



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mia Slade Vitković

**UČINAK FOSFOMICINA *IN VITRO* U
KOMBINACIJI S DRUGIM
ANTIBIOTICIMA PREMA KLINIČKIM
IZOLATIMA I BIOFILMU BAKTERIJE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mia Slade Vitković

**UČINAK FOSFOMICINA *IN VITRO* U
KOMBINACIJI S DRUGIM
ANTIBIOTICIMA PREMA KLINIČKIM
IZOLATIMA I BIOFILMU BAKTERIJE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Branka Bedenić

izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mia Slade Vitković

***IN VITRO* EFFECT OF FOSFOMYCIN
COMBINED WITH OTHER ANTIBIOTICS
ON CLINICAL ISOLATES AND BIOFILM
OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Professor Branka Bedenić, PhD

Associate Professor Gordana Maravić Vlahoviček, PhD

Zagreb, 2024

Ova disertacija izrađena je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb te na Odjelu za mikrobiologiju i Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog Zavoda za transfuzijsku medicinu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Bedenić i izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček.

Zahvala

Iznimno hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Branki Bedenić na strpljenju, toleranciji, trudu, vremenu, savjetima i pomoći koja mi je bila potrebna pri izradi ove disertacije. Jednako se zahvaljujem i svojoj drugoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček koja je svojim iskustvom, strpljenjem, usmjeravanjem i mudrim savjetima pridonijela izradi ovog rada.

Posebno i neizmerno hvala prim. dr. sc. Ivanki Batarilo, voditeljici odjela za mikrobiologiju pri Zavodu za transfuzijsku medicinu, bez čije podrške i usmjeravanja danas ne bih bila ovdje, koja me kroz moj profesionalni put vodila u svakom smislu riječi.

Veliko hvala mojim kolegama, prvenstveno iz Odjela za mikrobiologiju, ali i sa Odjela za molekularnu dijagnostiku i drugih odjela pri Zavodu za transfuzijsku medicinu na strpljenju, savjetima, pomoći i potpori koju su nesebično pružali.

Posebno hvala prof. dr. sc. Ireni Jukić što mi je sve ovo omogućila.

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, koji su bili neizmerna podrška i pomoć, na strpljenju koje je nerijetko bilo potrebno, prof. dr. sc. Ivani Mareković, tadašnjoj predstojnici Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, što mi je odobrila i omogućila izradu praktičnog rada te kolegicama dr. Sari Kibel Šoštarko i dr. Maji Bogdanić na pomoći i vremenu.

U konačnici, hvala mojoj obitelji, suprugu i bakama na strpljenju, podršci i ljubavi, a posebno što su pomogli kada je posla bilo puno, a obaveza još više.

Kada se okružimo dobrim ljudima, sve je moguće.

SAŽETAK

Pseudomonas aeruginosa (PA) jedan je od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. Uzrokuje veliku zabrinutost s obzirom na stalni porast otpornosti na antibiotike. *P. aeruginosa* također stvara biofilm, gdje je nedostupan antibioticima i imunom sustavu domaćina. Stari antibiotik fosfomicin sve se češće koristi u terapiji sistemnih infekcija uzrokovanih otpornim bakterijama zbog specifičnog mehanizma djelovanja i očuvane aktivnosti prema bakterijama otpornim na antibiotike, uključujući višestruko otporne bakterije, s obzirom na to da ne postoji križna otpornost. Bolja učinkovitost može se postići kombiniranim davanjem antibiotika. Cilj istraživanja bio je odrediti *in vitro* sinergiju fosfomicina s osam antibiotika koji se koriste u liječenju PA infekcija koristeći izolate te bakterije s različitim determinantama rezistencije, uključujući višestruko otporne i ekstenzivno otporne izolate. Cilj je također bio ispitati postantibiotički učinak fosfomicina samog i u kombinaciji s istim antibioticima i utvrditi učinak kombinacija vršnih koncentracija antibiotika na inhibiciju i razaranje biofilma koji stvaraju izolati te bakterije. Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je metodom disk difuzije i određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) dilucijskom metodom. MIK je određen metodom agar dilucije, dilucije u bujonu i pomoću test traka s predefiniranim gradijentom koncentracije (E-test). Proizvodnja β -laktamaza utvrđena je fenotipskim testovima i lančanom reakcijom polimeraze. Sinergija je ispitana metodom ukriženih trakica i „*time-kill*“ metodom. Postantibiotički učinak je određen metodom brojanja poraslih kolonija po uklanjanju antibiotika kojemu su bakterije bile izložene. Stvaranje biofilma, inhibicija stvaranja i disrupcija biofilma ispitani su statičkim testom u mikrotitarskim pločicama s kristal violetom. Otpornost na fosfomicin registrirana je kod značajnog dijela kliničkih izolata *P. aeruginosa* (52,9 %). Najveća stopa sinergije određena metodom ukriženih trakica postignuta je u kombinacijama fosfomicina s ceftazidimom (21,6 %) i gentamicinom (17,7 %). „*Time-kill*“ metodom je sinergija s fosfomicinom registrirana kod 3 od 4 izolata u kombinacijama s kolistinom i gentamicinom. Čini se da je sinergija fosfomicina s drugim antibioticima ovisna o samom soju i njegovim svojstvima te odabranoj metodi za analizu sinergije, ali ne i o mehanizmu rezistencije. Iako su sve kombinacije s antibioticima produljile postantibiotički učinak, najbolji rezultat, uz registriranu sinergiju kod jednog od četiri izolata i aditivni učinak kod druga tri izolata, postignut je u kombinaciji s kolistinom. Negativne vrijednosti PAE nisu zabilježene niti s jednom kombinacijom. Prema rezultatima ispitivanja biofilma u mikrotitarskim pločicama svi ispitani sojevi bili su proizvođači biofilma. Predominantno je registriran učinak kombinirane terapije na inhibiciju stvaranja biofilma. Kombinirana terapija

bila je učinkovitija u sprječavanju nastanka biofilma od monoterapije, čak i kod izolata otpornih na pojedinačno primijenjene antibiotike, pri primjeni vršnih serumskih koncentracija. Najviše stope inhibicije stvaranja biofilma u otpornih izolata *P. aeruginosa* zabilježene su u kombinacijama fosfomicina s kolistinom, cefepimom i ceftazidimom. Kombinacije s ispitivanim β -laktamskim antibioticima i kolistinom imale su snažniji učinak na inhibiciju formiranja biofilma od inhibitora sinteze proteina. Rezultati dobiveni u ovoj studiji mogli bi biti klinički značajni u pogledu terapije različito otpornog *P. aeruginosa*, ali i profilakse stvaranja biofilma u takvih izolata.

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, višestruko otporna bakterija, prošireno otporna bakterija, fosfomicin, sinergija antibiotika, „time-kill“ metoda, metoda ukriženih trakica, postantibiotički učinak, biofilm, inhibicija stvaranja biofilma, razaranje biofilma

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* causes various infections, especially in individuals with weakened immune system or underlying health conditions. It is considered one of the most important hospital-acquired pathogens and its treatment is becoming more challenging due to intrinsic and acquired resistance. *P. aeruginosa* is also known for its ability to form biofilms on human tissues and on different surfaces. Biofilms enable bacteria to undergo harsh conditions, escape the host immune system and antibiotics. Biofilms can be the source of persistent and recurrent infections and biofilm formation is considered one of the most important virulence factors in *P. aeruginosa*.

Fosfomycin recently reemerged as an interesting treatment option for antimicrobial-resistant infections, as no cross resistance and low rates of resistance are expected. It has also been shown to penetrate very well into mature biofilms formed by *P. aeruginosa* and enhance the penetration of other antibiotics. Although antibiotics are more useful in prevention of biofilm formation, some data also suggest reduction of biofilm matrix in the presence of antibiotics, proposing different mechanisms.

Fosfomycin monotherapy is of concern because of rapid mutant selection, therefore dual antimicrobial coverage is often advised. Moreover, since monotherapy is usually not successful in the eradication of biofilms, combination therapy is an important treatment alternative.

Recent studies have shown synergy of fosfomycin with different β -lactam antibiotics, aminoglycosides, quinolones, and polymyxins. However, the rate of synergy depended on the method used to detect it. According to a 2020 review study, fosfomycin exhibited synergy mostly with chloramphenicol (53 %), aminoglycosides (43 %) and cephalosporins (36 %). Additionally, antagonism has been reported with β -lactam antibiotics, quinolones and aminoglycosides. So far, evidence of synergy in MDR and XDR isolates, particularly those harbouring metallo- β -lactamases (MBLs) are extremely scarce.

The postantibiotic effect could be used in modulation of dosage regimes. Only a few studies have recorded a modest fosfomycin PAE (0.3 – 2.5 h with concentrations of 4 mg/L and 1.1-5.5 h with concentrations of 256 mg/L) against clinical isolates of *P. aeruginosa in vitro*. There are no reports on the effect of fosfomycin in combination on the duration of PAE. This void in evidence calls for further investigation, as a less frequent dosage regime may be of value in regard of drug toxicity.

Synergy against biofilm of *P. aeruginosa* has been shown for several antimicrobial combinations, mostly for combinations with aminoglycosides and quinolones. Eradication of

biofilm has been reported in combination with tobramycin. However, combination therapy studies with fosfomycin on *P. aeruginosa* biofilms are limited and mostly carried out on a few isolates, using few antibiotic combinations.

The aim of this study was to determine the most successful antibiotics to be combined with fosfomycin against clinical isolates of *P. aeruginosa* with various resistance patterns and resistance genes content, including MDR and XDR isolates, and to determine the effect of different antibiotics on the duration of PAE induced by fosfomycin. The aim was also to evaluate the inhibition of biofilm formation (IBF), as well as disruption of preformed biofilm (BD), *in vitro* on clinical isolates of *P. aeruginosa* with various resistance traits.

Materials and methods: In total 51 *P. aeruginosa* isolates were included in the study, of which 49 were collected from various clinical specimens in five hospital centres in Croatia and two of them, harbouring PER-1 and VIM-2, were kindly provided by G. M. Rossolini (Microbiology and Virology Unit, Careggi University Hospital, 50134 Florence, Italy). The isolates were identified using Vitek 2 and MALDI-TOF MS. Antibiotic susceptibility was performed by disc-diffusion and broth microdilution method in 96 well microtiter plates and Mueller-Hinton broth (MHB). The minimum inhibitory concentration (MIC) of fosfomycin was determined by agar dilution test and E-test. A breakpoint value of $> 64 \mu\text{g/mL}$ was used to define resistance. The isolates were classified as susceptible (S), multidrug (MDR), extensively drug resistant (XDR) and pandrug resistant (PDR) according to Magiorakos et al. The AmpC disc test was preformed to detect AmpC hyperexpression. Carbapenemases were identified using phenotypic tests: the modified Hodge test, the carbapenem inactivation method and the combined disc test. The presence of genes encoding metallo- β -lactamases belonging to VIM, IMP and NDM family was determined by polymerase chain reaction (PCR). Synergy was assessed using gradient diffusion strip cross method and time-kill assay. The postantibiotic effect was determined using a standard viable counting method. To quantitatively detect biofilm, the microtiter plate assay was employed for forty-three clinical isolates. Thirteen strong and eleven moderate biofilm producers were used to evaluate anti-biofilm properties of fosfomycin alone and in combination with antipseudomonal antibiotics. All the isolates were MDR or XDR. Inhibition and eradication/disruption of *P. aeruginosa* biofilm were evaluated using the crystal violet assay.

Results: There were 39.2 % (n=20) multidrug-resistant (MDR) and 49 % (n=25) extensively drug-resistant isolates (XDR). None of the isolates belonged to the pandrug resistant (PDR) category. The rate of susceptibility to fosfomycin was 47.1 % (n= 4). In total 54.9 % (n=28) isolates displayed a positive modified Hodge and positive CIM test, while 58.8 % (n=30) of

isolates demonstrated a positive combined disk test with EDTA test. VIM metallo- β -lactamase was identified in 51 % (n=26) isolates. Two isolates harboured *bla*_{PER-1}.

The highest rate of synergy determined with the GDSC method was obtained for fosfomycin in combination with ceftazidime (21.6 %, n = 11), followed by gentamicin (17.7 %, n = 9). Other combinations yielded low rates of synergy. Employing the time kill method, combinations with gentamicin and colistin mostly resulted in synergy and presented with a strong bactericidal effect after 24 h. A strong bactericidal effect was also observed in combinations with imipenem. The two different synergy assays showed different levels of correlation. A MIC lowering effect for at least one dilution was also observed in this study for all antibiotics in combination.

Fosfomycin produced a short PAE in all tested strains. The longest PAE effect was observed with ciprofloxacin with duration up to 4.45 h. Combinations with fosfomycin mostly prolonged the PAE. The longest PAE effect of antibiotic combinations was observed in combination with ciprofloxacin (> 6h). PAE synergy was observed in one of four combinations with colistin only. All of 43 tested isolates were biofilm producers. Out of those, 32.6 % (n=14) were strong biofilm producers (SBP), 41.9 % (n=18) were medium biofilm producers (MBP), and 25.6 % (n=11) were weak biofilm producers (WBP).

For the inhibition of biofilm formation (IBF) test and the biofilm disruption test 13 strong and 11 moderate biofilm producers were employed. The highest IBF rates were observed with colistin alone and in combination and cefepime alone and in combination. All other antibiotic combinations, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, imipenem, gentamicin, ciprofloxacin, and amikacin, resulted in significant IBF levels in comparison to single use. Furthermore, all antibiotic combinations resulted in a higher share of NBP. In contrast, no statistically significant biofilm disruption was observed, when these antibiotics, alone or in combination, were used on mature biofilms, regardless of the time of exposure to antibiotics.

Conclusion: The results of this study indicate that a substantial proportion of clinical isolates is already resistant to fosfomycin. The synergistic effect does not seem to depend on the detected resistance mechanism and the most promising combinations with fosfomycin that could be effective in the treatment of variously resistant *P. aeruginosa* infections are combinations with ceftazidime, gentamicin and colistin. Furthermore, the MIC lowering effect observed using GDSC could be of use in situations where MICs of both antibiotics are slightly above the breakpoint value and the GDSC a feasible method that could be implemented in clinical laboratories.

Although no major PAE synergism was noticed in this study, the effect of antibiotic combinations was superior to that of the drugs alone, especially in combinations with colistin. These results could prove to be valuable in regard of drug dosing regimens.

