

VALUTAZIONE DEL TEST “AD FOSFOMYCIN” PER LA RILEVAZIONE DELLA MIC PER FOSFOMICINA TRAMITE AGAR-DILUIZIONE: ESPERIENZA DI UN SINGOLO CENTRO

A. Deni¹, A. Zignoli¹, S. Seclì², S. Ambretti¹

¹U.O. Microbiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138, Bologna, Italia
²U.O.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari, viale S. Pietro 43/B, 07100, Sassari, Italia



INTRODUZIONE

L'emergenza e la diffusione di **patogeni gram-negativi con profili di resistenza** che coinvolgono la gran parte dei farmaci disponibili, inclusi i **carbapenemi**, ha determinato la necessità di testare in modo appropriato tutte le possibili alternative terapeutiche, inclusi **farmaci di vecchia generazione** e di difficile gestione a livello di test di sensibilità in vitro, quali ad esempio colistina e fosfomicina. L'uso della **fosfomicina per via parenterale** è stato considerato, studiato e praticato nei casi di infezioni sistemiche da ceppi multi drug-resistant (MDR) e extensively drug-resistant (XDR).^{1,2} La fosfomicina per uso sistemico è in commercio in Italia da gennaio 2019.³

In base ai criteri stabiliti da EUCAST, il metodo di riferimento per i test di sensibilità alla fosfomicina è l'**agar-diluizione**,⁴ tale metodo tuttavia non è generalmente disponibile nella maggior parte dei laboratori di microbiologia, essendo difficilmente applicabile in un laboratorio di routine la complessa fase di preparazione dei terreni.

AD Fosfomycin™ (Liofilchem) è un test commerciale di recente introduzione che consente di rilevare la MIC per fosfomicina tramite il metodo dell'agar-diluizione. Il kit è costituito da un pannello dotato di 11 pozzetti di Mueller-Hinton (MH) Agar addizionato di fosfomicina e glucosio-6-fosfato secondo le indicazioni EUCAST, più un pozzetto di controllo. Il range di MIC valutate va da 0,25 a 260 mg/L.

Obiettivo: valutare la performance del pannello AD Fosfomycin, comparata ad un sistema automatizzato di microdiluizione in brodo (MicroScan™, Beckman Coulter), in una raccolta di isolati di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE) e di *Pseudomonas aeruginosa*.

METODI

- **34 ceppi isolati durante l'attività di routine batteriologica** della U.O. di Microbiologia dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna tra il 17 e il 31 luglio 2019 (28 CRE, di cui 22 ceppi di *Klebsiella pneumoniae*, isolate da tamponi della mucosa rettale di sorveglianza, e 6 *Pseudomonas aeruginosa* isolate da emocolture) sono stati inclusi nello studio.

- La valutazione della sensibilità ai farmaci antimicrobici è stata eseguita tramite **sistema semi-automatizzato MicroScan™** in uso di routine presso il laboratorio, utilizzando il pannello Neg Multidrug Resistant MIC1 (NMDRM1), che possiede un range di MIC per la fosfomicina che va da 16 a 64 mg/L.

- Parallelamente i ceppi sono stati inoculati su **pannello AD Fosfomycin™** secondo le istruzioni del produttore: ogni pozzetto del kit è stato inoculato con 2 µL di sospensione batterica alla densità di 0,5 ± 0,1 McFarland e diluita 1:10 in soluzione fisiologica sterile; la lettura dei risultati è stata eseguita dopo 16-24 ore di incubazione a 37°C in aria ambiente.

- Le MIC ottenute sono state interpretate secondo i breakpoint forniti da EUCAST (v. 9.0, 2019). Non essendo forniti breakpoint per *Pseudomonas aeruginosa*,⁵ sono stati valutati unicamente i valori di MIC ottenuti.

- I risultati sono stati confrontati in termini di **essential agreement** (definito come differenza massima di una diluizione fra le MIC) e **categorical agreement** (in questo caso solo per gli isolati di Enterobacteriaceae).

