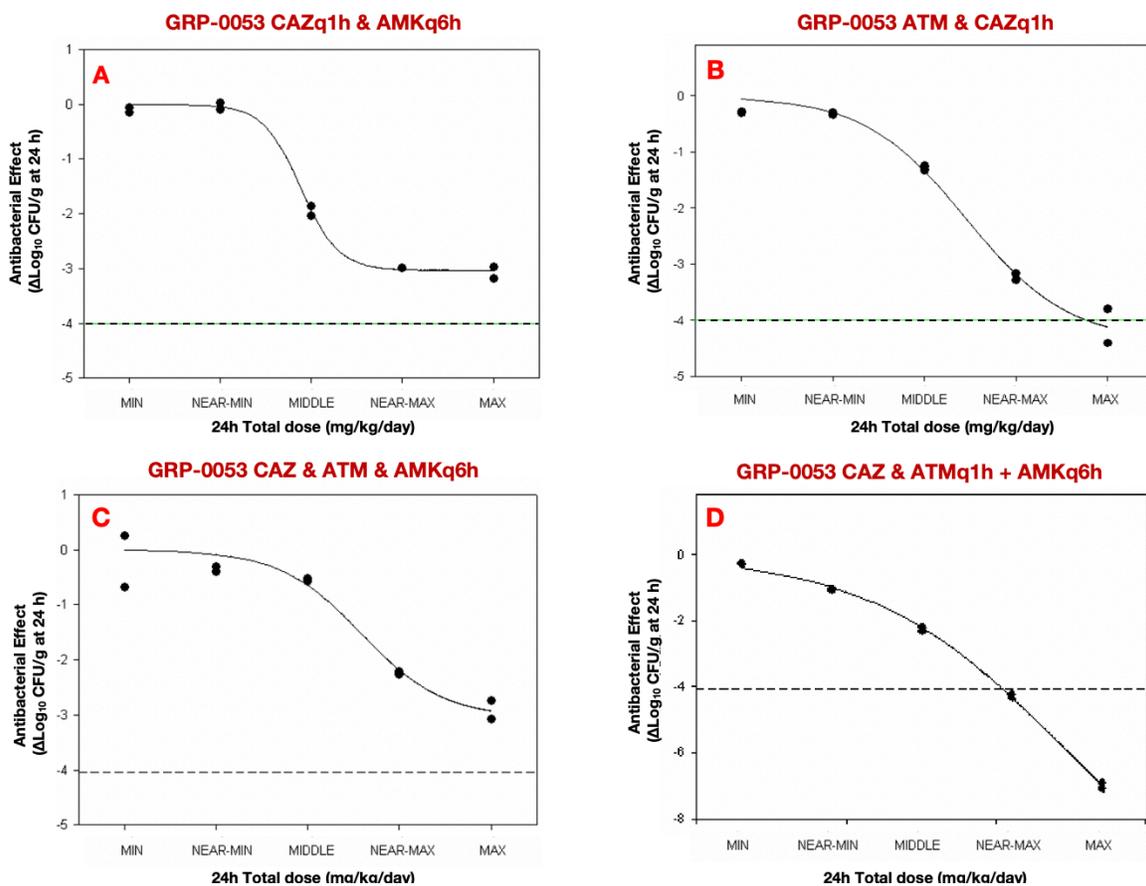


Figura 1: La gráfica muestra la actividad *in vivo* de las tres combinaciones. En el panel A: ceftazidime + aztreonam, en el panel B: ceftazidime + amikacina, y en el panel C y D: aztreonam + ceftazidime + amikacina. El panel C muestra la RNL administrando todas los fármacos q6h, en el panel D optimizando los betalactámicos en dosis administradas q1h. La línea punteada corresponde a la línea de bacteriostasis. Las dosis mínima, casi mínima, media, casi máxima y máxima para cada antibiótico se describen en el **Anexo 1**. del suplemento.