According to the results of the study, neither inhibitory, nor disruptory effects of fosfomycin alone against *P. aeruginosa* biofilm were recorded. The effect of fosfomycin combination therapy has mostly been observed in prevention of biofilm formation, rather than biofilm disruption. The most prominent biofilm inhibition potential of antibiotic combinations was observed with ceftazidime, cefepime and colistin, despite high resistance rates to ceftazidime, cefepime and fosfomycin. Additionally, according to these results, β -lactam antibiotics and colistin have a more potent BFI effect in comparison to protein synthesis inhibitors, even when not combined with fosfomycin. Furthermore, in comparison to single use of antibiotics, all antibiotic combinations resulted in significantly higher biofilm inhibition rates. The results of this study could be clinically valuable not only regarding treatment of variously resistant *P. aeruginosa* isolates, but also regarding biofilm formation profilaxis of those isolates.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug-resistant, extensively drug-resistant; fosfomycin; antibiotic synergy; time-kill method; gradient diffusion strip method; postantibiotic effect, biofilm, inhibition of biofilm formation, disruption of preformed biofilm

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Fosfomicin.....	3
1.2	β -laktamaze.....	8
1.2.1	Klasifikacija β -laktamaza	8
1.2.2	β -laktamaze proširenog spektra	8
1.2.3	AmpC β -laktamaze	9
1.2.4	Karbapenemaze.....	9
1.2.5	Metalo- β -laktamaze	10
1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.3.1	Opće karakteristike	11
1.3.2	Klinički značaj.....	13
1.3.3	Otpornost na antibiotike.....	15
1.3.3.1	Urođena otpornost.....	17
1.3.3.2	Otpornost kao posljedica promjena na staničnoj membrani.....	18
1.3.3.3	Stečena rezistencija na β -laktamske antibiotike	18
1.3.3.4	Stečena rezistencija na aminoglikozide	19
1.3.3.5	Rezistencija na kinolone	19
1.3.3.6	Rezistencija na kolistin	20
1.3.3.7	Rezistencija na fosfomicin.....	20
1.4	Kombinirana antimikrobna terapija.....	21
1.4.1	Interakcije među antibioticima	21
1.4.2	Sinergija fosfomicina s drugim antibioticima.....	23
1.5	Postantibiotički učinak	28
1.6	Biofilm.....	30
1.6.1	Uloga biofilma kod infekcija <i>P. aeruginosa</i>	31

2	OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI RADA.....	34
3	MATERIJAL I METODE	36
3.1	MATERIJAL	36
3.1.1	Gotove komercijalne mikrobiološke podloge i njihove komponente.....	36
3.1.2	Komercijalni biokemijski testovi.....	38
3.1.3	Kemikalije, reagensi i boje	38
3.1.4	Standardi molekulskih masa	38
3.1.5	Reagensi za lančanu reakciju polimeraze	38
3.1.6	Nukleinske kiseline.....	38
3.1.7	Antibiotici za ispitivanje rezistencije na antibiotike.....	39
3.1.7.1	Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom (Mast Group, UK)....	39
3.1.7.2	Trakice s gradijentom antibiotika za epsilometarski test -E-test (Liofilchem, Italija).....	39
3.1.7.3	Antibiotici u prahu za pripremu matične otopine s početnom koncentracijom antibiotika (Sigma-Aldrich, SAD)	40
3.1.8	Uređaji	40
3.1.9	Laboratorijski pribor i potrošni materijal.....	41
3.2	METODE.....	43
3.2.1	Prikupljanje izolata	43
3.2.2	Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike	43
3.2.2.1	Disk-difuzijska metoda.....	43
3.2.2.2	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije metodom dilucije u bujonu.....	44
3.2.3	Detekcija karbapenemaza	46
3.2.3.1	Fenotipska detekcija karbapenemaza.....	47
3.2.3.1.1	Modificirani Hodge test	47
3.2.3.1.2	Metoda inaktivacije karbapenema	47
3.2.3.1.3	Metoda kombiniranog diska za detekciju metalo-β-laktamaza ..	48

3.2.3.2	Molekularna detekcija gena za karbapenemaze.....	48
3.2.3.2.1	Ekstrakcija DNA.....	48
3.2.3.2.2	Lančana reakcija polimeraze	48
3.2.4	Ispitivanje sinergije antibiotika.....	49
3.2.4.1	Metoda ukriženih trakica s koncentracijskim gradijentom.....	49
3.2.4.2	„Time-kill“ metoda	50
3.2.5	Postantibiotički učinak.....	52
3.2.6	Ispitivanje stvaranja biofilma.....	53
3.2.6.1	Inhibicija stvaranja biofilma i razaranje već stvorenog biofilma	54
3.2.6.2	Kvantifikacija inhibicije biofilma.....	55
3.2.7	Statistička obrada podataka	56
4	REZULTATI.....	57
4.1	Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove.....	57
4.2	Detekcija β -laktamaza fenotipskim metodama.....	58
4.3	Molekularna detekcija gena rezistencije.....	59
4.4	Ispitivanje sinergije.....	65
4.4.1	Metoda ukriženih trakica	65
4.4.2	„Time-kill“ metoda	68
4.5	Postantibiotički učinak	77
4.6	Detekcija biofilma	80
4.6.1	Otpornost na antibiotike izolata ispitanih na proizvodnju biofilma	80
4.7	Inhibicija stvaranja biofilma	81
4.8	Razaranje stvorenog biofilma.....	87
5	RASPRAVA	90
6	ZAKLJUČCI.....	98
7	POPIS LITERATURE	99
8	ŽIVOTOPIS	114

9	POPIS KRATICA.....	118
---	--------------------	-----

1 UVOD

Pojava i širenje bakterijskih sojeva otpornih na antibiotike, kao i nedostatak razvoja novih antimikrobnih lijekova koji su aktivni protiv takvih bakterija, dva su značajna problema današnje antimikrobne terapije. Ovisno stupnju otpornosti prema antibioticima, izolati se klasificiraju kao osjetljivi, višestruko otporni (engl. *multidrug-resistant*, MDR), prošireno ili opsežno otporni (engl. *extensively drug-resistant*, XDR) i potpuno ili posvemašnje otporni (engl. *pandrug-resistant*, PDR) prema Anna-Pelagii Magiorakos (1). Terapijske opcije infekcija uzrokovanih otpornim bakterijama su ograničene, povezane su s lošijim terapijskim ishodom, češćim komplikacijama tijekom liječenja i povećanim mortalitetom.

Fosfomicin je stari i zaboravljeni antibiotik širokog spektra koji ne pripada niti jednoj skupini antibiotika, stoga ne dolazi do križne otpornosti. Širok spektar, očuvana aktivnost i izostanak unakrsne rezistencije, razlozi su novog interesa za upotrebu ovog antibiotika, osobito u terapiji infekcija uzrokovanih bakterijama otpornih na niz drugih antibiotika. Zbog brze selekcije otpornih mutanata, međutim, sugerira se korištenje u kombinaciji s drugim antibioticima (2–4). Fosfomicin je male molekularne mase, i prema nekim izvorima, može dobro penetrirati u zreli biofilm koji stvara *P. aeruginosa* (5,6).

P. aeruginosa jedan je od najznačajnijih bolničkih patogena, a infekcije koje uzrokuje predstavljaju izniman terapijski problem zbog otpornosti na antimikrobne lijekove (7,8). Uzgojno je nezahtjevna bakterija koja preživljava na raznim površinama, a u bolničkim uvjetima brzo kolonizira kožu i probavni sustav pacijenata. Uzrokuje niz infekcija kao što su infekcije rana, opekline, bakterijemije, sepse, pneumonije kod oboljelih od cistične fibroze i one povezane s mehaničkom ventilacijom, meningitis i infekcije mokraćnog sustava. Ima sposobnost stvaranja biofilma na raznim površinama, poput katetera i implantata, te tkivima, što značajno otežava liječenje. Biofilm je zajednica mikroorganizama, gdje su bakterije uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, gdje su zaštićene od negativnih utjecaja iz okoliša, između ostalog i imunskog sustava domaćina. Također, bakterije u biofilmu pokazuju značajno veći stupanj otpornosti na antimikrobne lijekove.

β -laktamaze su enzimi koje proizvode različite vrste bakterija, a njihov supstrat su β -laktamski antibiotici. U klinički značajne β -laktamaze ubrajamo β -laktamaze proširenog spektra (eng. *extended spectrum β -laktamase*, ESBL), AmpC β -laktamaze i karbapenemaze.

Terapija infekcija koje uzrokuju višestruko otporne bakterije, osobito onih koje proizvode karbapenemaze, iznimno je ograničena.

Jedna od preostalih terapijskih opcija pri infekcijama otpornim bakterijama je kombinirana antimikrobna terapija. Istovremena primjena antibiotika može dovesti do njihovih međusobnih interakcija, pa tako rezultirati sinergijom, aditivnim učinkom ili antagonizmom. Ako interakcija izostane, radi se o indiferenciji. Iako pri kombiniranoj primjeni antimikrobne terapije najčešće dolazi do aditivnog učinka ili indiferencije, priželjkivani efekt je sinergija, kod kojeg dolazi do značajno potentnijeg djelovanja antibiotika nego pri njihovoj pojedinačnoj primjeni. Kombinacija antibiotika može spriječiti pojavu rezistentnih mutanata, proširiti antimikrobni spektar i reducirati mortalitet. Prema literaturi, može biti od koristi i kada je bakterija otporna na svaki od antibiotika zasebno, zbog povrata osjetljivosti u kombinaciji (3,9–11). Monoterapija se također ne preporučuje kod biofilm infekcija, stoga kombinirana terapija predstavlja terapijsku opciju i u takvim infekcijama. Sinergija s fosfomicinom prema biofilmu koje stvara *P. aeruginosa* je najčešće dokumentirana s aminoglikozidima i kinolonima (12).

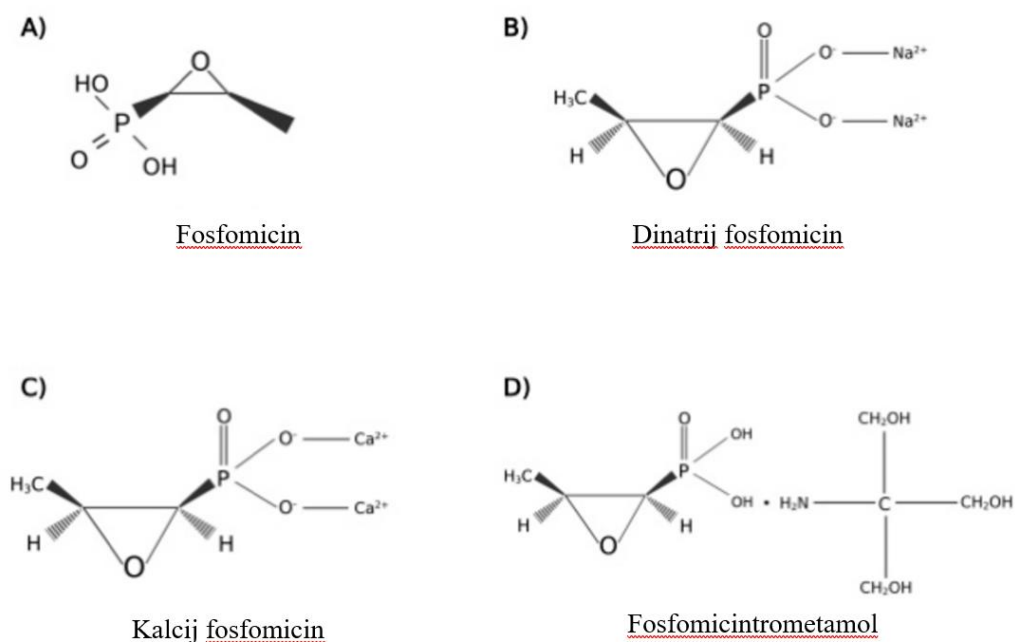
Postantibiotički učinak (PAE) označava inhibiciju bakterijskog rasta nakon kratkotrajnog izlaganja antibiotiku, kada antibiotika više nema u mediju ili je njegova koncentracija ispod MIK vrijednosti. Dulji postantibiotički učinak omogućava rjeđi terapijski režim, pa time i manji ukupni trošak i manje nuspojave.

1.1 Fosfomicin

Fosfomicin, stari i odbačeni antibiotik, odnedavno je ponovo postao zanimljiv kao izbor u terapiji sistemskih bakterijskih infekcija uzrokovanih višestruko otpornim bakterijama, obzirom na kontinuirani porast rezistencije i posljedično smanjenje terapijskih mogućnosti te očuvane aktivnosti protiv takvih bakterija zbog specifičnog mehanizma djelovanja.

Fosfomicin je širokospektralni antibiotik, analog fosfoenolpiruvata koji proizvode vrste roda *Streptomyces*. Otkriven je 1969. godine, a danas se dobiva kemijskom sintezom. Niske je molekularne mase i ne pripada nijednoj skupini antibiotika, stoga nema križne rezistencije.

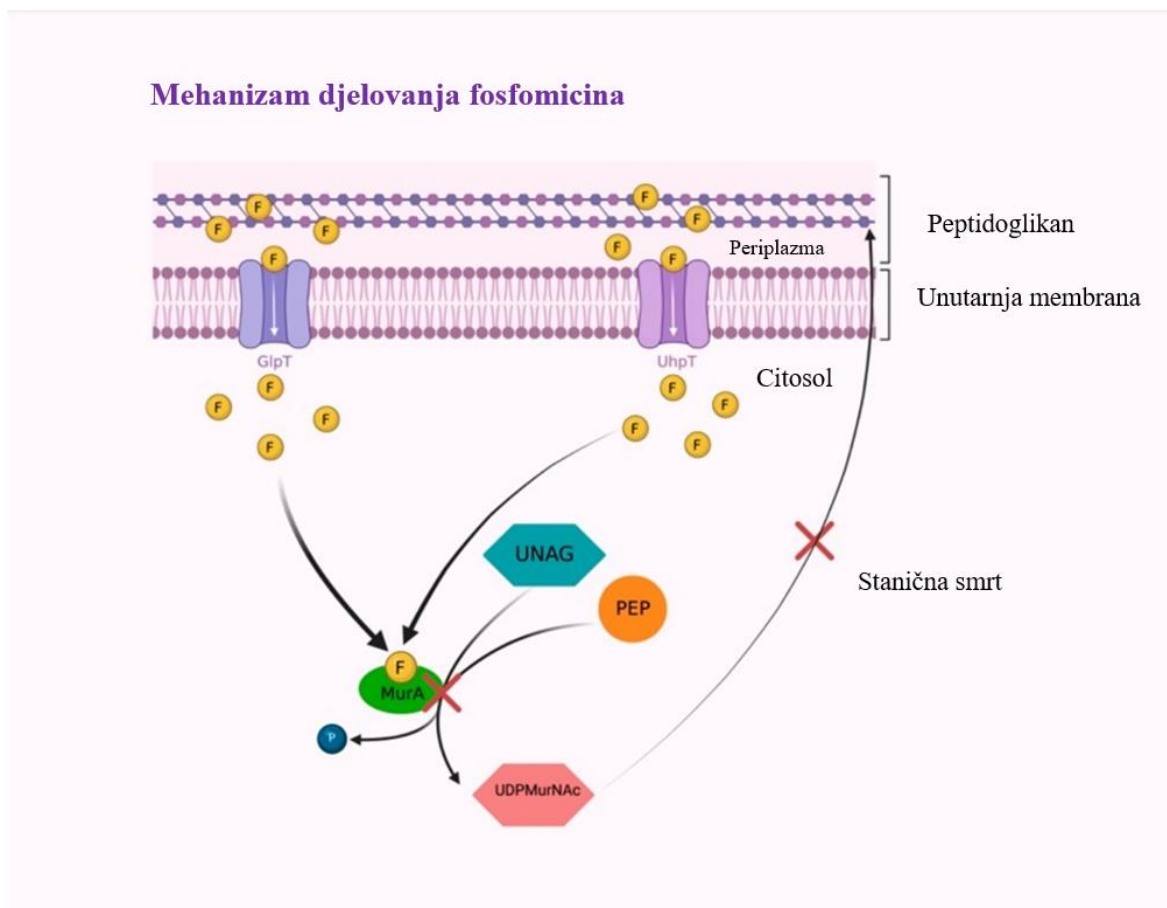
Postoji u dvije oralne formulacije, fosfomicintrometamol i kalcij fosfomicin, i jednoj intravenskoj formulaciji, dinatrij fosfomicin, slika 1. Peroralni oblik koristi se za liječenje nekompliciranih i kompliciranih urinarnih infekcija. Dobro se podnosi, ima dobar sigurnosni profil te ne utječe previše na gastrointestinalnu floru, a rizik od *Clostridium difficile* uzrokovane dijareje je malen. Najčešće nuspojave su mučnina, proljev, glavobolja, vrtoglavica, osjećaj opće slabosti i vulvovaginitis s učestalošću od 1 do 10 %, a može se upotrebljavati i u trudnoći.



Slika 1. Molekularna struktura fosfomicina (A), dinatrij fosfomicina (B), kalcij fosfomicina (C), fosfomicintrometamola (D). Slika preuzeta od Marino A. i suradnika (13), uz preinake.

Fosfomicin je baktericidni antibiotik koji u konačnici dovodi do pucanja staničnog zida i smrti bakterijske stanice. Djeluje tako što ulazi u stanicu i inhibira enzimski kataliziranu reakciju prvog, najranijeg koraka sinteze staničnog zida, za razliku od β -laktamskih antibiotika i glikopeptida, koji inhibiraju međusobno povezivanje lanaca peptidoglikana. Interferira s

tvorbom peptidoglikanskog prekursora UDP N-acetilmuraminske kiseline ireverzibilnom inhibicijom enzima UDP-N-acetilglukozamin-enolpiruvil-transferaze (MurA) koji katalizira prijenos enolpiruvilske skupine fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilnu skupinu UDP-N-acetilglukozamina. Navedena reakcija događa se u citoplazmi bakterijske stanice, slika 2. Primarni put ulaska fosfomicina u stanicu odvija se aktivnim transportom pomoću L- α -glicerolfosfatnog transportnog sustava. Sekundarni put ulaska odvija se putem heksoza fosfatnog transportnog sustava, inducibilnog glukoza-6-fosfatom (G-6-P). Zbog navedenog je u *in vitro* testiranju osjetljivosti na fosfomicin potreban dodatak glukoza-6-fosfata, a mutacije gena koji kodiraju navedene transportere jedan su od najčešćih mehanizama rezistencije na fosfomicin (14–16).