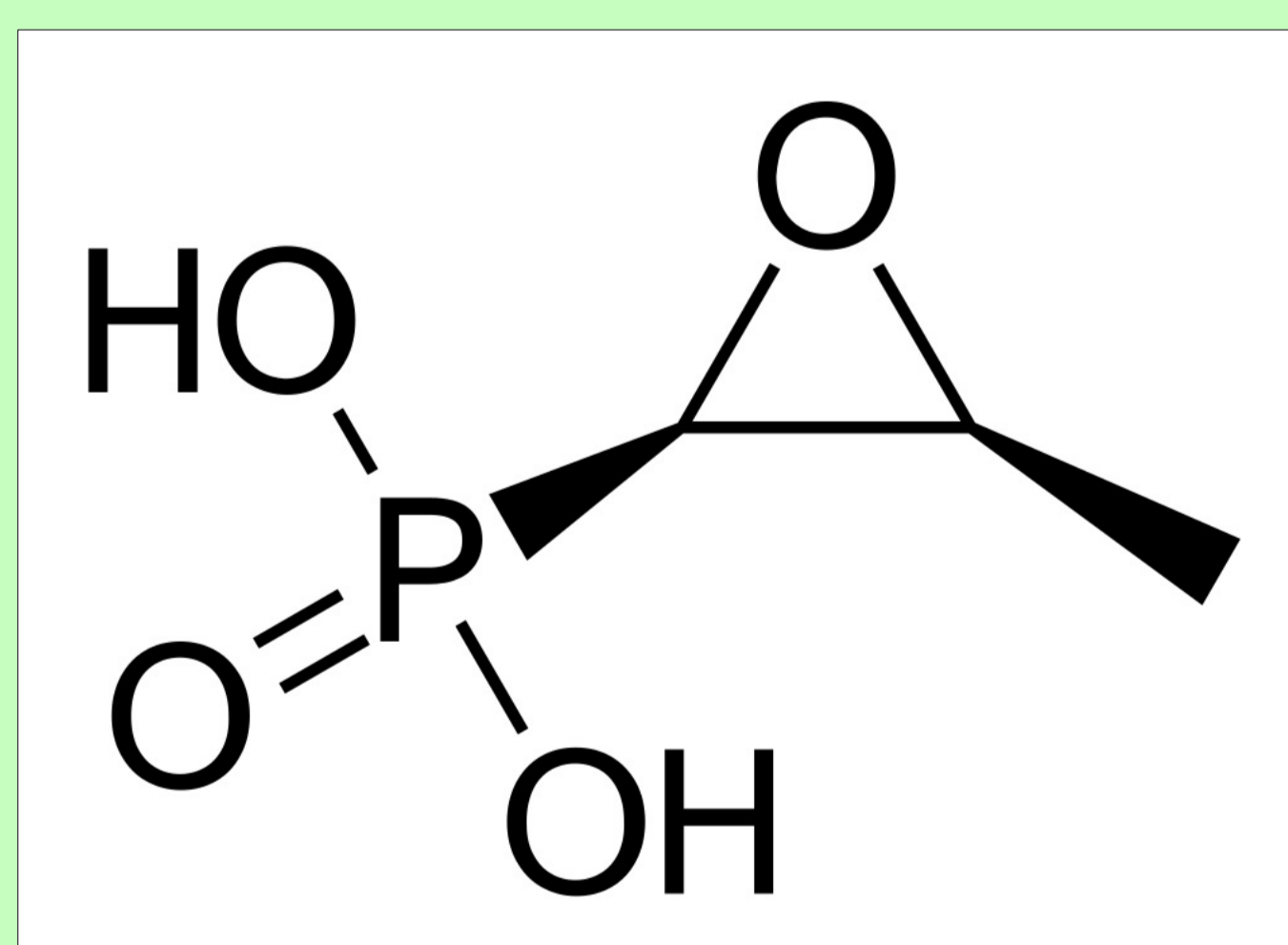