Con las combinaciones de 4 y 5 antibióticos ceftazidime + aztreonam + amikacina + ciprofloxacina + meropenem evaluadas contra la cepa GRP-134, la administración de los betalactámicos cada 1h superaban el volumen total permitido para los ratones, por lo que solo fue posible administrarlos q3h. Los demás antibióticos (ciprofloxacina y amikacina) se emplearon q6h. La combinación ceftazidime + aztreonam + amikacina + ciprofloxacina mostró un E_{max} de 9.35 \log_{10} CFU/g (SE 0.94) y un efecto antibacteriano neto a dosis máxima de $-4.91 \log_{10}$ CFU/g, la ecuación de Hill ajustó a los datos, con parámetros estadísticamente significativos pero con multicolinealidad que impedía analizar los parámetros independientemente. Adicionar un quinto antibiótico (meropenem) a la combinación previamente descrita mejoró el ajuste de la RNL a los datos, obteniendo parámetros PD estadísticamente significativos exentos de multicolinealidad, con un E_{max} de 7.56 \log_{10} CFU/g (SE 0.82), y un efecto antibacteriano neto de $-3.12 \log_{10}$ CFU/g; las dosis más altas en estas combinaciones de 4 y 5 antibióticos esterilizaron los muslos (Ver dosis máximas para cada antibiotico en el **Anexo 1** del suplemento). No fue posible establecer con los experimentos realizados con cuatro y cinco antibióticos demostrar mayor eficacia comparado con combinaciones de 3 fármacos, más estudios optimizando las dosis y esquemas de dosificación se requieren para confirmar o descartar esta hipótesis. Ver **Tabla 3** y Figura 2.

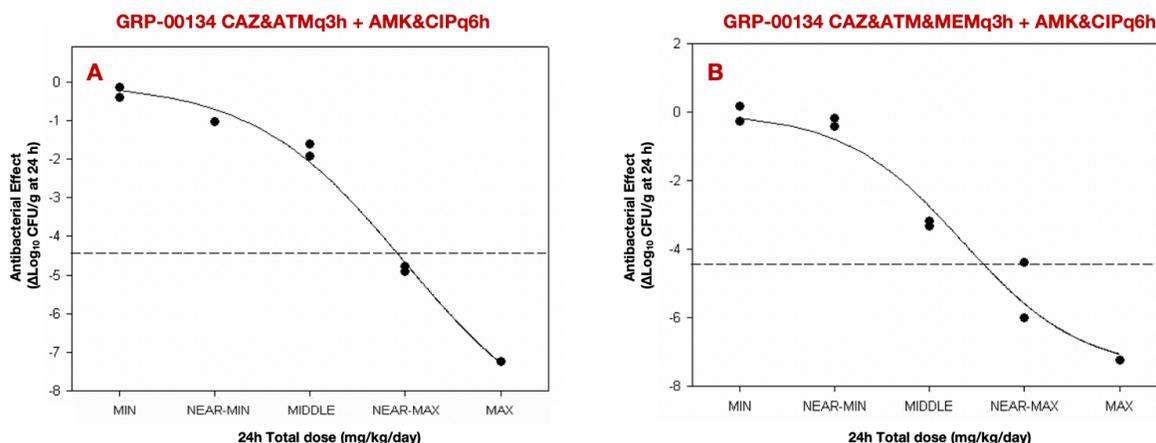


Figure 2. Las gráficas muestran la actividad *in vivo* de dos combinaciones antibióticas en una curva dosis-respuesta. Panel A: ceftazidime + aztreonam + amikacin + ciprofloxacina; panel B: ceftazidime + aztreonam + meropenem + amikacina + ciprofloxacina. La línea punteada corresponde a la línea de bacteriostasis. Las dosis mínima, casi mínima, media, casi máxima y máxima para cada antibiótico se describen en el Anexo 1 del suplemento.

En el tercer grupo de combinaciones de antibióticos se usaron polimixina B + aztreonam + amikacina + vancomicina evaluados contra la cepa GRP-0053 en