Slika 2. Mehanizam djelovanja fosfomicina. Fosfomicin u stanicu ulazi transportnim sustavima GltT i UhpT, gdje se kovalentno veže za enzim MurA. Time je spriječena sinteza UDPMurNac i sinteza peptidoglikana, što uzrokuje smrt stanice. Kratice: fosfomicin (F), L- α -glicerolfosfat transportni sustav (GltT), heksoza-6-fosfat transportni sustav (UhpT), fosfoenolpiruvat (PEP), UDP-N-acetilglukozamin (UNAG), UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza (MurA), fosfat (P), UDP N-acetilmuraminska kiselina (UDPMurNac). Slika preuzeta od Marino A. i suradnika (13), uz preinake.

Spektar aktivnosti uključuje gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Odličnu djelotvornost pokazuje prema vrstama roda *Enterococcus*, uključujući vankomicin rezistentni enterokok, te prema vrstama *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*, uključujući MRSA sojeve (MRSA - meticilin rezistentni *S. aureus*). Od gram-negativnih bakterija fosfomicin djeluje na vrste roda *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter*, *Serratia* i *Proteus* (14,17). Aktivan je i prema vrsti *P. aeruginosa*, uz varijabilnu osjetljivost na fosfomicin, s vrijednostima MIK-a (minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika) između 4 i > 256 µg/mL (18,19). Granična vrijednost osjetljivosti *P. aeruginosa* na fosfomicin nije utvrđena. Prema prethodnim istraživanjima, izolati koji su imali $\text{MIK} \leq 64 \mu\text{g/mL}$ tumačeni su osjetljivima, ekstrapolirajući podatak granične vrijednosti za enterobakterije iz smjernica CLSI instituta (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute*) (20). *Acinetobacter* spp, *P. mirabilis*, *Vibrio fisheri*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* i vrste roda *Bacteroides* su rezistentne na fosfomicin (16,21). Kako ne postoji križna rezistencija, ima sve veće značenje zbog svog učinka na višestruko otporne gram-negativne bakterije uključujući sojeve koji proizvode β-laktamaze proširenog spektra, AmpC β-laktamaze, karbapenemaze te na bakterije rezistentne na kinolone i kotrimoksazol.

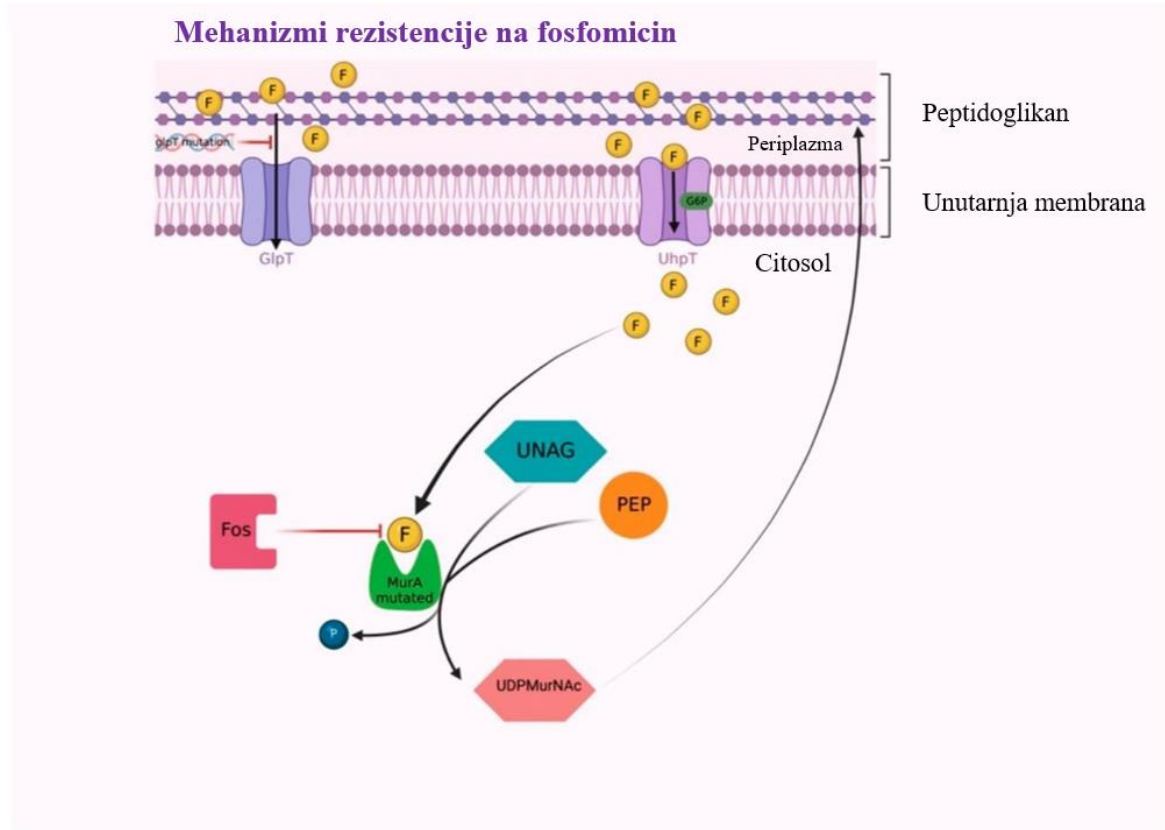
Fosfomicin utječe i na adhezivna svojstva raznih uropatogena. U *in vitro* uvjetima smanjuje adherenciju *E. coli*, *P. mirabilis* i *P. aeruginosa* za uroepitel (22). Prema nekim studijama fosfomicin, sam ili u kombinaciji s drugim antibioticima može smanjiti ili eradicirati klinički značajne bakterije iz biofilma ali i djelovati na samu strukturu biofilma (9,12,23–30).

Međutim, monoterapija fosfomicinom u liječenju infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* bi mogla biti neučinkovita i problematična zbog selekcije otpornih sojeva (2,3). Bolja učinkovitost antibiotika može se postići kombiniranim davanjem antibiotika, pa odnedavno postoje i kliničke studije *in vitro* koje istražuju antibakterijski učinak fosfomicina u kombinaciji s drugim antibioticima. Kombinirana antimikrobna terapija s fosfomicinom može biti korisna čak i kada se u kombinaciji koriste antibiotici na koje je bakterija otporna (3,9,10). Također, kombinirana terapija može spriječiti razvoj rezistencije i smanjiti rizik recidiva (20). U terapiji *P. aeruginosa* osobito se dobrim pokazao fosfomicin u kombinaciji s cefepimom, aztreonamom i meropenemom (16,21).

Rezistencija gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija na fosfomicin globalno je u porastu, sa zabilježenim stopama rezistencije od 3,2 % kod *E. coli* u Europi, Aziji i Sjedinjenim

državama i čak 16 % kod *E. faecium* u Sjevernoj Americi (31–33). Jedan primjer brzog stjecanja rezistencije na fosfomicin tijekom terapije donosi Karageorgopoulos s prikazom tri pacijenata s teškom sepsom uzrokovanom KPC (engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) *K. pneumoniae*, inicijalno *in vitro* osjetljivom na fosfomicin. Kroz par dana terapije kombinirane s drugim antibioticima ipak dolazi do razvoja rezistencije, a prema rezultatima elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE) radilo se o genetički identičnim sojevima koji su mutirali, a ne o novostečenim sojevima (34). Tri glavna opisana mehanizma rezistencije na fosfomicin uključuju smanjenu propusnost membrane za navedeni lijek mutacijom ili smanjenom ekspresijom transportera fosfomicina, modifikacije ciljne molekule MurA, koje su zapravo prilično rijetke, i modifikaciju samog antibiotika proizvodnjom enzima koji inaktiviraju fosfomicin, slika 3. Gubitak transportnog sustava kao i promjena ciljne molekule MurA posljedice su mutacija. Smanjena propusnost membrane je najčešći mehanizam rezistencije među kliničkim izolatima ali i *in vitro* dobivenim mutantima. Radi se o inaktivaciji glicerol-3-fosfatnog (GlpT) ili heksoza fosfatnog (UhpT) transportera. Nekoliko enzima koji modificiraju fosfomicin je dokumentirano i prikazano na slici 3. Glavni opisani enzimi su tri tipa metaloenzima FosA, FosB i FosX te dvije kinaze FomA i FomB (17). Gen *fosA* kodira glutation S-transferazu koja dodaje glutation na fosfomicin, čime ga inaktivira. Među bakterijama se prenosi plazmidima, ali se ne nalazi u gram-pozitivnih bakterija. Kinaze dovode do fosforilacije, a time i inaktivacije fosfomicina (16). Unazad zadnjih par godina povećala se detekcija mobilnih gena odgovornih za rezistenciju na fosfomicin. Štoviše, plazmidi koji prenose *fos*-gene često prenose i druge gene rezistencije, što omogućuje koselekciju rezistencije na fosfomicin pod pritiskom primjene drugih antibiotika. Fosfomicin je i dalje djelotvoran u primjeni protiv ESBL enterobakterija, iako se i među njima, kao i među enterobakterijama koje proizvode karbapenemaze, sve češće javlja rezistencija na fosfomicin. Najčešće detektirani gen rezistencije na fosfomicin u Europi je *fosA3*. Mobilni geni rezistencije izolirani su iz tkiva humanog i animalnog porijekla, hrane i okoliša te upozoravaju na mogućnost širenja takvih rezistentnih bakterija (17,35). Geni *fosA* su visoko prevalentni u genomu niza gram-negativnih bakterija, između ostalog i *P. aeruginosa*. Regulacija ekspresije kromosomskog *fosA* gena u *P. aeruginosa* nije dovoljno istražena i nije poznato može li pojačana ekspresija kao posljedica indukcije ili mutacije rezultirati rezistentnim fenotipom. De Groote i suradnici primijetili su da rezistencija *P. aeruginosa* može biti postignuta pojačanom ekspresijom navedenog gena insercijom promotora. U *P. aeruginosa* glavni, i čini se jedini, uzrok mutacijske rezistencije koji kontrolira permeabilnost membrane za fosfomicin je mutacija u GlpT sustavu (17,36,37). Rojas i suradnici u svojoj studiji prikazali su da mutanti *P.*

aeruginosa koje su rezistentni na fosfomicin nisu gubili na virulenciji u odnosu na parentalne osjetljive sojeve u modelu preživljavanja infekcije pluća miša, imali su ekvivalentnu sposobnost stvaranja biofilma i uzrokovali sličnu upalu prema histološkim nalazima (38).



Slika 3. Mehanizmi rezistencije na fosfomicin. Mutacije transportnog sustava uzrokuju smanjenu propusnost za fosfomicin. Mutacije gena za MurA uzrokuju konformacijske promjene proteina, onemogućavajući vezanje fosfomicina. Fos enzimi inaktiviraju fosfomicin. Kratice: fosfomicin (F), L- α -glicerofosfat transportni sustav (GlpT), heksoza-6-fosfat transportni sustav (UhpT), fosfoenolpiruvat (PEP), UDP-N-acetilglukozamin (UNAG), UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza (MurA), fosfat (P), UDP N-acetilmuraminska kiselina (UDPMurNAc). Slika preuzeta od Marino A. i suradnika (13), uz preinake.

1.2 β -laktamaze

β -laktamski antibiotici jedni su od najčešće korištenih antimikrobnih lijekova za liječenje bakterijskih infekcija. β -laktamaze su enzimi čiji supstrat su β -laktamski antibiotici, koje inaktiviraju hidrolizom β -laktamskog prstena. Proizvode ih prvenstveno gram-negativne bakterije, uključujući enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* i *P. aeruginosa*.

1.2.1 Klasifikacija β -laktamaza

Danas je poznato preko 1000 β -laktamaza, od kojih najviše zabrinjava porast u broju karbapenemaza. Dije se na temelju funkcionalnih i molekularnih osobina. Funkcionalne podjele temelje se na sličnostima u molekularnoj težini, osjetljivosti na inhibitore, hidrolitičkom spektru i izoelektričnoj točki. Molekularna podjela temelji se na redoslijedu nukleotida i aminokiselina. Dvije najčešće korištene klasifikacije danas su Bush-Jacoby klasifikacija i klasifikacija po Ambleru, tablica 1. Prema Ambleru β -laktamaze se klasificiraju u 4 razreda (A-D), ovisno o sličnostima u slijedu aminokiselina. Klase A, C i D su serinske β -laktamaze, dok su β -laktamaze klase B metalo- β -laktamaze, kojima su za aktivnost potrebna jedan ili dva atoma cinka. Bush-Jacoby klasifikacija dijeli β -laktamaze ovisno o funkcionalnim sličnostima, supstratu i profilu inhibitora. U toj klasifikaciji postoje četiri grupe i niz podgrupa (39).

1.2.2 β -laktamaze proširenog spektra

β -laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamase*, ESBL) su skupina β -laktamaza, enzima koji hidroliziraju peniciline, cefalosporine prve, druge, treće i četvrte generacije i monobaktame, tablica 1. Ne djeluju na karbapeneme i cefamicine, a osjetljive su na inhibiciju klavulanskom kiselinom, tazobaktamom i sulbaktamom (40,41). Infekcije uzrokovane ESBL pozitivnim bakterijama sve su češće, proširene su po svijetu i povezane su s višim mortalitetom i lošijim terapijskim ishodom. Najčešće se radi o bolničkim izolatima *K. pneumoniae* i *E. coli*, međutim javljaju se i kod drugih enterobakterija i nefementativnih bakterija, te u izvanbolničkoj populaciji. Većina ESBL spada u porodice TEM, SHV i CTX-M.

Tablica 1. Klasifikacija β -laktamaza

Bush-Jacoby klasifikacija	Glavna podgrupa	Klasifikacija po Ambleru	Značajke
Grupa 1 cefalosporinaze		C (cefalosporinaze)	Najčešće kromosomalne; rezistencija na sve β -laktame, osim karbapenema; ne inhibira ih klavulanat
Grupa 2 penicilinaze (osjetljive na klavulansku kiselinu)	2a	A (serinske β -laktamaze)	Stafilokokne penicilinaze
	2b	A	Široki spektar; TEM-1, TEM-2 i SHV-1
	2be	A	Prošireni spektar; TEM i SHV varijante
	2br	A	IRT β -laktamaze
	2c	A	Karbencilin hidrolizirajuće
	2e	A	Cefalosporinaze inhibirane klavulanatom
	2f	A	Karbapenemaze inhibirane klavulanatom
Grupa 3 metalo- β -laktamaze	2d	D (oksacilin hidrolizirajuće)	Oksacilin hidrolizirajuće (OXA)
	3a	B (metaloenzimi)	Karbapenemaze ovisne o cinku
	3b	B	
	3c	B	
Grupa 4		Nisu klasificirane	Razni enzimi, većinom ne sekvencirani

Tablica preuzeta od Viana Marques (42), uz preinake

1.2.3 *AmpC* β -laktamaze

AmpC β -laktamaze su klinički značajne cefalosporinaze. Radi se o kromosomskim, često inducibilnim enzimima koje proizvode gotovo sve gram-negativne bakterije. *AmpC* β -laktamaze hidroliziraju cefalosporine prve, druge i treće generacije, cefamicine i monobaktame, ali ne djeluju na četvrtu generaciju cefalosporina i karbapeneme. Nisu osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom, sulbaktamom ili tazobaktamom (39). Neke bakterije, kao što su *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. mirabilis*, kojima nedostaje ili koje slabo ekspimiraju kromosomski gen *bla_{ampC}*, mogu steći rezistenciju prijenosom plazmida koji kodira *AmpC* enzime od vrsta koje imaju kromosomski gen *ampC* (43).

1.2.4 Karbapenemaze

Karbapenemaze su β -laktamaze sa širokom hidrolitičkom aktivnošću. Hidroliziraju gotovo sve β -laktamske antibiotike uključujući peniciline, cefalosporine, monobaktame i

karbapeneme (44). Geni koji kodiraju β -laktamaze proširenog spektra, AmpC β -laktamaze i karbapenemaze se nalaze na plazmidima koji mogu sadržavati i gene rezistencije na druge antibiotike: aminoglikozide, fluorokinolone, tetracikline, sulfonamide, trimetoprim i kloramfenikol što rezultira multirezistentnim fenotipom. Plazmidi se mogu prenositi među bakterijama iste ili različite vrste konjugacijom što omogućava širenje rezistencije horizontalnim prijenosom među bakterijama, koje tako postaju višestruko otporne.