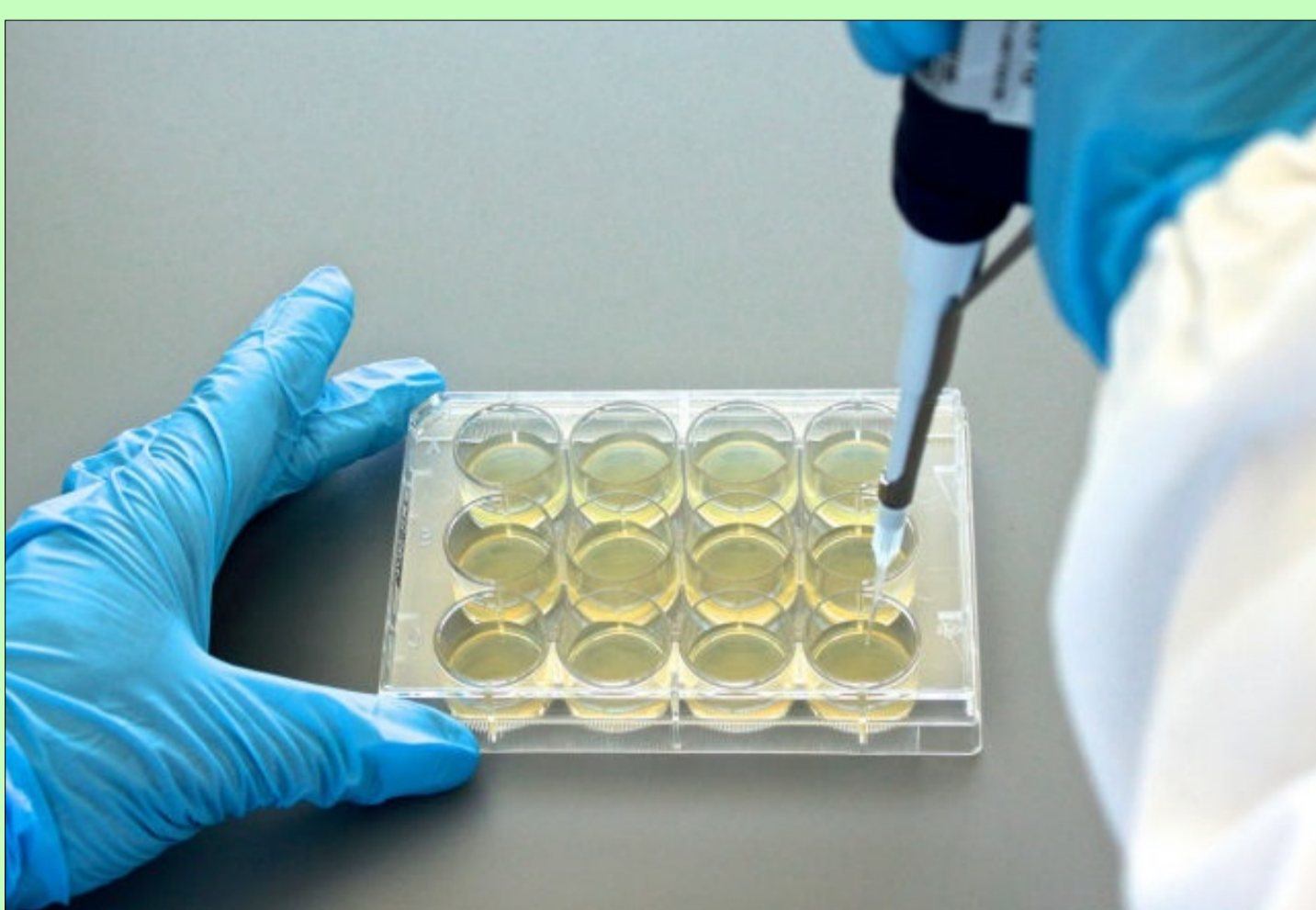