diferentes esquemas de dosificación (ver **Tabla 1**). Los experimentos con polimixina B a dosis de 120 y 90 mg/kg/día (datos no publicados) mostraron letalidad del 100% de los animales debido a la toxicidad del fármaco; datos experimentales previos en el modelo de ratón usando dosis de 120 mg/kg día fraccionadas cada 8 horas no se habían asociado con letalidad (31). Polimixina B en monoterapia, aplicada q3h, fue utilizado como comparador de las otras combinaciones. Este esquema de dosis, demostró una RNL robusta con parámetros PD significativos pero con multicolinealidad ($VIF > 10$), alcanzando un efecto neto antibacteriano de $-4.0 \log_{10}$ CFU/g con un E_{max} $7.9 \log_{10}$ CFU/g (0.83). Las combinaciones PMB + ATM y PMB + AMK alcanzaron E_{max} $8.22 \log_{10}$ CFU/g (SE 0.73), y $8.45 \log_{10}$ CFU/g (SE 1.44) respectivamente, cuyas RNL ajustaron a los datos con magnitudes de los parámetros PD estadísticamente significativos, pero con multicolinealidad ($VIF > 10$) (ver PD en Tabla 3.). Al comparar combinaciones dos (polimixina B + amikacina) versus tres (polimixina B + aztreonam + vancomicina) y cuatro antibióticos (polimixina B + aztreonam + vancomicina + amikacina) no se demostró mayor eficacia a mayor número de antibióticos, comparación por análisis de ajuste de curvas (CFA por sus siglas en inglés) donde la diferencia para la magnitud de los parámetros PD obtuvo un valor de $p = 0.84$, siendo no estadísticamente significativo. Ver figura 3, panel A y Tablas 3 y 4. Dado que utilizar tres y cuatro antibióticos no demostraron superioridad frente al uso de dos antibióticos, se hizo análisis por CFA para evaluar si esta combinación (polimixina B + amikacina) era superior a la monoterapia con polimixina B, evidenciando superioridad de la combinación al disminuir la ED_{50} (28.4 con IC95% 21.2 – 56.8; y 6.57 con IC95% 4.7 – 9.5, para monoterapia y terapia combinada respectivamente), con una $p = 0.0003$. Ver Figura 3, panel A, y Tablas 3 y 5. Polimixina B más amikacina fue la combinación que con el menor número de antibióticos logró superar la eficacia de PMB en monoterapia, además de alcanzar igual E_{max} a dosis menores (disminuyó la ED_{50}), Ver **Figura 3**, panel B.