1.2.5 Metallo- β -laktamaze

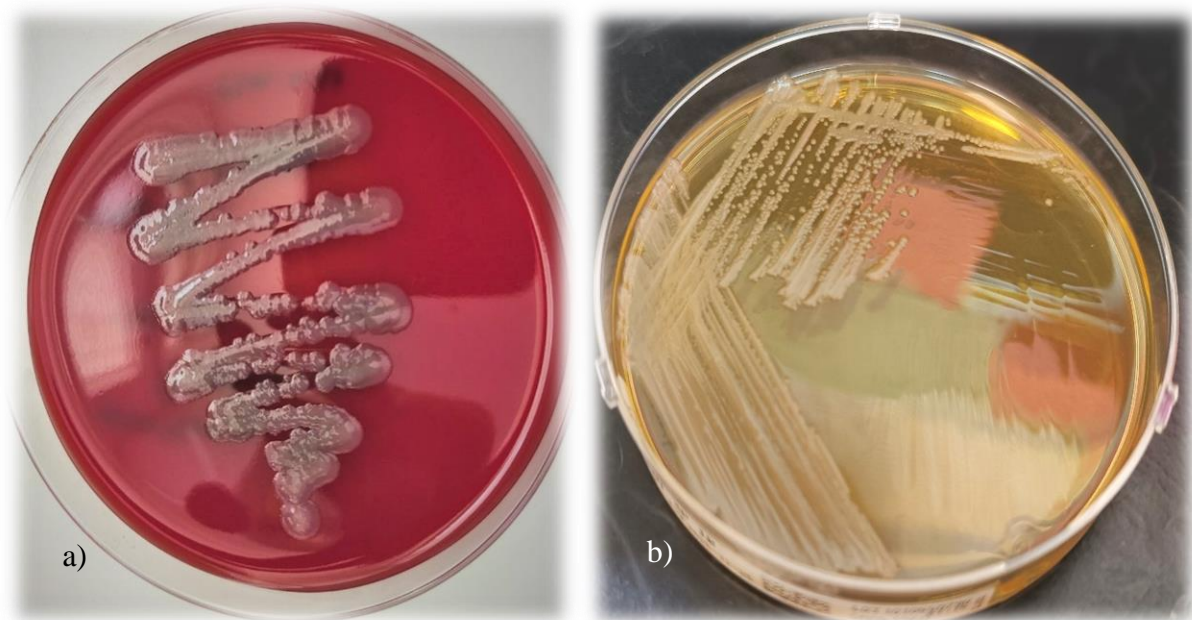
Metallo- β -laktamaze (MBL) su bakterijski enzimi koji sadrže cink u aktivnom središtu, pa ih inhibiraju kelirajući spojevi, poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), merkaptopropionske i merkaptosumporne kiseline, koji nemaju terapijsku primjenu, ali pomažu u rutinskom laboratorijskom radu u fenotipskoj detekciji. Ne inhibiraju ih klavulanska kiselina, sulbaktam, tazobaktam ni avibaktam. Uzrokuju rezistenciju na gotovo sve β -laktamske antibiotike, uključujući cefamicine i karbapeneme, ali ne djeluju na monobaktame. Klinička ispitivanja su pokazala da aztreonam nema terapijskog uspjeha iako ne podliježe hidrolizi. Geni koji kodiraju metallo- β -laktamaze nerijetko su smješteni na pokretnim genetičkim elementima (transpozoni, integroni). VIM-2 karbapenemaza je jedna je od najšire rasprostranjenijih metallo- β -laktamaza. Gen *bla*_{VIM} je često smješten u okviru integrona bakterije *P. aeruginosa* (39,45). Integron može biti inkorporiran u kromosom ili plazmid.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1 Opće karakteristike

Rod *Pseudomonas* pripada rRNA homolognoj grupi I gama podrazreda *Proteobakterija*. *P. aeruginosa* klinički je relevantna vrsta koja spada u grupu *Pseudomonasa* koji proizvode fluorescentni pigment. Izrazito je prilagodljiva ubikvitarna bakterija koja može preživjeti na raznim temperaturama i u raznim habitatima, s obzirom na minimalne nutritivne zahtjeve. Iako je rijetko dio fiziološke flore, u bolničkim uvjetima vrlo brzo kolonizira kožu pacijenata. Preferira vlažan okoliš, gdje najčešće raste unutar biofilma na raznim površinama kao što su kade, slavine, umivaonici a može se izolirati i iz sredstva za čišćenje, dezinficijensa i hrane (46). Može ga se pronaći u kremama, sapunima, tekućinama za ispiranje, kapima za oči, nebulizatorima, hidroterapijskim bazenima, kupkama, ovlaživačima zraka, otopinama i opremi za dijalizu (47). Vrste roda *Pseudomonas* su aerobne, gram-negativne, nesporulirajuće, štapićaste bakterije veličine 0,5 do 1,0 x 1,5 do 5,0 µm. Bakterije su pokretne zahvaljujući jednoj ili nekoliko polarnih flagela. *P. aeruginosa* je uzgojno nezahtjevan i lako preživljava transport i pohranu kliničkih uzoraka. Prepoznatljiv je na uobičajenim hranjivim podlogama s obzirom na morfologiju kolonije, fluorescentni pigment te specifičan miris, slika 4. Može stvarati četiri tipa fluorescentnog pigmenta: plavo-zeleni piocijanin, žuto-zeleni pioverdin, crveni piorubin i smeđe-crni piomelanin, slika 5. (47). Kolonije su obično plosnate, a mogu imati nazubljene rubove i metalizirani sjaj koji se obično povezuje s autolizom kolonija. Neki sojevi mogu posjedovati i polisaharidnu kapsulu. Mukoidne varijante nerijetko se izoliraju iz uzoraka respiratornog sustava pacijenata s cističnom fibrozom, gdje upućuju na kroničnu infekciju, za razliku od intermitentne kolonizacije. Najčešće takve bakterije gube pokretljivost i ekscesivno proizvode viskozni egzopolisaharid – alginat, koji ih štiti od kisikovih radikala, fagocitoze i fizioloških mehanizama čišćenja. Konverzija normalnog u mukoidni tip, ili infekcija mukoidnim tipom *P. aeruginosa*, uzrokuje pogoršanje kliničkog tijeka bolesti (48,49).

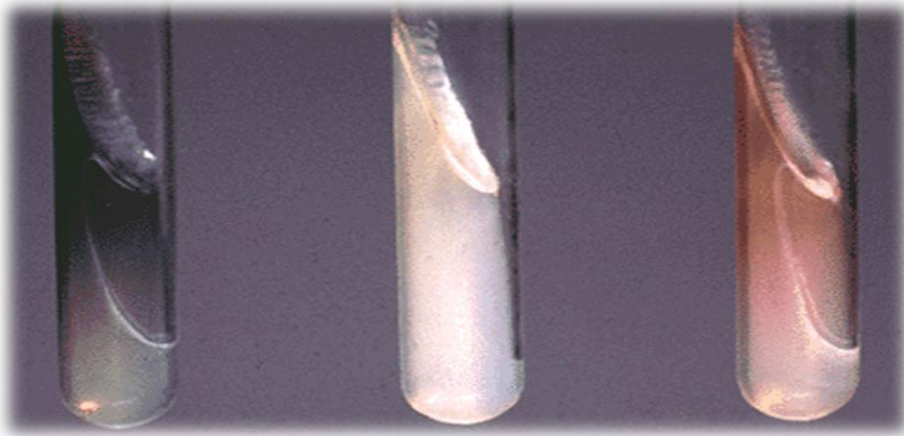
Iako se može dokazati komercijalnim i automatiziranim sistemima za identifikaciju, u laboratorijima se obično potvrđuje pozitivnim testom oksidaze i argininskim testom uz izostanak promjene boje trostrukog šećernog agara. Uz to, *P. aeruginosa* je laktoza negativna bakterija, čime ga se može razlikovati od laktoza-pozitivnih enterobakterija (39).



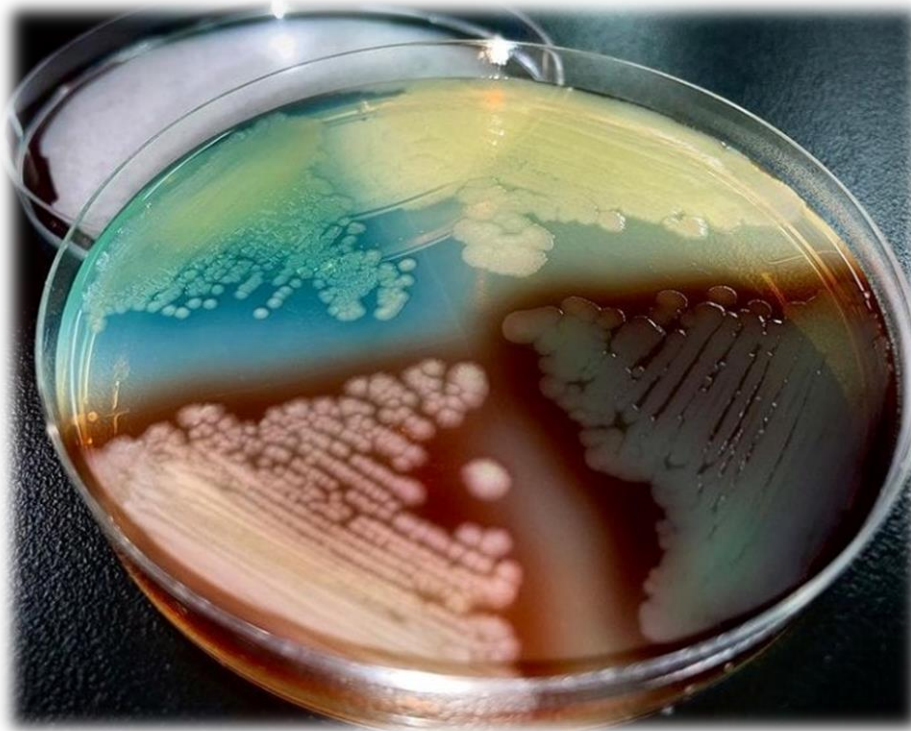
Slika 4. *P. aeruginosa* na krvnom agaru (a) i Trypton soja agaru (TSA) (b).

Postoji mogućnost serotipizacije, obzirom na raznolikost O-postraničnog lanca lipopolisaharida vanjske membrane, aglutinacijom na predmetnom stakalcu komercijalno dostupnim dijagnostičkim serumima. Ovim postupkom može se razlikovati 20 serotipova sukladno međunarodnom antigenskom sustavu (engl. *International antigenetic typing system*, IATS). Najtočnija tipizacija molekularnom metodom, današnji zlatni standard, predstavlja razgradnja genoma restrikcijским enzimima i gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulse field gel electrophoresis*, PFGE) (47).

a)



b)



Slika 5. Pigmenti *P. aeruginosa*. a) pigmenti redom s lijeva na desno piomelanin, pioverdin, piorubin, zbirka KBC Zagreb, b) pigmenti piocijanin gore lijevo, pioverdin gore desno, piomelanin dolje desno, piorubin dolje lijevo, preuzeto sa: <https://www.facebook.com/elmicrobiologistee/photos/a.102492117890876/499953284811422/?type=3>

1.3.2 Klinički značaj

Pseudomonas aeruginosa učestali je bolnički oportunistički patogen i uzrokuje niz infekcija, od lokalnih do sistemskih i životno ugrožavajućih. Može uzrokovati niz infekcija i

zahvatiti gotovo sva tkiva i organe. Najčešće se radi o egzogenim infekcijama. Endogene infekcije posljedica su prethodne kolonizacije. *P. aeruginosa* je jedan od 6 patogena ESKAPE grupe, grupe patogena (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) koji su glavni uzročnici nozokomijalnih infekcija i globalna prijetnja zbog sposobnosti stjecanja otpornosti na antimikrobne lijekove (46).

Najčešće kolonizira gastrointestinalni sustav, a može kolonizirati ždrijelo, nazalne sluznice, aksile i perinej. Kolonizacija je češća u hospitaliziranih pacijenata, osobito onih dugotrajno hospitaliziranih i na širokospektralnoj antimikrobnoj terapiji ili kemoterapiji. Na suhoj i intaktnoj koži ugiba u kratkom razdoblju (47).

Teške infekcije obično se javljaju tijekom postojećih bolesti ili stanja, najčešće cistične fibroze ili opekline, generalno u imunokompromitiranih pacijenata. *P. aeruginosa* kod pacijenata koji boluju od cistične fibroze dominantno zahvaća respiratorni sustav zbog otežanog odstranjenja aspiriranih mikroorganizama. Inicijalni fokus najčešće su paranazalni sinusi, a sama infekcija perzistira unutar formiranog biofilma. Iz sputuma pacijenata s cističnom fibrozom nerijetko se izoliraju kolonije sa specifičnim fenotipovima: mukoidne, višestruko otporne i takozvane „male kolonije“ (engl. *small-colony variants*) povezane s visokim stupnjem rezistencije na antibiotike i kroničnim infekcijama. Može uzrokovati infekcije u pacijenata s neutropenijom, nerijetko na kemoterapiji ili u toku ablacije koštane srži. Rana predstavlja izvrstan hranjivi medij, pa *P. aeruginosa* često kolonizira i inficira opekline, kronične rane i dijabetička stopala. Stvara biofilm, pa se otežano liječi, uzrokujući kronične rane. U infekcija dijabetičkog stopala moguća je i progresija u osteomijelitis. Kod pacijenata koji su na mehaničkoj ventilaciji uz traheostomu ili endotrahealni tubus, olakšano je širenje mikroorganizama iz gornjih dišnih puteva, stoga kod takvih pacijenata postoji visoki rizik razvoja pneumonije povezane s mehaničkom ventilacijom, VAP (engl. *ventilator-associated pneumonia*), koja se, također, svrstava u biofilm infekcije. Može uzrokovati meningitis, maligni otitis eksterna, novorođenačku sepsu i meningitis, endokarditis i osteomijelitis pri zloupotrebi droga, kroničnu pneumoniju u pacijenata s priležecom plućnom bolesti poput bronhiektazija, bakterijemiju i sepsu te infekcije urinarnog trakta. Kod imunokompetentnih osoba najčešće uzrokuje infekcije uha kod plivača, folikulitis ili infektivni keratitis (39). Visoka smrtnost od 10 – 60 % posljedica je imunosupresije domaćina i virulencije bakterije, izvanstaničnih enzima, toksina i otpornosti na antibiotike (46).

S obzirom na njegovu intrinzičku i stečenu otpornost na širok spektar antibiotika predstavlja ozbiljnu prijetnju bolničkom sustavu (8,39). Prema IDSA društvu (engl. *Infectious Diseases Society of America*) višestruko rezistentni *P. aeruginosa* smatra se jednom od najznačajnijih patogenih bakterija koja prijeti svjetskom javnom zdravstvu (7,8). U mnogim regijama svijeta danas postoje sojevi *P. aeruginosa* koji su otporni na gotovo sve antibiotike, uključujući kolistin, karbapeneme ili oboje, rezervne antibiotike koji predstavljaju zadnju terapijsku liniju, i kao takvi predstavljaju izniman terapijski problem (50). Pojava rezistentnih izolata zahtijeva nova, alternativna rješenja, osobito u sredinama intenzivne njege ili kronične perzistencije u vulnerabilnih skupina. Treba napomenuti da postoje i takozvani „perzisteri“, osjetljive bakterijske subpopulacije koje mogu preživjeti visoke koncentracije antibiotika, pa praktički onemogućavaju eradikaciju kroničnih infekcija. Radi se o specijaliziranim dormantnim stanicama koje predstavljaju frakciju planktonskih kultura ili populacija biofilma. Radi se o nenasljednom mehanizmu koji nije još sasvim jasan (36). Kronične infekcije uzrokovane *P. aeruginosa* vjerojatno su jedna od najčešćih kliničkih stanja u kojima liječenje antibioticima ne uspijeva. Prisutnost „hipermutabilnih“ sojeva doprinosi ovom fenomenu i čini se važnim čimbenikom razvoja višestruke rezistencije na antimikrobne lijekove.

Kako se radi o iznimno prilagodljivoj i sveprisutnoj bakteriji, praktički ju je nemoguće eliminirati iz bolničkog okruženja. Stoga je važno primjenjivati mjere kojima se sprječava širenje otpornih sojeva. U tom smislu, od iznimnog je značaja kontaktna izolacija, higijena ruku, prikladno čišćenje i dezinfekcija pribora, opreme, okoline pacijenta s jedne strane, a s druge strane, i racionalna upotreba antibiotika (47).