Fig. 1 – Presentazione del kit AD Fosfomycin™

Fig. 2 – Struttura della fosfomicina

La **fosfomicina** è una molecola ad azione **battericida** prodotta naturalmente da alcune specie di *Streptomyces*. Si tratta di un analogo del fosfoenolpiruvato, dotato di un **gruppo epossidico** molto reattivo, che inattiva permanentemente l'enzima batterico **MurA**, coinvolto nella sintesi del peptidoglicano.^{1,2,5}

È stata ampiamente utilizzata nel trattamento delle **infezioni urinarie non complicate**, in virtù della sua farmacocinetica che ne prevede l'escrezione immodificata nelle urine. Nelle infezioni sistemiche da ceppi MDR e XDR viene generalmente utilizzata in **combinazione** con altri antimicrobici, molti dei quali potenziano sinergicamente la sua attività battericida.^{1,2}

Le **resistenze** insorgono frequentemente in monoterapia per mutazione del trasportatore batterico del glicerofosfato, o per espressione di enzimi che agiscono fosforilando la molecola o idrolizzando l'anello epossidico.⁶ Il saggio di suscettibilità in vitro necessita dell'aggiunta di **glucosio-6-fosfato** al terreno di coltura, che induce la captazione di fosfomicina da parte della cellula batterica.^{1,5}

RISULTATI

FENOTIPO	N	MicroScan™		AD Fosfo™	
		S	R	S	R
KPC	24	13	11	18	6
VIM/NDM	3	2	1	2	1
KPC+NDM	1	1	0	1	0
TOTALE	28	16	12	21	7

SPECIE	N	MicroScan™		AD Fosfo™	
		S	R	S	R
<i>K. pneum.</i>	22	11	11	16	6
<i>E. coli</i>	2	2	0	2	0
Altre specie	4	3	1	3	1
TOTALE	28	16	12	21	7

ISOLATI <i>P. aerug.</i>	MIC Micro Scan™	MIC AD Fosfo™
1	>64	64
2	>64	>256
3	32	64
4	>64	32
5	64	128
6	32	64

AGREEMENT	
Essential (Enterobacteriaceae)	75%
Essential (Pseudomonas)	83,33%
Essential (totale)	76,47%
Categorical (Enterobacteriaceae)	82,14%

- 7 isolati di Enterobacteriaceae sono risultati **resistenti** alla fosfomicina sul pannello AD Fosfomycin™, rispetto a 12 sul sistema MicroScan™.

- Il tasso di **essential agreement** è risultato del 75% per gli isolati di Enterobacteriaceae (n=28) e 83,3% per gli isolati di *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), con un tasso complessivo di 76,5% (n=34).

- Il tasso di **categorical agreement** per gli isolati di Enterobacteriaceae è risultato del 82,1%, pari a 23 isolati su 28; in tutti i rimanenti 5 isolati, la MIC rilevata dal sistema MicroScan™ risultava **più elevata** di quella rilevata dal pannello AD Fosfomycin™.

CONCLUSIONI

Il saggio AD Fosfomycin™ oggetto dello studio è risultato un metodo di facile esecuzione ed interpretazione. Al momento rappresenta l'unico test commerciale disponibile per valutare la sensibilità a fosfomicina con il metodo dell'agar diluizione, con un range di MIC molto ampio (0.25-256).

Rispetto a questo metodo, il saggio semi-automatico MicroScan™, oltre ad essere caratterizzato da un range di MIC più limitato, ha evidenziato una tendenza a sovrastimare le MIC per fosfomicina negli isolati di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi con una quota di major errors intorno al 20%. Discrepanze fra agar-diluizione, diluizione in brodo e discodiffusione sono ampiamente riportate in letteratura per isolati diversi da *Escherichia coli*.⁴

In conclusione, il metodo AD Fosfomycin™ sembra rappresentare una soluzione diagnostica interessante per la valutazione della sensibilità in vitro di un antimicrobico diventato rilevante per la gestione delle infezioni da patogeni gram-negativi MDR, anche se ulteriori studi di confronto sono necessari per confermare l'affidabilità dei risultati rispetto all'agar diluizione di riferimento

[1] Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. 2016. *Fosfomicin*. Clin Microbiol Rev 29:321–347 doi:10.1128/CMR.00068-15.

[2] Dijkmans AC, Zacarias NVO, Burggraaf J, et al. *Fosfomicin: Pharmacological, Clinical and Future Perspectives*. Antibiotics (Basel). 2017;6(4):24. doi:10.3390/antibiotics6040024

[3] *Autorizzazione all'immissione in commercio del medicinale per uso umano «Infectofos» (19A00073)*. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.8 del 10-01-2019.

[4] *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.

[5] *Rationale for the EUCAST clinical breakpoints*. Version 1.0, 2013.

[6] Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. *Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomicin Resistance*. Antibiotics (Basel). 2013;2(2):217–236. doi:10.3390/antibiotics2020217