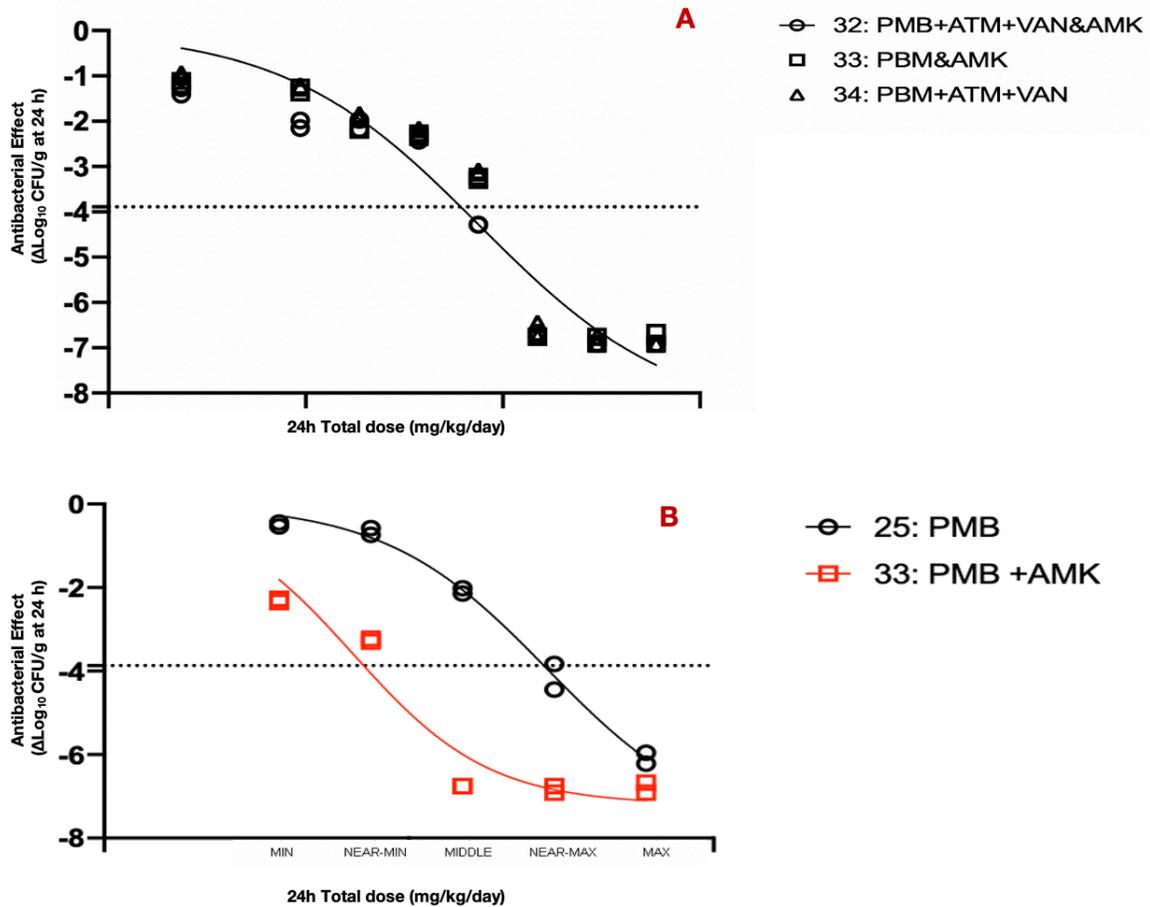


Figura 3. Comparaciones de la RNL que describen la relación dosis-efecto, obtenido por la ecuación de Hill. El **panel A** compara las combinaciones: PMB+ATM+VAN+AMK versus PMB+AMK versus PMB+ATM+VAN, la línea de la regresión única evidencia similar efecto al emplear 2, 3 o 4 antibióticos en combinación; el **panel B** compara monoterapia con PMB versus PMB + AMK, donde la combinación logró con menores dosis igual eficacia bactericida (las dosis casi máxima y máxima en la combinación disminuyeron el mismo número de log₁₀ CFU/g versus la dosis máxima de la monoterapia). La línea punteada corresponde a la bacteriostasis. Las dosis empleadas para cada antibiótico se describen en el **Anexo 1** del suplemento.

1
2

Tabla 3. Eficacia *in vivo* de diferentes combinaciones antibióticas analizadas mediante regresión no lineal.

Experiment	G	AdjR ²	Sy x	E _{max}	SE	P	VIF	ED ₅₀	SE	P	VIF	N	SE	P	VIF
Combinaciones con base en CAZ contra la cepa GRP 0053															
CFZ + ATM + AMKq6h	4.24	0.925	0.327	3.052	0.339	<0.0001	3.178	36.10	9.71	0.0075	2.35	1.614	0.489	0.013	1.738
ATM + CAZq1h	4.07	0.983	0.214	4.388	0.264	<0.0001	4.538	60.34	9.77	0.0005	3.376	1.291	0.191	0.003	2.240
CAZq1h + AMK q6h	4.07	0.994	0.106	3.035	0.05	<0.0001	1.294	27.14	1.72	<0.0001	4.244	3.46	1.24	0.0269	4.499
CAZ + ATMq1h + AMK q6h	4.07	0.999	0.109	11.56	1.019	<0.0001	96.0	237	76	0.009	114	0.672	0.039	<0.0001	9.131
Combinaciones con base en CAZ contra la cepa GRP 0134															
CAZ+ ATM + AMK q6h	3.91	0.973	0.232	3.930	1.069	0.0079	37.895	94.5	45.2	0.074	32.7	2.171	1.563	0.20	23.1
CAZ+ ATMq3h + AMK +CIP q6h	4.44	0.990	0.281	9.355	0.994	<0.0001	22,84	63.791	19.27	0.012	21.0	0.90	0.115	0.0001	4.761
CAZ+ ATM + MEM q3h + AMK + CIP q6h	4.44	0.954	0.637	7.560	0.82	<0.0001	5.25	25.9	8.18	0.015	3.87	1.153	0.295	0.0059	2.429
Combinaciones con base en PMB contra la cepa GRP 0053															
PMBq3h	3.85	0.989	0.232	7.895	0.83	<0.0001	24.7	28.40	4.66	0.0005	23.1	1.632	0.21	<0.0001	4.88
PMB + ATM q3h	3.85	0.990	0.215	8.22	0.73	<0.0001	28.1	20.9	3.57	0.0008	26.0	1.237	0.134	<0.0001	5.4
PMBq3 + AMKq6h	3.89	0.910	0.791	8.45	1.44	<0.0001	14.8	7.54	3.81	0.069	12.08	0.903	0.241	0.0025	3.971
PMB + ATM + VAN q3h	3.89	0.916	0.731	8.366	1.20	<0.0001	12.13	7.89	3.16	0.027	9.72	0.992	0.238	0.0011	3.612
PMB + ATM + VAN q3h + AMKq6h	3.89	0.906	0.720	8.95	1.66	0.0001	22.90	7.37	4.55	0.1300	19.6	0.757	0.194	0.0018	4.83
G= crecimiento neto en log ₁₀ CFU/g, AdjR ² : coeficiente de determinación ajustado, Sy x: error estándar del estimado, E _{max} : efecto máximo, SE: error estándar, ED ₅₀ : dosis que logra el 50% del E _{max} , N: pendiente, VIF: factor de inflación de la varianza.															