1.3.3 Otpornost na antibiotike

Otpornost na antibiotike može biti prirodna, urođena i svojstvena divljim *tipovima P. aeruginosa*, stečena mutacijama ili stjecanjem pokretnih genetičkih elemenata, a može biti i adaptivna. Adaptivna rezistencija nastaje kada se bakterija izlaže postupnom povećanju doze antibiotika, a karakterizira ju brza pojava rezistencije kao i brza reverzibilnost u nerezistentni fenotip, kada se antibiotik ukloni iz medija. Čini se kako zahtijeva epigenetičko naslijeđe i heterogenost genske ekspresije, osobito povezane s proizvodnjom porina i efluks pumpi (51). Rezistencija u *P. aeruginosa* najčešće je posljedica modifikacije porina, efluks pumpi i modifikacija ciljne molekule antibiotika (prisustva β -laktamaza, karbapenemaza, enzima koji modificiraju aminoglikozide). Može biti i posljedica mutacije kromosomskih gena ili horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju. Posebno zabrinjavajući su transpozoni i integroni

koji nose kodirajuće sljedove za karbapenemaze ili β -laktamaze proširenog spektra. Takvi elementi nerijetko prenose i gene za enzime koji modificiraju aminoglikozide kao što su acetilaze, adenilaze i fosforilaze (50).

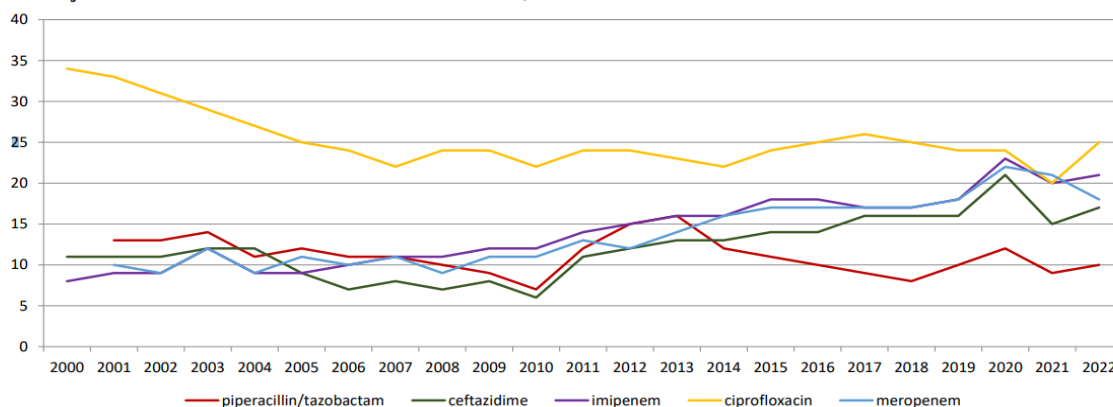
U liječenju infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa*, upotrebljavaju se tzv. „antipseudomonasni“ penicilini (tikarcilin, piperacilin, karbencilin), cefalosporini III. i IV. generacije (ceftazidim i cefepim), karbapenemi (meropenem, imipenem), monobaktami (aztreonam), fluorokinoloni (ciprofloksacin), aminoglikozidi (gentamicin, amikacini i tobramicin), a u višestruko otpornih potrebno je u terapiju uključiti antibiotik iz skupine polimiksina (kolistin), koji je problematičan zbog svojih toksičnih učinaka i nuspojava (47).

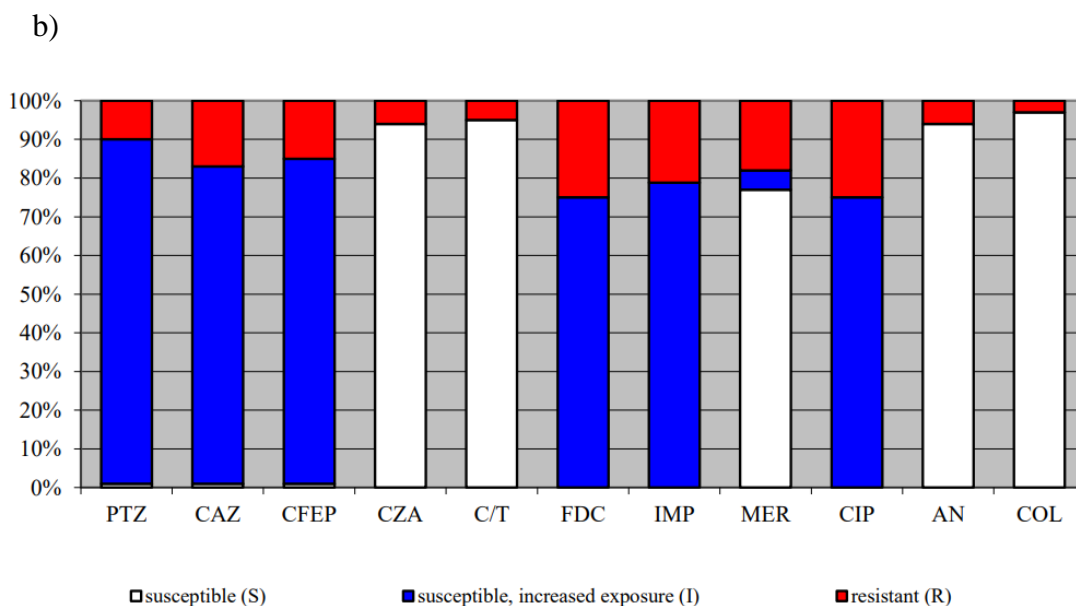
U Republici Hrvatskoj u 2022. godini je bilo 10 % sojeva rezistentnih na piperacilin/tazobaktam, 17 % na ceftazidim, 15 % na cefepim, 18 % na meropenem, 21 % na imipenem, 25 % na ciprofloksacin, 6 % na aminakcin i 3 % na kolistin. Unazad zadnjih 10 godina bilježi se trend porasta rezistencije na karbapeneme i na ceftazidim, pri čemu je u 2020. zabilježeno preko 20 % izolata otpornih na ceftazidim, meropenem, imipenem i ciprofloksacin, slika 6. (52). U 2021. zabilježeno je smanjenje rezistencije na sve antibiotike osim na kolistin.

a)

Pseudomonas aeruginosa

rezistencija na antibiotike u RH / resistance to antibiotics in Croatia, 2000. - 2022.





Slika 6. a) Grafički prikaz rezistencije *P. aeruginosa* na antibiotike u Republici Hrvatskoj u periodu od 2000.-2022. b) Rezistencija *P. aeruginosa* na antibiotike u razdoblju od 1.10.-31.12.2022., zbirni prikaz izolata iz 38 centara u Republici Hrvatskoj (52).

Dilucijske i difuzijske rutinske metode za određivanje rezistencije na antibiotike odnose se isključivo na planktonske bakterije i nisu primjenjive na bakterije u biofilmu, obzirom da su one otpornije na sistemski primjenjive koncentracije antibiotika (39).

1.3.3.1 Urođena otpornost

P. aeruginosa posjeduje prirodnu, intrinzičnu otpornost na mnoge antibiotike, što terapiju čini zahtjevnom. Posjeduje inducibilnu kromosomsku AmpC β -laktamazu koja omogućuje rezistenciju na ampicilin, amoksicilin, amoksicilin/klavulanat, prvu i drugu generaciju cefalosporina, cefotaksim i ceftriakson i brojne efluks pumpe (40). Efluks pumpe zaslužne su za izbacivanje niza tvari iz bakterijske stanice kao što su boje, detergentski, organska otapala i antibiotici. Genom kodira nekoliko efluks pumpi kao što su MexAB-oprM, MexXY-oprM, MexCD-oprJ, MexEF-oprN i MexJK-oprM. Radi se o transmembranskim sustavima s tri proteina, gdje je citoplazmatski smještena energetska ovisna crpka (Mex) povezana linker proteinom s porinom vanjske membrane (Opr) (53).

Također posjeduje i kromosomsku β -laktamazu OXA-50, koja, međutim, ne pridonosi značajnije otpornosti (54). Prirodnoj otpornosti pridonosi i nepropusnost membrane bakterije. Propusnost vanjske membrane u *P. aeruginosa* je 100 puta manja nego u *E. coli*. Divlji sojevi *P. aeruginosa* obično su osjetljivi na peniciline širokog spektra (piperacilin, tikarcilin), treću i

četvrtu generaciju cefalosporina (ceftazidim i cefepim), karbapeneme (imipenem, meropenem, doripenem), monobaktame (aztreonam), fluorokinolone (ciprofloksacin, levofloksacin), aminoglikozide (gentamicin, tobramicin, amikacin) i kolistin (39). Osjetljivi su i na ceftolozan/tazobaktam i imipenem/cilastatin/relebaktam.

1.3.3.2 Otpornost kao posljedica promjena na staničnoj membrani

Ulazak u bakterijsku stanicu nužan je za djelovanje β -laktama, fluorokinolona, aminoglikozida i polipeptida. Prolazak malih hidrofилnih molekula, u koje spadaju β -laktami i fluorirani kinoloni, kroz staničnu membranu omogućavaju porinski proteini. Aminoglikozidi i polimiksini se preko lipopolisaharida (LPS) vanjske membrane ubacuju do citoplazmatske membrane, gdje dalje aminoglikozidi aktivnim transportom ulaze u staničnu citoplazmu, dok polimiksini mijenjaju strukturu citoplazmatske membrane vezanjem za lipopolisaharid vanjske membrane i premještanjem iona Ca^{2+} i Mg^{2+} iz fosfatnih skupina LPS-a na kompetitivni način rezultirajući destabilizacijom citoplazmatske membrane, poremećajem vanjskog LPS-a i gubitka unutarnjeg staničnog sadržaja, a time i ubijanja bakterija. Ipak, točan mehanizam djelovanja nije sasvim jasan (55). Mutacije koje rezultiraju gubitkom porina i nepropusnošću membrane dovode do rezistencije na navedene antibiotike, pa tako gubitak OprD porina rezultira povećanjem MIK-a za imipenema na 8-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ali ne i meropenema koji ne koristi ovaj kanal (53).

Hiperekspresija efluks pumpi može rezultirati rezistencijom na niz antibiotika. Mutacija *mexR* represorskog gena rezultira pojačanom proizvodnjom konstitutivno prisutne efluks pumpe MexAB-OprM u *P. aeruginosa* čime dolazi do otpornosti prema kinolonima, penicilinima, cefalosporinima, aztreonamu, meropenemu, ali ne i imipenemu (39,53).

1.3.3.3 Stečena rezistencija na β -laktamske antibiotike

Najznačajniji mehanizam rezistencije *P. aeruginosa* na peniciline i cefalosporine s antipseudomonasnim djelovanjem (tikarcilin, piperacilin, ceftazidim) je selekcija mutanata s hiperekspresijom kromosomske AmpC β -laktamaze. Hiperekspresija AmpC u *P. aeruginosa* najčešće je posljedica mutacije *ampD* s inaktivacijom ili specifičnih točkastih mutacija na *ampR* pri čemu se uklanja blokada transkripcije AmpC parcijalno, što je češće, ili trajno („derepresija“ od engl. *derepression*). Represor ekspresije gena *ampC* je protein AmpD. Gen *ampR* kodira transkripcijski regulator potreban za indukciju β -laktamaze. *P. aeruginosa* proizvodi niske bazalne razine AmpC β -laktamaze, međutim izlaganjem β -laktamskim antibioticima (cefoksitin, imipenem) dolazi do indukcije njene ekspresije i selekcije takvih

rezistentnih mutanata tijekom terapije, što može rezultirati terapijskim neuspjehom (56,57). Prisutnost inducibilne ili dereprimirane kromosomske AmpC β -laktamaze i njezina pojačana ekspresija nerijetko maskiraju sinergistički učinak klavulanske kiseline s indikatorskim cefalosporinima, čime je otežana detekcija ESBL fenotipa klasičnim metodama, što može biti uzrokom lažno negativnih rezultata i smanjene detekcije takvih sojeva (58,59).

Sekundarne β -laktamaze nisu toliko česte kod *P. aeruginosa* kao što su u enterobakterija (46,53). Dijelom se radi o β -laktamazama proširenog spektra (ESBL) koje pripadaju porodicama SHV, GES, VEB, BEL, PME i PER te češće karbapenemazama klase A (KPC, GES), B i D (58,60,61). U molekularnoj klasi B (VIM, IMP, NDM, DIM, AIM, FIM) nalaze se karbapenemaze, takozvane metalo- β -laktamaze, koje u aktivnom središtu sadrže ione cinka, a uzrokuju rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme, osim aztreonama. U molekularnoj klasi D nalaze se klasične oksacilinaze (OXA-1, -2 i -10) koje su odgovorne za rezistenciju na karboksipeniciline i ureidopeniciline.

1.3.3.4 Stečena rezistencija na aminoglikozide

P. aeruginosa otpornost na aminoglikozidne antibiotike može steći smanjenjem propusnosti membrane za navedene antibiotike, osobito u pacijenata s cističnom fibrozom i u jedinicama intenzivnog liječenja, pojačanim efluksom zbog hiperekspresije MexXY proteina i OprM ili, najčešće, kao posljedice djelovanja enzima koji inaktiviraju aminoglikozide čiji geni se mogu nalaziti na plazmidima i kromosomu. Aminoglikozid-modificirajući enzimi, koji rezultiraju rezistencijom na gentamicin, tobramicin i/ili amikacin u raznim kombinacijama, dijele se u aminoglikozid fosforiltransferaze, adeniltransferaze i acetiltransferaze. Ti enzimi se nerijetko nalaze na transpozonima i integronima koji prenose i determinante otpornosti za druge klase antibiotika, kao što su sulfonamidi, β -laktami i kloramfenikol. Kombinacije navedenih rezistencija i kombinacije s mutacijama koje uzrokuju smanjenu propusnost membrane, posebno su zabrinjavajuće, kako se tada radi o višestruko otpornim sojevima. Opisana je i rezistencija posredovana metil-transferazama 16S rRNA koja uzrokuje panaminoglikozidnu rezistenciju (39,53).

1.3.3.5 Rezistencija na kinolone

Aktivni efluks važna je komponenta rezistencije na kinolone, pri čemu može doći do selekcije mutanata s pojačanom ekspresijom gena za efluks pumpe. Mutacija gena ciljnih enzima (giraze, topoizomeraze II, topoizomeraze IV), najčešće *gyrA* i *parC*, može uzrokovati smanjenje afiniteta enzima prema flouorokinolonu i uzrokovati visok stupanj otpornosti (53).

Geni rezistencije na kinolone (*qnr*) nalaze se na plazmidu gram-negativnih bakterija. Kodiraju pentapeptide Qnr koji štite DNA-girazu i topoizomerazu od aktivnosti kinolona (62). Značajni su zbog prijenosa konjugacijom na niz mikroorganizama, između ostalog i *P. aeruginosa*, višestrukog povećanja MIK vrijednosti koju uzrokuju i prijenosa na plazmidima koji sadrže i gene rezistencije na β -laktamske antibiotike i aminoglikozide (39,53).

1.3.3.6 Rezistencija na kolistin

Rezistencija na kolistin kod gram-negativnih bakterija može biti posljedica mutacije i pojačane ekspresije MexAB-OprM i MexXY-OprM efluks pumpi, ili adaptivnih mehanizama, kao što je redukcija Mg^{2+} i Ca^{2+} iona kontrolirana regulatorima *phoP-phoQ* i *pmpA-pmrB*. Rezistencija koja je posljedica mutacija je nasljedna, niskog stupnja i neovisna o prisutnosti antibiotika, suprotno od rezistencije uzrokovane adaptivnim mehanizmima (63).

Polimiksini su polikationski lipopeptidni antibiotici koji ulaze u interakciju s negativno nabijenim lipidom A lipopolisaharida gram-negativnih bakterija što dovodi do povećane propusnosti stanične membrane i u konačnici njezine lize i smrti (64). Rezistencija na kolistin najčešće je posljedica vezanja kationskih grupa poput fosfoetanolamina (pEtN) kod enterobakterija i acinetobaktera, ili, kod *P. aeruginosa*, jedne ili dvije 4-amino-L-arabinoze (L-Ara4N) na 1' i/ili 4' fosfatnu grupu lipida A lipopolisaharida vanjske membrane, čime se maskira negativni naboj, rezultirajući smanjenim afinitetom za polimiksine. Sintezu i transport L-Ara4N molekula kodira veliki *arnBCADTEF-UgD* operon (pojednostavljeno kao *arn*), koji ovisi o složenoj regulatornoj mreži koja se sastoji od najmanje 5 dvokomponentnih sustava (PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ, ParR/ParS, CprR/CprS i ColR/ColS). U normalnim uvjetima, dvokomponentni regulatorni sistemi utišavaju *arnBCADTEF* operon što rezultira osjetljivošću na polimiksine (65). Ukoliko operon *arn* nije utišan, bakterije su otporne na polimiksine (66,67).

1.3.3.7 Rezistencija na fosfomicin

Rezistencija na fosfomicin u *P. aeruginosa* rezultat je aktivnosti FosA enzima, zaslužnog za modifikaciju fosfomicina li inaktivacije GlpT transportnog proteina za fosfomicin (36).

1.4 Kombinirana antimikrobna terapija

Kombinirana antimikrobna terapija, kada se istovremeno primjenjuju dva ili više antibiotika, od koristi je kod polimikrobnih, miješanih infekcija, ili kod kroničnih infekcija, gdje sprječava pojavu rezistentnih mutanata. Kombinirana antimikrobna terapija u liječenju sepsa uzrokovane gram-negativnim bakterijama je kontroverzna. Empirijska kombinirana terapija se preporučuje u teškoj sepsi i septičkom šoku s ciljem redukcije mortaliteta zbog neadekvatne antimikrobne terapije. Generalno se sugerira deeskalacija pri poznatom profilu rezistencije. Ipak, ne može se isključiti da bi određene subpopulacije pacijenata imale korist od kombinirane terapije. Kombinirana terapija se preporučuje kod enterobakterija koje proizvode karbapenemaze i kod teških infekcija uzrokovanih *Acinetobacter spp.* i *Pseudomonas spp.*. Prema *in vitro* podacima, može biti od koristi i kada je bakterija rezistentna na oba pojedinačna antibiotika, a posebno je važna za imunokompromitirane bolesnike s febrilnom neutropenijom kod kojih se postiže bolji terapijski uspjeh s kombiniranom terapijom. Može proširiti antimikrobni spektar, što je osobito važno kod polimikrobnih infekcija, iskazivati efekt sinergije i smanjiti razvoj rezistencije tijekom terapije. S druge strane, može biti povezana s povećanom toksičnošću i višim troškovima. Osim sinergijom, može rezultirati i aditivnim učinkom i indiferencijom, što je češće, ali rijetko i antagonizmom. Prema trenutnim podacima, monoterapija se ne preporučuje za kolistin ili parenteralni fosfomicin. Kombinirana terapija za sepsu uzrokovanu gram-negativnim bakterijama i teškim infekcijama uzrokovanim bakterijom *Pseudomonas spp.* tipično uključuje široko spektralni β -laktamski antibiotik i aminoglikozid ili fluorokinolon. Kombinirana terapija s kolistinom se također sve više koristi (68).

1.4.1 Interakcije među antibioticima

U interakcije među antibioticima, kojima rezultiraju kombinirani terapijski režimi, ubrajamo sinergiju, aditivni učinak, indiferenciju i antagonizam. Sinergija podrazumijeva značajno potentniji učinak kombinirane terapije od zbroja učinaka pojedinačne primjene antibiotika. Kod aditivnog učinka, potentnost zajedničke primjene odgovara zbroju potencije oba antibiotika zasebno. Indiferentan učinak kombinacije jednak je učincima najaktivnije komponente i ne daje bolje rezultate u odnosu na pojedinačnu primjenu antibiotika. Kod antagonizma učinkovitost zajedničke primjene je manja nego kod individualne primjene antibiotika, naime jedan od upotrijebljenih lijekova sprječava djelovanje drugog lijeka. Faktor koji determinira odnos među antibioticima naziva se frakcijski inhibitorni koncentracijski

indeks (engl. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI), a dobivamo ga izračunom iz *in vitro* eksperimenata (npr. šah metoda) na sljedeći način:

$$FICI = \frac{MIK\ FOS\ u\ kombinaciji}{MIK\ FOS\ sam} + \frac{MIK\ drugi\ antibiotik\ u\ kombinaciji}{MIK\ drugi\ antibiotik\ sam}$$

Vrijednosti indeksa $\leq 0,5$ označavaju sinergiju, vrijednosti $> 0,5 \leq 1$ aditivni učinak, > 1 do ≤ 4 indiferenciju, a vrijednosti > 4 antagonizam (69–71).

Sinergija je ona koja se nalazi u fokusu kombinirane terapije, s obzirom na to da značajno reducira efektivnu dozu antimikrobnih lijekova potrebnih za terapiju (72–74). Mehanizam sinergije nije uvijek u potpunosti jasan. Za neke kombinacije antibiotika postoje moguća objašnjenja. Primjer za to je kolistin, koji povećava propusnost vanjske membrane gram-negativnih bakterija, kojim se može savladati rezistencija koja je posljedica smanjenja propusnosti membrane, kao u slučaju gubitka porina, ili nepropusnosti membrane, na primjer za vankomicin kod gram-negativnih bakterija. Sinergija među aminoglikozidima i β -laktamskim antibioticima ili glikopeptidima pripisuje se oštećenju membrane posredovanom β -laktamskim antibioticima, olakšavajući time unos aminoglikozidnih antibiotika (68,73).

Postoje četiri glavne metode kojima se *in vitro* procjenjuje međudjelovanje antibiotika: šah metoda, „*time-kill*“ metoda, metoda dvije jažice i metoda ukriženih trakica. Šah metoda se izvodi tako da se jedan antibiotik razrjeđuje u mikrotitracijskim pločicama vodoravno, a drugi okomito i zatim se određuje MIK antibiotika A samog u kombinaciji s antibiotikom B i MIK antibiotika B samog i u kombinaciji s antibiotikom da bi se mogao odrediti FICI. Metoda dvije jažice uspoređuje djelovanje $0,25 \times$ MIK svakog antibiotika zasebno i u kombinaciji (75). „*Time-kill*“ kinetički test procjenjuje efikasnost antibiotika određujući baktericidnu i bakteriostatsku aktivnost lijeka tijekom vremena (70). Baktericidni učinak podrazumijeva aktivnost koja ubija preko 99,9 % bakterijskog inokuluma, a definira se kao smanjenje $\geq 3 \log_{10}$ broja CFU (engl. *colony forming units*) nakon 24 sata u odnosu na početni inokulum (69,76,77). Bakteriostatska aktivnost definira se kao održavanje originalne koncentracije inokuluma ili redukcija manja od 99,9 % ($< 3 \log_{10}$) od ukupnog broja kolonija u mililitru u početnog inokuluma (78,79). Sinergija u baktericidnoj aktivnosti znači da će kombinacija dva antibiotika pokazivati redukciju broja kolonija u mililitru za $\geq 2 \log_{10}$ u odnosu na svaki antibiotik sam. Indiferencijom se smatra porast ili pad od $< 2 \log_{10}$ u broju kolonija po mililitru, a antagonizmom se smatra porast broja kolonija po mililitru $\geq 2 \log_{10}$ nakon 24 h u odnosu na antibiotike kada se primjenjuju sami. „*Time-kill*“ istraživanje smatra se zlatnim standardom u

ispitivanju sinergije (69,76,80,81). Metoda ukriženih trakica jedna je od modifikacija za određivanje sinergije uz pomoć gradijent trakica. Gradijent trakice polažu se okomito jedna na drugu na mjestu MIK-ova pojedinih antibiotika. Drugi pristup podrazumijeva postavljanje trakice s antibiotikom broj jedan na agar s inokuliranim testnim mikroorganizmom. Nakon 60 minuta odstranjuje se trakica, i postavlja nova trakica s antibiotikom broj 2 na isto mjesto (70). Metoda dvije jažice i metoda ukriženih trakica određuju bakteriostatsku aktivnost antibiotika u kombinacijama, dok „*time-kill*“ metoda određuje baktericidnu aktivnost antibiotika u kombinacijama. Obzirom da se metode baziraju na različitim učincima, nepodudarnost među rezultatima nije neočekivana. Još nije utvrđeno koja metoda bolje predviđa *in vivo* učinak (70,82). Studije sinergije su vrijedan alat za procjenu učinkovitosti kombinirane primjene antibiotika nudeći alternativnu strategiju liječenja otpornih bakterijskih sojeva i predstavljajući pomoć kliničarima u izboru optimalne kombinacije.

1.4.2 Sinergija fosfomicina s drugim antibioticima

Cilj kombinirane terapije je izbjegavanje selekcije rezistentnih mutanata, što posebno vrijedi za ona mjesta u organizmu gdje se ne mogu postići toliko visoke koncentracije lijeka kao u urinu. Sinergija fosfomicina dokumentirana je s različitim antibioticima, između ostalog s β -laktamskim antibioticima (10,82–85), aminoglikozidima(83,86,87), kinolonima (3,83,88,89) i polimiksinima (3). Ipak, podaci studija za *in vitro* sinergiju fosfomicina u kombinaciji s drugim antibioticima su promjenjivi i, u pogledu nekih antibiotika, temeljeni na ograničenom broju izolata bez definiranih fenotipova rezistencije (3,4,10,82–84,86–92). Štoviše, značajan broj studija objavljen je prije 2005. godine s vrlo heterogenim definicijama sinergije. Zabilježen je, također, i antagonizam s β -laktamskim antibioticima, kinolonima i aminoglikozidima (85,90–92).

Prema rezultatima preglednog rada iz 2020. koji je obuhvatio 185 *in vitro* studija sinergije fosfomicina s drugim antibioticima, za izolate *P. aeruginosa* najčešće je zabilježena sinergija s kloramfenikolom (53 %), aminoglikozidima (43 %) i cefalosporinima (36 %) (85). Stope sinergije značajno su varirale u kombinaciji s kinolonima, od 100 % do antagonizma zabilježenog *in vivo* i *in vitro*. Rezultati studija prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Stope sinergije u kombinaciji s fosfomicinom prema izolatima *P. aeruginosa*

ATB	n (studije)	n (izolati)	SIN (%)	AD (%)	IND (%)	ANT (%)
Penicilini + β LI	6	235	15	40	45	
Cefalosporini \pm β LI	13	318	36	40	23	1
Karbapenemi	15	445	29	25	36	1
Monobaktami	3	138	29	54	17	
Kinoloni	18	236	42	36	38	5
Aminoglikozidi	23	440	43	29	27	1
Makrolidi	2	31	19	79	2	
Tetraciklini	1	5	40	60		
Polimiksini	4	11	27	41		
Tigeciklin	1	15	13		18	
Nitroksolin	1	8	12		88	
Kloramfenikol	1	19	53	37	10	

Kratice: SIN: sinergija, AD: aditivni učinak, IND: indiferencija, ANT: antagonizam, β LI: inhibitori β -laktamaza

Dokumentiran je aditivni (93) i sinergistički učinak fosfomicina s aminoglikozidima. U jednoj studiji MacLeod i suradnici prikazali su sinergiju fosfomicina s tobramicinom u prisustvu mucina uz manju učestalost mutacija i boljom kinetikom ubijanja uz posljedično sporiji razvoj rezistencije. Pretpostavlja se da do sinergije dolazi tako što fosfomicin pospješuje aktivni transport tobramicina u bakterijske stanice *P. aeruginosa* ovisno o dozi, čime dolazi do povećane inhibicije bakterijske sinteze proteina te baktericidnog učinka. Također, u prijašnjim studijama pokazano je da fosfomicin poboljšava „time-kill“ kinetiku i amikacina kod *P. aeruginosa* (86,94). U drugoj studiji MacLeod i suradnici šah metodom pokazali su sinergiju u samo 7 % sojeva, dok *in vitro* testiranjima nije pokazana veća osjetljivost fosfomicina s tobramicinom u odnosu na tobramicin sam. Međutim, kombinacija antibiotika smanjila je razvoj rezistencije, a kako se tobramicin daje u manjim količinama, kumulativni toksični efekt također bi mogao biti manji. Fosfomicin, prema nekim istraživanjima, također smanjuje nefrotoksičnost koju mogu uzrokovati aminoglikozidi (87). Okazaki i suradnici zabilježili su 70 %-tnu učinkovitost u kombinaciji s gentamicinom protiv MDR izolata *P. aeruginosa*, a Walsh dokazala pojačano ubijanje bakterija u kombinacijama s tobramicinom koristeći klinički relevantne koncentracije antibiotika (3). Ipak, u jednoj *in vivo* studiji prikazan je indiferentni

učinak u kombinaciji s aminoglikozidima na 15 izolata, u sojeva otpornih na nebulizirani fosfomicin i amikacin (85).

Sinergija fosfomicina s ciprofloksacinom zabilježena je prema kliničkim izolatima gram-negativnih bakterija (95) i različito otpornim izolatima *P. aeruginosa* (3,83,88,89). Yamada i suradnici prikazali su sinergiju fosfomicina i ciprofloksacina kod izolata *P. aeruginosa* rezistentnog na ciprofloksacin. Sinergistički učinak dokazan je u 20/74 sojeva (27 %). Smatra se da je navedeni učinak posljedica boljeg prodora fosfomicina u citoplazmu bakterijske stanice *P. aeruginosa* po oštećenju vanjske membrane ciprofloksacinom (88). „Time-kill“ metodom Walsh je zabilježila pojačano ubijanje u kombinacijama s ciprofloksacinom na MDR *P. aeruginosa* (3).

Ispitivanja sinergije na MDR izolatima *P. aeruginosa*, osobito onima koji sadrže karbapenemaze, su oskudna, a najčešće je korišteno samo nekoliko antimikrobnih kombinacija (3,4,74,82,96–100). Sinergija s fosfomicinom kod MDR izolata testiranima *in vitro* je zabilježena u kombinacijama sa ceftolozan/tazobaktamom (88 %), ceftazidim/avibaktamom (33 %), meropenemom (88 %), levofloksacinom (20 %), ciprofloksacinom (100 %, 2 soja ukupno), minociklinom (20 %), polimiksinom B (18 %) i kolistinom (13 %, 21 %), najčešće na manjem broju izolata (do 27) (85). Sinergija je zabilježena i kod jednog panrezistentnog *P. aeruginosa* u kombinaciji s meropenemom (85). „Time-kill“ metodom Walsh je uočila pojačano ubijanje bakterija u kombinaciji s ciprofloksacinom na tri MDR-a od ukupno četiri klinička izolata (3). Samonis je zabilježio sinergiju korištenjem imipenema (46,7 %) i kolistina (13,3 %) na 15 MDR izolata koristeći FICI ili GDSC (engl. *gradient diffusion strip cross method*, metoda ukriženih trakica) za definiranje antimikrobnih interakcija (4). Istom metodom, Avery je pratila interakcije antibiotika među 153 izolata *P. aeruginosa* otpornih na karbapeneme. Sinergija je najčešće zabilježena s ceftazidimom (51,9 %), zatim u kombinaciji s cefepimom (23,9 %) i piperacilinom/tazobaktamom (2,9 %) (10). Bibliografske podatke koji pokrivaju XDR izolate nije bilo moguće pronaći.

P. aeruginosa ima vrlo visoku učestalost razvoja mutanata rezistentnih na fosfomicin *in vivo* i *in vitro*, što bi moglo rezultirati i neuspjehom kombinirane terapije (2–4). Rodriguez-Rojas i suradnici analizirali su učestalost razvoja mutanata rezistentnih na fosfomicin u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima u terapiji divljeg tipa *P. aeruginosa* i njegovog hipermutabilnog soja. Učestalost razvoja mutanata divljeg soja *P. aeruginosa* bila je vrlo visoka kod primjene fosfomicina, visoka kod primjene imipenema i meropenema, umjereno visoka

kod primjene ceftazidima i relativno niska kod primjene ciprofloksacina, amikacina i tobramicina pojedinačno, a i do 1000 puta veća kod hipermutabilnog soja *P. aeruginosa*. Frekvencije mutacija soja divljeg tipa za kombinacije antibiotika bile su ispod granica detekcije za sve kombinacije antibiotika osim imipenem i fosfomicin, dok su kod hipermutabilnog soja, kombinacije s ceftazidimom i imipenemom dale veći broj mutanata otpornih na oba antibiotika od očekivanog (veći od umnoška učestalosti svakog pojedinog antibiotika), naglašavajući važnost adekvatnog odabira kombinacije antimikrobnih lijekova (38). U jednoj drugoj studiji na ispitivanju farmakodinamike fosfomicina u terapiji 64 soja *P. aeruginosa*, Walsh pronalazi spektar MIK-ova od 1 do > 512, sa 61 % osjetljivih izolata (MIK \leq 64 $\mu\text{g/mL}$), međutim valja naglasiti kako su svi testirani izolati imali rezistentnu subpopulaciju otkrivenu u toku analize profiliranja populacije. Time je indicirano kako bi monoterapija *P. aeruginosa* sa fosfomicinom mogla biti izazovna u slučaju da se ove spoznaje prenesu u *in vivo* uvjete (17). S druge strane, kombinirana terapija s fosfomicinom mogla bi se pokazati korisnom čak i u kombinacijama s antimikrobnim lijekovima na koje su bakterije otporne, jer u kombinaciji mogu povratiti osjetljivost (3,9,10). Prema Okazakiju, primjenom mikrodilucijske bujon metode, otporni klinički izolati *P. aeruginosa* u kombinaciji s fosfomicinom povratili su osjetljivost na ceftazidim (60,7 %), cefepim (46,2 %), aztreonam (20,7 %) i meropenem (50 %). Avery je primijetila isti učinak u kombinaciji s ceftolozanom/tazobaktamom (71,4 %), ceftazidimom/avibaktamom (68,8 %), cefepimom (60,9 %), ceftazidimom (56,8 %), aztreonamom (44,7 %), tobramicinom/piperacilinom (19,0 %), tazobaktamom (14,6 %) i meropenemom (13,7 %) kod *P. aeruginosa* izolata otpornih na karbapeneme koristeći GDSC metodu (10). Istom metodom zabilježila je i učinak snižavanja MIK vrijednosti u kombinaciji s ceftolozanom/tazobaktamom za jedan ili oba lijeka kod MDR *P. aeruginosa* (81).