3

Tabla 4. COMPARACIÓN DE COMBINACIONES ANTIBIÓTICAS				
Parámetro PD				P (global)
	PMB q3h + AMK q6 h	PMB + ATM + VAN q3h	PMB + ATM + VAN q3h + AMK q6h	
E_{max} (IC₉₅%)	8.448 (6.66 - 19.42)	8.360 (6.76 - 16.19)	8.954 (6.98 - 19.51)	0.842
N	0.904 (0.43 - 1.62)	0.994 (0.52 - 1.72)	0.758 (0.39 - 1.31)	
ED₅₀	7.539 (3.87 - infinito)	7.884 (4.50 - 68.51)	7.358 (3.42 - infinito)	

Tabla 5. COMPARACIÓN DE COMBINACIONES ANTIBIÓTICAS				Valor de p (global)	Valor de p (individual)
Parámetro PD	Polimixina B q3h	Polimixina B q3h + amikacina q6h			
E_{max} (IC₉₅%)	7.896 (6.50 - 12.09)	7.199 (6.31 - 8.72)		< 0.0001	0.671
N	1.632 (1.17 - 2.18)	1.943 (1.00 - 3.33)			0.600
ED₅₀	28.42 (21.29 - 56.81)	6.572 (4.76 - 9.50)			0.0003

Discusión

No es un hecho desconocido que la emergencia de resistencia en los bacilos Gram negativos (BGN), se ha convertido en un problema con impacto mundial que no respeta fronteras geográficas o ecológicas y pone en riesgo los logros de la medicina moderna. Aunque se dispone de nuevas moléculas, o la combinación de moléculas ya conocidas con nuevos inhibidores de betalactamasas, su alcance y utilidad en monoterapia aún es incierto. Y, es por esto, que la búsqueda de combinaciones de antibióticos "viejos" sigue siendo pertinente.

Nuestros resultados en el modelo de infección de ratón, demostraron eficacia terapéutica al utilizar combinaciones de antibióticos contra *P. aeruginosa* XDR. Esta eficacia está determinada por una compleja interacción entre el medicamento administrado, el hospedero y el agente infeccioso. La complejidad de esta interacción se refleja en la gran variabilidad en la relación dosis-respuesta, la cual puede ser minimizada al tener en cuenta características fundamentales de cada medicamento y expresadas como iPK/PD, como se demostró en la combinación CAZ, ATM y AMK, donde la optimización del índice, mejoró la eficacia. Este concepto fue descrito previamente por Craig (28,32), cuando demostró en el modelo animal que la combinación de los parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) determinaban la eficacia terapéutica, es decir, la relación entre la exposición al antibiótico con el efecto antimicrobiano, permitiendo definir los iPK/PD de los que depende la muerte bacteriana (dosis y/o periodos de exposición al antimicrobiano). Una segunda estrategia que determinó la eficacia en nuestro modelo fue la selección de las combinaciones de antibióticos, recurriendo al diseño de combinaciones con diversos mecanismos de acción y así logramos demostrar eficacia bactericida cuando se usaron combinaciones con dos, tres o más antibióticos.

Estudios previos en BGN MDR demostraron eficacia *in vitro* de polimixinas combinados con rifampicina, o betalactámicos (30, 31). Así mismo, se demostró sinergismo *in vitro* de amikacina en combinaciones no tradicionales con antibióticos como doxiciclina contra cepas MDR (34,35). *In vivo*, Pefanis A., et al. (20) encontraron sinergismo cuando se combinó AMK y ATM, o AMK y CAZ en el modelo de endocarditis de conejos, logrando esterilizar el 53% y 75%, respectivamente de las válvulas infectadas con cepas de *P. aeruginosa* susceptible a estos dos antibióticos. Sin embargo, usando el mismo modelo de infección con una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente, las combinaciones ATM + AMK o CAZ + AMK no demostraron mayor eficacia cuando se compararon contra ATM o CAZ en monoterapia. Este resultado puede ser explicado por la no optimización de iPK/PD

de los betalactámicos (administrados cada 8 horas) o por la alta susceptibilidad de la cepa de *P. aeruginosa* a los dos betalactámicos, lo cual pudo enmascarar la eficacia de la combinación. En nuestros experimentos no evaluamos los antibióticos en monoterapia, con excepción de PMB, dada la alta resistencia documentada en los test de susceptibilidad *in vitro*, por lo que consideramos que el efecto no sería mayor al logrado en combinación. Comparados con el estudio de Pefanis A., et al. nosotros sí demostramos incremento en la eficacia bactericida de la combinación CAZ + ATM + AMK tras optimizar el iPK/PD de los betalactámicos, administrando el antibiótico cada hora vs cada 6 horas y logrando un efecto neto con la dosis máxima de -7.0 vs $2.9 \log_{10}$ CFU/g, respectivamente; lo cual demuestra que al disminuir el $T_{>MIC}$ necesario para provocar la muerte bacteriana, se compromete la eficacia de la combinación.

Aztreonam es estable frente a la hidrólisis por metalobetalactamasas (36), y esto podría explicar la sensibilidad de la cepa GRP-0053 (MIC = 8–16 mg/L), sin embargo, la combinación de ATM con CAZ, solo alcanzó un efecto bacteriostático, aún después de optimizar el iPK/PD, mientras que cuando se usó una combinación triple (ATM, AMK y CAZ), se logró efecto bactericida y se esterilizaron los muslos a las dosis más altas. Este hallazgo es concordante con estudios *in vitro* (*checkerboard*) que evaluaron el impacto en la muerte bacteriana combinando ATM y AMK contra *P. aeruginosa* y otros BGN, mostrando actividad sinérgica contra las cepas de *P. aeruginosa* que tenían una MIC para ATM entre 2 y 32 mg/L (37). Al adicionar meropenem y ciprofloxacina a la combinación descrita, para lograr combinaciones de 4 y 5 antibióticos (en la cepa GRP-0134), se obtuvo un mejor ajuste de la ecuación de Hill a los datos y disminuyó la magnitud de la interdependencia de los parámetros (multicolinealidad); esto hace que las estimaciones de los parámetros sean más precisas.

Las polimixinas habían entrado en desuso por su toxicidad, pero fueron rescatados ante la emergencia de cepas de BGN con resistencia de alto nivel. En monoterapia, causan disrupción rápida de la membrana citoplasmática, alterando la permeabilidad, y causando muerte celular; sin embargo, no es infrecuente la emergencia de resistencia. En tratamientos combinados, facilita la permeabilización de la membrana celular externa permitiendo la penetración de otros antibióticos (16). Yamagashi et al., (21) evaluó combinaciones de dosis altas de colistina y ATM contra cepas de *P. aeruginosa* sensibles a colistina (MIC 0.5-1 mg/L) en modelo de infección de muslo en ratón neutropénico, demostrando superioridad de la combinación cuando se comparó contra colistina o ATM en monoterapia. En nuestro estudio, usando una cepa de *P. aeruginosa* con menor sensibilidad a colistina (MIC de 4 mg/L), y comparando contra PMB en monoterapia, las combinaciones PMB + ATM y PMB + AMK alcanzaron mayor eficacia.

La combinación de colistina y VAN fue probada *in vitro* en distintos BGN y cepas planctónicas de *A. baumannii* MDR & XDR por Gordon et al. desde 2010, Liu X., en 2016 y otros investigadores (37–40). Vancomicina tiene un efecto nulo contra los BGN, debido a su gran tamaño e hidrofobicidad; pero se ha postulado que las propiedades de permeabilización de colistina podrían facilitar la penetración de los glicopéptidos a través de la membrana externa, para dirigirse a otros posibles blancos moleculares, aunque se desconoce si estos blancos existen en los BGN. Otras interacciones *in vivo* e *in vitro* entre colistina y daptomicina fueron descritas, tanto en cepas resistentes como susceptibles de *A. baumannii*, logrando sinergismo *in vitro* y erradicación de infección en un modelo murino (41,42). Nuestro estudio es el primero en evaluar en el modelo animal la utilidad de una combinación que incluye VAN contra *P. aeruginosa* XDR. Nosotros no encontramos mejoría significativa en la eficacia usando combinaciones de 3 y 4 antibióticos que incluyeron VAN, sin embargo, no realizamos experimentos con PMB + VAN que permitan establecer el efecto neto del glucopéptido en la combinación.