S obzirom na nisku toksičnost, širok spektar, uključujući višestruko otporne bakterije, dobru farmakokinetiku i dostupnost u parenteralnim i oralnim oblicima, fosfomicin je postao atraktivan izbor terapije u ne-urinarnim infekcijama i infekcijama uzrokovanim višestruko otpornim bakterijama. Kombinirana terapija trebala bi pomoći održavati niske razine rezistencije. Prema trenutnim saznanjima, kombiniranu terapiju treba pomno birati. Iako učestalost rezistencije na fosfomicin nije značajno visoka, zabilježen je porast i zabrinjava rezistencija na fosfomicin koja se prenosi plazmidom u kojem je vezana za rezistenciju na druge antibiotike, osobito β -laktamske (npr. FosA3 i KPC-2 u Kini). Adekvatno propisivanje antimikrobne terapije i praćenje širenja rezistencije putem plazmida će biti nužni da se

fosfomicin zadrži kao terapijska opcija, kako za cistitis, tako i za teške sistemske infekcije uzrokovane višestruko otpornim bakterijama (17).

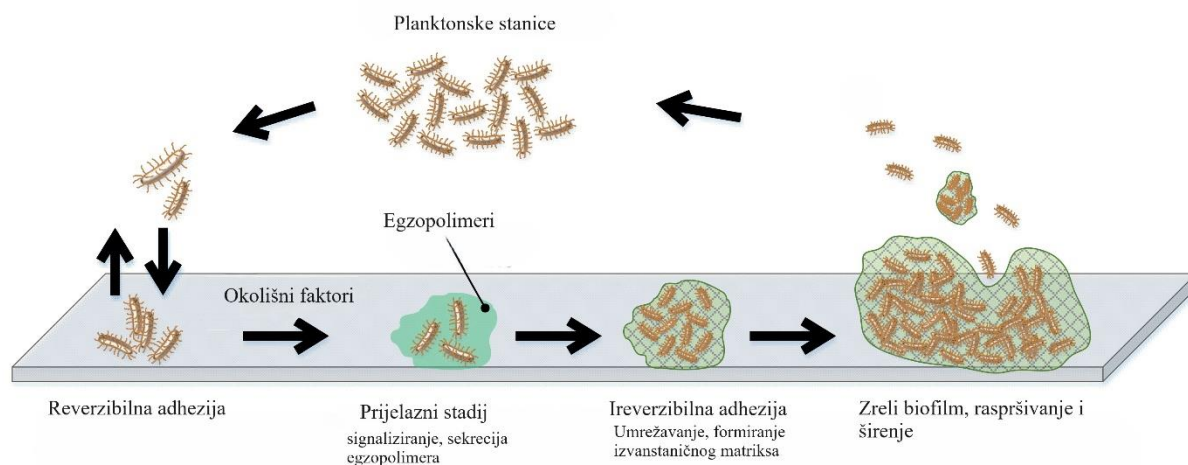
1.5 Postantibiotički učinak

Postantibiotički učinak (engl. *post antibiotic effect*, PAE) je farmakodinamički parametar antibiotika koji označava supresiju bakterijskog rasta nakon kratkotrajnog izlaganja antibiotiku (1-2 sata). Kod PAE inhibicija bakterijskog rasta vidljiva je kada antibiotik više nije prisutan u hranjivom mediju ili u organizmu ili ako je njegova koncentracija ispod MIK-a. Kako PAE omogućuje učinak antibiotika i nakon što mu koncentracija padne ispod MIK-a takvi se antibiotici mogu dozirati u dužim vremenskim intervalima što smanjuje rizik nuspojava. Dužina trajanja PAE ovisi o vrsti, koncentraciji i tipu antibiotika ili kombinaciji antibiotika i dužini trajanja ekspozicije (101). Određeni okolišni uvjeti također mogu utjecati na duljinu učinka, kao što su gustoća inokuluma, pH i vrsta medija. Veliki inokulumi mogu reducirati trajanje učinka, osobito kod gram-negativnih bacila. Učinak se također može reducirati u serumu kod antibiotika koji se dobro vežu za proteine plazme, ako se koncentracije ne prilagode (102). Postojanje PAE objašnjava se raznim mehanizmima: spori oporavak od reverzibilnog, neletalnog oštećenja staničnih struktura (npr. nukleinskih kiselina ili proteina), perzistencija lijeka na mjestu vezanja ili u periplazmatskom prostoru i potreba sinteze novih enzima prije nastavka daljnjeg rasta bakterija (101–103). Najčešće korištena *in vitro* metoda za proučavanje postantibiotičkog učinka je metoda brojanja vijabilnih kolonija i praćenja rasta bakterija u vremenu. Kako bi se učinak kvantificirao, računa se razlika između vremena potrebnog da se broj kolonija u uzorcima tretiranim antibioticima poveća za 1 log₁₀ iznad vrijednosti dobivene odmah po uklanjanju antibiotika i istog vremenskog intervala potrebnog neizloženoj kontroli (104–106). Postantibiotički učinak koji traje do dva sata smatra se kratkim, u periodu između dva i četiri sata umjereno dugim, a učinak dulji do četiri sata smatra se produljenim (107). Druge metode za mjerenje mikrobnog rasta koje su korištene u analizi PAE uključuju optičku gustoću, elektroničko brojanje čestica, mjerenje impedancije, mjerenje ATP-a i mjerenje brzine ugradnje 3H-timidina, općenito sa sličnim rezultatima (102). Velik broj antibiotika pokazuje značajan *in vitro* PAE ($\geq 1,5$ h) prema osjetljivim gram-pozitivnim kokcima. Značajan PAE ograničen je na karbapeneme i antibiotike koji inhibiraju sintezu proteina ili DNA, u primjeni prema gram-negativnim bacilima (102,103). Izlaganjem mikroorganizma većoj koncentraciji antibiotika i produljivanjem vremena ekspozicije, može se produljiti i učinak. Maksimalni *in vitro* PAE se ipak postiže uz dvosatnu ekspoziciju pri 8 x - 16 x MIK vrijednostima (102). Fosfomicin pokazuje dugačak PAE ovisan o koncentraciji prema *E. coli* i *P. mirabilis* (3,4 h pri 0,25 x MIC, 3,4 h pri 1 x MIC do 4,2 h pri 8 x MIC) (108). Dokumentirane PAE vrijednosti za *P. aeruginosa* varirale su u ovisnosti o koncentraciji i iznosile od 0,3 h pri 0,5 x MIK do

najviše 5,5 h pri 16 x MIK (2). Glavna klinička značajka postantibiotskog učinka je mogućnost promjene režima doziranja. Kontinuirane infuzije, čini se, daju bolje kliničke rezultate u odnosu na intermitentne injekcije kod antibiotika koji ne pokazuju PAE. Prisustvo PAE kod antibiotika, s druge strane, omogućava duže intervale doziranja, s obzirom na to da je spriječen rast bakterija i u trenutku kada razina antibiotika padne ispod MIK vrijednosti. Prednost rjeđeg terapijskog režima su rjeđe nuspojave lijeka i manji ukupni trošak (102).

1.6 Biofilm

Mikroorganizmi se u prirodi pojavljuju kao individualne stanice, tzv. planktonski organizmi koji slobodno plivaju u tekućem mediju ili u obliku sesilne zajednice koju nazivamo biofilm. Biofilm je prvotno definiran 1978. kao strukturna zajednica mikroorganizama koja prianja na podlogu i proizvodi izvanstanični polisaharidni matriks. Predstavlja kompleksnu sesilnu zajednicu mikroorganizama ireverzibilno vezanih međusobno i na supstrat te uklopljenih u polimerni matriks koji su sami proizveli, a u kojem bakterije pokazuju drugačije osobine u odnosu na svoje planktonske stanice. Može se formirati u roku nekoliko sati. Nastaje tako da planktonska mobilna bakterijska stanica temeljem okolišnih signala kao što su pH, razina kisika, temperatura, koncentracija nutrijenata, detektira prihvatljivu površinu. Flagelama i fizičkim silama kreće se prema površini, te slijedi prvo reverzibilna adhezija na površinu fizikalno-kemijskim i elektrostatskim interakcijama, a zatim ireverzibilna adhezija pomoću adhezina. Hidrofobne i grube površine su pogodnije za adheziju od glatkih i hidrofilnih. Sada se bakterija razmnožava i stvara mikrokolonije, koje potom luče egzopolisaharde. Taj izvanstanični matriks predstavlja glavnu strukturnu komponentu bakterijskog biofilma, a sastoji se od egzopolisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i minerala, ovisno o bakterijskoj vrsti i njihovim uvjetima rasta. Biofilm vremenom sazrije, zadeblja i dobije svoju konačnu 3D strukturu. Na sluzavi izvanstanični matriks otpada 80-85 % posto biofilma, dok mikroorganizmi čine 15-20 % ukupne biomase. Unutar biofilma razvijaju se strukture za transport kisika i hranjivih tvari za rast sesilnih bakterija, a mikroorganizmi su organizirani i reguliraju svoju aktivnost bakterijskom međustaničnom komunikacijom (engl. *quorum* sensing) pomoću molekula koje difundiraju kroz biofilm, što bakterijama omogućava regulaciju genske ekspresije. Kroz biofilm postoji također gradijent kisika i pH koji utječe na metaboličku aktivnost i diferenciranje bakterija, čime se razvijaju heterogene subpopulacije, genetički identične ali fiziološki različite. To također znači da unutar samog biofilma nalazimo područja aerobnih, mikroaerofilnih i anaerobnih uvjeta. Mehaničkom abrazijom, enzimskom razgradnjom ili zbog pretjeranog rasta i nedostatka nutrijenata, komadići biofilma mogu se otrgnuti. Takve, ponovno slobodne bakterije mogu kolonizirati nove površine i stvarati novi biofilm, slika 7. (26).



Slika 7. Ciklus stvaranja biofilma. Slika preuzeta od Anne D. Staneva i suradnika (109), uz preinake.

U biofilmu su bakterijske stanice zaštićene od imunskog sustava domaćina i primijenjenih terapijskih koncentracija antibiotika i predstavljaju trajni izvor infekcije. Stanice fagocita teško prodiru u izvanstanični matriks, gdje ih razgrađuju bakterijski enzimi. Liza neutrofila dovodi do nakupljanja štetnih produkata i, posljedično, upale. Bakterije u biofilmu podnose znatno više koncentracije antibiotika, kako polisaharidni matriks predstavlja fizičku prepreku prolaska antibioticima, a one same imaju usporen rast, razmnožavanje i metabolizam. Sesilne bakterije u biofilmu, sa specifičnim „nerastućim“, dormantnim fenotipom i tolerancijom visokih koncentracija antimikrobnih lijekova, nazivaju se perzisteri. Te bakterije mogu obnoviti bakterijsku zajednicu po eliminaciji perifernih planktonskih i sesilnih bakterija. Treba naglasiti da se ovdje radi o toleranciji bakterija na antibiotike, naime mogu preživjeti u uvjetima viših koncentracija antimikrobnog lijeka, uz obustavu rasta. Takvo obilježje je fenotipsko, nenasljedno i reverzibilno. Mehanizmi rezistencije su pak nasljedni i temelje se na izbjegavanju interakcije antibiotika s ciljnom molekulom (26). Biofilm infekcije danas preuzimaju dominantnu ulogu među infekcijama povezanih sa zdravstvenom skrbi. Procjenjuje se da su danas uključene u preko 65 % infektivnih bolesti i preko 80 % kroničnih infekcija(26). Eliminacija biofilma je iznimno teška, zahtijeva visoke doze antibiotika, nerijetko u kombinaciji i često s upitnim ishodom (27,28).

1.6.1 Uloga biofilma kod infekcija *P. aeruginosa*

P. aeruginosa jedna je od bakterija koja je poznata po sposobnosti stvaranja biofilma po raznim tkivima i umjetnim materijalima, poput katetera, implantata, leća i proteza. Nerijetko kolonizira pluća pacijenata s cističnom fibrozom, kroničnim ili dijabetičkim ranama. Biofilm infekcije uzrokovane *P. aeruginosa* kompliciraju liječenje i često rezultiraju terapijskim

neuspjehom te razvojem kronične infekcije (26). Tvorba biofilma adaptivni je mehanizam koji se smatra ključnim faktorom virulencije jer omogućava izlaganje visokim dozama antibiotika i stvaranje kronične infekcije (26,110). Nerijetko u pacijenata oboljelih od cistične fibroze perzistira nekoliko različitih fenotipova jednog klona *P. aeruginosa*: mukoidni, nemukoidni i mikrokolonije. Pronalaze se i visoko mutabilni sojevi. Fenotipovi su rezultat mutacija genoma, koje su posljedica uvjeta u okolišu u kojem se bakterija nalazi (48).

Usprkos toleranciji na antibiotike, neki antibiotici ipak zadržavaju aktivnost protiv bakterija u biofilmu (26). Pokazalo se da fosfomicin ima dobru aktivnost i vrlo dobro prodire u zrele biofilmove koje stvara *P. aeruginosa* (5,6), ali i pospješuje prodiranje drugih antibiotika (29,111). Jedno od objašnjenja je malena molekularna težina ovog antimikrobnog lijeka (5,6,30,112). Zabilježena je i redukcija biofilma uropatogene *E. coli* (30). Monoterapija fosfomicinom, osim što predstavlja problem s obzirom na brzu selekciju rezistentnih mutanata, obično nije dovoljna za eradikaciju biofilma.

Prema nekim izvorima, ciprofloksacin i gentamicin također dobro prodiru u biofilm koji tvori *P. aeruginosa* (12). I drugi konvencionalni antibiotici koji se koriste u terapiji infekcija koje uzrokuje *P. aeruginosa*, također su pokazali određenu aktivnost na različitim razinama stvaranja biofilma (26). Nekoliko antibiotika, uključujući ceftazidim, kolistin i piperacilin/tazobaktam, ima određeni učinak na bakterijsku adheziju, pokretljivost i stvaranje biofilma, a čini se da i aminoglikozidi pokazuju preventivno djelovanje na ranu adheziju izolata *P. aeruginosa* (26).

Sinergija u terapiji biofilma *P. aeruginosa* je uočena primjenom nekoliko antimikrobnih kombinacija (27,28). Terapijski uspjeh s eradikacijom novih kolonizacija *P. aeruginosa* zabilježen je primjenom tobramicina i kolistina s ciprofloksacinom, omogućavajući odgodu kronične infekcije kod pacijenata s cističnom fibrozom (113). Sinergija fosfomicina protiv biofilma *P. aeruginosa* uglavnom je zabilježena u kombinacijama s aminoglikozidima i kinolonima (12). Također je zabilježena i u kombinacijama s visokim dozama imipenema, gentamicina i kolistina, ali je upitne kliničke vrijednosti zbog potencijalne toksičnosti potrebnih koncentracija lijeka za klinički učinak (9). Eradikacija biofilma zabilježena je u kombinaciji s tobramicinom (29). Većina istraživanja provedena je na malom broju izolata, nerijetko na referentnom soju, koristeći mali broj antimikrobnih kombinacija (29,114–117). Pokusi provedeni na kliničkim izolatima *P. aeruginosa* su rijetki u medicinskoj bibliografiji. Također, nema publiciranih podataka o kombinacijama s β -laktamskim antibioticima ceftazidimom,

cefepimom i piperacilinom/tazobaktamom, kao ni podataka o izolatima prošireno otpornim na antimikrobne lijekove (XDR).