Tekin et al., (43) estudió el impacto (sinergia o antagonismo) del número de antibióticos incluidos en una combinación, con respecto a la capacidad de formar interrelaciones fisicoquímicas, y demostraron interacciones de sinergia que solamente emergieron cuando se emplearon más de 3 antibióticos. Aunque el resultado obtenido en nuestros experimentos con 5 antibióticos en la cepa GRP-0134 favorecería esa hipótesis, este comportamiento no fue similar en el grupo de experimentos en la cepa GRP-0053 cuya base fue PMB e incluyeron 3 o 4 antibióticos; esto sugiere que el efecto solo se logra con algunos grupos farmacológicos y con resultados variables para cada microorganismo, según la expresión de mecanismos de resistencia. Para comprobar todas estas hipótesis, es necesario realizar estudios más amplios en el modelo animal, que incluyan un mayor número de especies bacterianas, con expresión de diversos mecanismos de resistencia contra múltiples combinaciones de antibióticas.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, entre ellas el número de cepas utilizado, las limitaciones propias del modelo que no permiten optimizar el iPK/PD de betalactámicos en esquemas de 4 y 5 antibióticos, y el desconocimiento de los mecanismos de resistencia exactos, en ausencia de secuenciación genética, que incrementan los costos de cada experimento. Aunque la sensibilidad de la cepa GRP-0053 a aztreonam sugiere una probable expresión de metalobetalactamasas, otros mecanismos de resistencia pueden estar presentes.

En conclusión, nuestro estudio demostró eficacia de las combinaciones con AMK+ATM+CAZ una vez se optimizan los iPK/PD. A su vez la combinación PMB +

AMK logra mayor eficacia y reduce la dosis necesaria para alcanzar el mismo efecto, comparado con PMB en monoterapia o en combinación de tres o cuatro antibióticos.

Bibliografia

1. WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. World Health Organization. 2014;
2. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Current. 2013;
3. Tacconelli E. and Margrini N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. 2017.
4. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. Infectious Disease Clinics of North America. 2016.
5. Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Hong Nguyen M. Carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa bacteremia: Risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. Antimicrob Agents Chemother. 2017;
6. Paño Pardo JR, Villar SS, Ramos Ramos JC, Pintado V. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;
7. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2010.
8. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical Microbiology Reviews. 2009.
9. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2014.
10. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and Pseudomonas aeruginosa. Clin Infect Dis. 2006;
11. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. Korean Journal of Internal Medicine. 2012.
12. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of Staphylococcus aureus, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa in 2010. Current Opinion in Microbiology. 2007.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268–81.
14. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother. 2007;
15. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010.

- Infect Control Hosp Epidemiol. 2013 Jan;34(1):1–14.
16. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019;
 17. Alatoon A, Elsayed H, Lawlor K, AbdelWareth L, El-Lababidi R, Cardona L, et al. Comparison of antimicrobial activity between ceftolozane–tazobactam and ceftazidime–avibactam against multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Infect Dis.* 2017;
 18. Munita JM, Aitken SL, Miller WR, Perez F, Rosa R, Shimose LA, et al. Multicenter Evaluation of Ceftolozane/Tazobactam for Serious Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2017;
 19. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology.* 2019.
 20. Pefanis A, Giamarellou H, Karayiannakos P, Donta I. Efficacy of ceftazidime and aztreonam alone or in combination with amikacin in experimental left-sided *Pseudomonas aeruginosa* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;
 21. Yamagishi Y, Hagihara M, Kato H, Hirai J, Nishiyama N, Koizumi Y, et al. In vitro and in vivo Pharmacodynamics of Colistin and Aztreonam Alone and in Combination against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy.* 2017;
 22. Aoki N, Tateda K, Kikuchi Y, Kimura S, Miyazaki C, Ishii Y, et al. Efficacy of colistin combination therapy in a mouse model of pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;
 23. Yadav R, Bulitta JB, Wang J, Nation RL, Landersdorfer CB. Evaluation of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model-Based Optimized Combination Regimens against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Thigh Infection Model by Using Humanized Dosing Schemes. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Apr 5];61(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28993331>
 24. The Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2016.
 25. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: Challenges, issues, and recommendations. Vol. 57, *Journal of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology; 2018.
 26. Patel J.B., Cockerill R.F., Bradford A.P., Eliopoulos M.G., Hindler A.J., Jenkins G.S., Lewis S.J., Limbago B., Miller A.L., Nicolau P.D., Pwell M., Swenson M.J., Traczewski M.M., Turnidge J.D. WPMZLB. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical Lab Stand Institute). 2015;
 27. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose

- cyclophosphamide regimen: Characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis.* 2006;
28. Craig WA. State-of-the-Art Clinical Article: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1998 Jan 1 [cited 2020 Apr 7];26(1):1–10. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/516284>
 29. Rodriguez CA, Agudelo M, Gonzalez JM, Vesga O, Zuluaga AF. An optimized mouse thigh infection model for enterococci and its impact on antimicrobial pharmacodynamics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;
 30. Woods , GL. Washington J. The Clinicians and the microbiology laboratory. In Mandell G, Bennet J, Dolin R (ed), *Mandell, Douglas and Bennett´s principles and practice of infectious disease.* 1995. 169–199 p.
 31. Landersdorfer CB, Wang J, Wirth V, Chen K, Kaye KS, Tsuji BT, et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of systemically administered polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae* in mouse thigh and lung infection models. *J Antimicrob Chemother.* 2018;
 32. Ebert SC, Craig WA. Pharmacodynamic Properties of Antibiotics: Application to Drug Monitoring and Dosage Regimen Design. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 1990 Jun [cited 2020 Apr 21];11(6):319–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165081>
 33. Timurkaynak F, Can F, Azap ÖK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SÖ. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;
 34. Rodríguez-Hernández MJ, Pachón J, Pichardo C, Cuberos L, Ibáñez-Martínez J, García-Curiel A, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *J Antimicrob Chemother.* 2000;
 35. Greenber R N BM and CJ. Synergistic Activity of Amikacin With Aztreonam Against *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Gram-Negative Organisms. *Clin Ther.* 1986;8(3):354–8.
 36. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5046–54.
 37. Liu X, Yin H, Weng CX, Cai Y. Low-Frequency Ultrasound Enhances Antimicrobial Activity of Colistin-Vancomycin Combination against Pan-Resistant Biofilm of *Acinetobacter baumannii*. *Ultrasound Med Biol.* 2016;
 38. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Dec;54(12):5316–22.
 39. Shinohara DR, Menegucci TC, Fedrigo NH, Migliorini LB, Carrara-Marroni FE, Dos Anjos MM, et al. Synergistic activity of polymyxin B combined with

- vancomycin against carbapenem-resistant and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: First in vitro study. *J Med Microbiol*. 2019 Mar 1;68(3):309–15.
40. Ceccarelli G, Oliva A, d’Ettorre G, D’Abramo A, Caresta E, Barbara CS, et al. The role of vancomycin in addition with colistin and meropenem against colistin-sensitive multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* causing severe infections in a Paediatric Intensive Care Unit. *BMC Infect Dis [Internet]*. 2015 Sep 30 [cited 2020 Apr 21];15(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424078>
 41. Poulakou G, Renieris G, Sabrakos L, Zarkotou O, Themeli-Digalaki K, Perivolioti E, et al. Daptomycin as adjunctive treatment for experimental infection by *Acinetobacter baumannii* with resistance to colistin. *Int J Antimicrob Agents*. 2019 Feb 1;53(2):190–4.
 42. Galani I, Orlandou K, Moraitou H, Petrikkos G, Souli M. Colistin/daptomycin: An unconventional antimicrobial combination synergistic in vitro against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents [Internet]*. 2014 Apr [cited 2020 Apr 21];43(4):370–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24560919>
 43. Tekin E, White C, Kang TM, Singh N, Cruz-Loya M, Damoiseaux R, et al. Prevalence and patterns of higher-order drug interactions in *Escherichia coli*. *npj Syst Biol Appl*. 2018;

Suplemento

Anexo 1. Dosis antibióticas empleadas para cada fármaco probado en combinación.

Antibiótico	Dosis total (mg/kg/día)	Diluciones	Dosis (mg/kg/día)*					Dosis **		
			Máxima	Casi máxima	Media	Casi mínima	Mínima	6 ^{ta}	7 ^{ma}	8 ^{va}
Ceftazidime (CAZ)	512	1 en 2	512	256	128	64	32	-	-	-
Aztreonam (ATM)**	512	1 en 2	512	256	128	64	32	16	4	1
Amikacina (AMK)**	3072	1 en 4	3072	768	192	48	12	3	0.75	0.18
Ciprofloxacina (CIP)	150	1 en 4	150	37.5	9.37	2.34	0.58	-	-	-
Meropenem (MEM)	1280	1 en 2	640	320	160	80	40	-	-	-
Polimixina B (PMB)**	60	1 en 2	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.46	0.11
Vancomicina (VAN)**	2400	1 en 2	2400	1200	600	300	150	75	18.75	4.68

*Una vez definida la dosis total, la determinación de dosis desde mínima hasta máxima fue calculada realizando diluciones 1:2 o 1:4 desde la dosis máxima.

** Los experimentos que combinaron PMB + AMK, PMB + ATM + VAN y PMB + AMK + VAN + ATM evaluaron 8 dosis. Amikacina continuó diluciones 1:4 hasta la octava dosis, para los demás farmacos la sexta dosis se obtuvo por dilución 1:2, y las dosis subsiguientes por diluciones 1:4.