2 OBRAZLOŽENJE TEME I CILJEVI RADA

Pseudomonas aeruginosa jedan je od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. Vrlo je prilagodljiva bakterija poznata po svojoj sposobnosti da razvije otpornost na razne antibiotike, ali i po mogućnosti stvaranja biofilma, gdje je nedostupna antibioticima i imunom sustavu domaćina. Fosfomicin je stari antibiotik koji se sve se češće koristi u terapiji sistemnih infekcija uzrokovanih otpornim bakterijama zbog specifičnog mehanizma djelovanja i očuvane aktivnosti protiv bakterija otpornih na antibiotike, s obzirom na to da se na njega ne razvija križna otpornost. Zabrinjava podatak o visokoj učestalosti mutacija i selekciji sojeva otpornih na fosfomicin *in vitro*. Bolja učinkovitost antibiotika može se postići njihovom kombiniranom primjenom. Razne studije dokumentirale su sinergiju fosfomicina s drugim antibioticima, uključujući β -laktamske antibiotike, aminoglikozide, kinolone i polimiksine. S β -laktamskim antibioticima i aminoglikozidima dokumentiran je i antagonizam. Bibliografski podaci o sinergiji višestruko otpornih izolata te izolata koji proizvode metalo- β -laktamaze izuzetno su oskudni, dok podataka o prošireno otpornim izolatima nema. Također, nema izvješća o učinku kombinirane terapije s fosfomicinom na trajanje postantibiotičkog učinka kod *P. aeruginosa*, kao parametra supresije bakterijskog rasta nakon kratkotrajnog izlaganja antibiotiku. Dulji postantibiotički učinak omogućio bi rjeđe doziranje antibiotika. Nadalje, biofilm se smatra jednim od najvažnijih faktora virulencije *P. aeruginosa*. Eliminacija biofilma je izazovna, a nepotpuna eliminacija omogućuje recidiv. Fosfomicin odlično prodire u biofilm, te prema nekim studijama reducira broj i eradiciira bakterije iz biofilma, ali i olakšava prodor drugih antibiotika. Stoga je svrha ovog istraživanja, u svijetlu kontinuiranog porasta otpornosti kod *P. aeruginosa* na antimikrobne lijekove i sve manjih terapijskih mogućnosti kod infekcija koje uzrokuje, procjena utjecaja kombinirane terapije kao terapijske alternative.

Cilj rada je ispitati *in vitro* sinergiju fosfomicina s 8 antibiotika koji se koriste u liječenju infekcija koje uzrokuje *Pseudomonas aeruginosa* na izolatima te bakterije s različitim determinantama rezistencije, uključujući višestruko otporne i ekstenzivno otporne izolate. Cilj je, također, ispitati postantibiotički učinak fosfomicina samostalno i u kombinaciji s istim antibioticima i utvrditi učinak kombinacija vršnih koncentracija antibiotika u plazmi na inhibiciju stvaranja biofilma i razaranje već stvorenog biofilma.

Specifični ciljevi rada su:

- Ispitati osjetljivost izolata *P. aeruginosa* na fosfomicin, ceftazidim, cefepim, piperacilin/tazobaktam, gentamicin, amikacin, imipenem, ciprofloksacin i kolistin koristeći metode disk difuzije, dilucije u bujonu, agar dilucije i E-testom;
- Ispitati prisutnost β -laktamaza fenotipskim testovima (modificiranim Hodge testom, metodom inaktivacije karbapenema i metodom kombiniranog diska za detekciju metalo- β -laktamaza) i umnažanjem *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{NDM} gena lančanom reakcijom polimeraze;
- Ispitati međudjelovanje navedenih antibiotika s fosfomicinom metodom ukriženih trakica s koncentracijskim gradijentom i određivanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa;
- Ispitati međudjelovanje navedenih antibiotika „*time-kill*“ metodom na četiri odabrana izolata;
- Ispitati postantibiotički učinak fosfomicina samoga i u kombinaciji s navedenim antibioticima;
- Ispitati stupanj stvaranja biofilma za otporne izolate;
- Ispitati utjecaj navedenih antibiotika samostalno i u kombinaciji s fosfomicinom na najveće proizvođače biofilma.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Gotove komercijalne mikrobiološke podloge i njihove komponente

- Agar za čuvanje mikroorganizama (engl. *Stock Culture Agar*, Bio-Rad Laboratories, SAD)
- Agar za hranjive podloge (Sigma-Aldrich, Austrija)
- Dvostruki šećer po Kligleru (Oxoid, Engleska)
 - kazein pepton, 10 g/L
 - željezov sulfat, 0,2 g/L
 - glukoza, 1 g/L
 - laktoza, 10 g/L
 - mesni ekstrakt, 3 g/L
 - mesni pepton, 10 g/L
 - fenol crveno, 0,025 g/L
 - natrijev klorid, 5 g/L
 - natrijev tiosulfat, 0,5 g/L
 - ekstrakt kvasca, 3 g/L
 - agar, 12 g/L
 - pH 7,4
- Krvni agar (Columbia agar + 5 % ovčje krvi) (BioMerieux, Francuska)
 - tripton, 12 g/L
 - enzimski ekstrakt životinjskog tkiva, 5 g/L
 - ekstrakt kvasca, 3 g/L
 - goveđi ekstrakt, 3 g/L
 - škrob, 1 g/L
 - natrijev klorid, 5 g/L
 - agar, 13,5 g/L
 - defibrilirana ovčja krv, 5 %
 - pH 7,3±0,2
- McConkey agar (Oxoid, Engleska)
 - pepton, 20 g/L
 - laktoza, 10 g/L
 - žučne kiseline, 5 g/L

natrijev klorid, 5 g/L
neutralno crveno, 0,075 g/L
agar, 12 g/L
pH 7,4±0,2

- Moždano-srčani bujon (engl. *Brain Heart Infusion (BHI) broth*, Oxoid, Engleska)

ekstrakt (infuzija) goveđeg mozga, 200 g/L
ekstrakt (infuzija) goveđeg srca, 250 g/L
pepton, 10 g/Lglukoza, 2 g/L
natrijev klorid, 5 g/L
dinatrijev fosfat, 2,5 g/L
pH 7,4±0,2

- Mueller-Hinton agar (MHA) (BioMerieux, Francuska)

pepton, 17,5 g/L
mesni ekstrakt, 2 g/L
škrob, 1,5 g/L
agar, 17 g/L
pH 7,3±0,1

- Mueller-Hinton bujon (MHB) (Oxoid, Engleska)

goveđi ekstrakt, 300 g/L
hidrolizat kazeina, 17,5 g/L
škrob, 1,5 g/L
Ph 7,3±0,1

- Trypton soja agar (TSA) (BioMerieux, Francuska)

tripton, 15 g/L
enzimski ekstrakt soje, 5 g/L
natrijev klorid, 5 g/L
agar, 15 g/L
pH 7,3±0,2

- Tryptic Soy bujona (TSB) (BioMerieux, Francuska)

Pepton iz kazeina, 17 g/L
enzimski ekstrakt soje, 3 g/L
glukoza, 2,5 g/L
natrijev klorid, 5 g/L
dikalij-fosfat, 2,5 g/L
pH 7,1±0,2

3.1.2 *Komercijalni biokemijski testovi*

- Api[®] 20NE za identifikaciju nefermentativnih bakterija (Biomérieux, Francuska)
- Bactident[®] oksidaza (Merck Kgaa, Njemačka)

3.1.3 *Kemikalije, reagensi i boje*

- Etanol (Kemig d.o.o , RH Hrvatska)
- Kristal violet (Merck Kgaa, Njemačka)
- Etilendiamin tetraoctena kiselina, EDTA (Merck Kgaa, Njemačka)
- Jod (Merck Kgaa, Njemačka)
- Matriks za masenu spektrometriju (*Maldi flexmatrix*, Bruker Daltonik, Njemačka)
- Glukoza-6-fosfat (Sigma-Aldrich, SAD)
- Etidijev bromid (Sigma-Aldrich, SAD)
- Lugolova otopina (Merck Kgaa, Njemačka)
- Karbol fuksin (Merck Kgaa, Njemačka)

3.1.4 *Standardi molekulskih masa*

- 100 bp DNA Ladder (Roche, Njemačka)

3.1.5 *Reagensi za lančanu reakciju polimeraze*

- PCR Master smjesa s termostabilnom polimerazom (EmeraldAmp Master Mix, Clontech Takara Bio, Japan)

3.1.6 *Nukleinske kiseline*

- Nukleotidni sljedovi početnica koji su korišteni za detekciju i amplifikaciju gena lančanom reakcijom polimeraze prikazani su u tablici 3 (TIB Molbiol, Njemačka).

Tablica 3. Parovi početnica korišteni za potvrdu gena *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* i *bla_{NDM}* lančanom reakcijom polimeraze, f (*engl.* forward) i r (*engl.* reverse), preuzete iz dostupne literature (118–121).

Parovi početnica	Gen	Veličina produkta (pb)	Redoslijed baza početnica
VIM-DIA/f	<i>bla_{VIM}</i>	523	5'-CAG-ATT-GCC-GAT-GGT-GGT-TGG-3'
VIM-DIA/r			5'-AGG-TGG-GCC-ATT-CAG-CCA-GA-3'
IMP-DIA/f	<i>bla_{IMP}</i>	350	5'-GAA-GGY-GTT-TAT-GTT-CAT-AC-3' (Y=C ili T)
IMP-DIA/r			5'-GTA-MGT-TTC-AAG-AGT-GAT-GC-3' (M=A ili C)
NDM/f	<i>bla_{NDM}</i>	264	5'-AAT-GGA-ATT-GCC-CAA-TAT-TAT- GC-3'
NDM/r			5'-CGA-AAG-TCA-GGC-TGT-GTT-GC-3'

3.1.7 Antibiotici za ispitivanje rezistencije na antibiotike

3.1.7.1 Dijagnostički diskovi natopljeni antibiotikom (Mast Group, UK)

- Ceftazidim (30 µg)
- Cefepim (30 µg)
- Piperacilin/tazobaktam (100/10 µg)
- Gentamicin (10 µg)
- Amikacin (30 µg)
- Imipenem (10 µg)
- Meropenem (10 µg)
- Ciprofloksacin (5 µg)

3.1.7.2 Trakice s gradijentom antibiotika za epsilometarski test -E-test (Liofilchem, Italija)

- Liofilchem® mts™ ceftazidim
- Liofilchem® mts™ cefepim
- Liofilchem® mts™ piperacilin/tazobaktam
- Liofilchem® mts™ imipenem
- Liofilchem® mts™ meropenem
- Liofilchem® mts™ gentamicin

- Liofilchem® mts™ amikacin
- Liofilchem® mts™ ciprofloksacin

3.1.7.3 *Antibiotici u prahu za pripremu matične otopine s početnom koncentracijom antibiotika (Sigma-Aldrich, SAD)*

- Fosfomicin
- Ceftazidim
- Piperacilin/tazobaktam
- Cefepim
- Gentamicin
- Amikacin
- Ciprofloksacin
- Imipenem
- Kolistin

3.1.8 *Uređaji*

- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Automatski pipetori (Eppendorf®, Njemačka)
- Višekanalna pipeta (Eppendorf®, Njemačka)
- Pipeta s višestrukim dozatorom (Eppendorf®, Njemačka)
- Denzimmat (Biomerieux, Francuska)
- Dispenzeri (Bio-Rad, Francuska)
- Električni vibrator za jednu epruvetu (Tehtnica EV100, Slovenija)
- Elektromagnetska miješalica s grijaćom pločom (Tehtnica MM 510, Slovenija)
- Termoblok (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Švjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Termostati (Selecta, Španjolska)
- Uređaj za identifikaciju mikroorganizama Vitek 2 (Biomerieux, Francuska)
- Transiluminator za vizualizaciju DNA pod UV svjetlošću (Elchrom Scientific, Njemačka)
- Vodena kupelj GFL 1086 (GFL, Njemačka)

- Uređaj za matriksom potpomognutu ionizaciju desorpcijom laserskog zračenja-analizator masa s vremenom leta, engl. *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* - MALDI TOF (Bruker Daltonik, Njemačka)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom „PCRmax Alpha Cyclor”, (Bibby Scientific Limited, UK)
- Uređaj za horizontalnu elektroforezu “Vari-gel horizontal gel electrophoresis unit”, (SCIE-Plas, UK)
- Mikrocentrifuga s kivetama od 1,5 mL (Haereus, Njemačka)
- Spektrofotometar (Spectra II, Tecan, Austrija)
- Digitalna kamera (Canon, Japan)
- Zamrzivač za ultraniske temperature (New Brunswick Scientific, SAD)
- Termostat (Selecta, Španjolska)
- Termostat (Mettler GmbH, Njemačka)

3.1.9 Laboratorijski pribor i potrošni materijal

- Epruvete za čuvanje mikroorganizama na niskim temperaturama (engl. *Cryo tubes*, Cryoinsant VWR, Belgium)
- Stakleno posuđe (Duran[®], Njemačka)
 - Stakalca za mikroskopiranje
 - Staklene epruvete
 - Staklene boce
 - Staklene Erlenmeyerove tikvice
 - Staklene odmjerne pipete
- Plastične eze (Aptaca Spa, Italija)
- Polistirenske mikrotitarske ploče s 96 bunarića s U- dnom (Kartell, Italija)
- Polistirenske mikrotitarske ploče s 96 jažica s ravnim dnom (Greiner Bio-One, Austrija)
- Aplikacijski sustav za ispitivanje sinergije “MTS[™] Synergy Application System” (Liofilchem, Italija)
- Polipropilenska epruveta za centrifugu volumena 50 mL (Corning, SAD)
- Polipropilenske tubice od 200 µL (Thermo Fisher Scientific, SAD)

- Polistirenska tubica za centrifugu 1,5 mL (Eppendorf®, Njemačka)
- Polistirenska tubica za centrifugu 2 mL (Eppendorf®, Njemačka)
- Nastavci za pipete (Eppendorf®, Njemačka)
- Combitips nastavci za pipete (Eppendorf®, Njemačka)
- Višekratne metalne ploče za masenu spektrometriju (engl. *MPT target plate ground steel*, Bruker Daltonik, Njemačka)

3.2 METODE

3.2.1 Prikupljanje izolata

Za ovo istraživanje sakupljen je 51 izolat *P. aeruginosa* različite osjetljivosti na antibiotike i različitih mehanizama rezistencije, uključujući višestruko (engl. *multidrug resistant*, MDR) i ekstenzivno otporne (engl. *extensively drug resistant*, XDR) sojeve i sojeve koji proizvode različite tipove β -laktamaza. Izolati su prikupljeni iz različitih bolničkih uzoraka obrađenih u sklopu rutinskog laboratorijskog rada iz šest bolnica u Republici Hrvatskoj: Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički bolnički centar Osijek, Klinički bolnički centar Split, Opća bolnica Pula, Opća bolnica Bjelovar i Opća bolnica Slavonski brod. Identifikacija izolata provedena je konvencionalnim biokemijskim testovima, a potvrđena automatiziranim sustavima Vitek 2 ili masenom spektrometrijom MALDI-TOF (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*, matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom - analizator masa vremenom leta). Šest izolata iz Splita identificirano je kao VIM-2 pozitivno u prethodnim studijama (122). Izolate koji proizvode PER-1 te PER-1 i VIM-2 ustupio je G. M. Rossolini (Odjel za mikrobiologiju i virusologiju, Sveučilišna bolnica u Careggi, 20134 Firenca, Italija). Izolati su pohranjeni na -80°C u zamrzivaču za ultraniske temperature (New Brunswick Scientific) u obliku glicerolskih kultura i u epruvetama za čuvanje mikroorganizama na niskim temperaturama (engl. *Cryo tubes*, *Cryoinstant VWR*).

3.2.2 Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike

Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je disk-difuzijskom metodom i metodom dilucije u bujonu, kojom su određene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). MIK vrijednosti određene su pomoću test trakica s predefiniranim gradijentom koncentracije antibiotika (E-test) te metodom agar dilucije za fosfomicin.

3.2.2.1 Disk-difuzijska metoda

Za određivanje osjetljivosti na antibiotike korištena je disk-difuzijska metoda po Kirby-Baueru temeljena na difuziji antibiotika impregniranog na papirnatom disku kroz agarozni gel. S površine krute hranjive podloge ezom su podignute 2-3 kolonije testiranog izolata te su razmućene u 5 mL sterilne fiziološke otopine i homogenizirane pomoću mućkalice. Gustoća pripremljene testne suspenzije provjerena je pomoću denzitometra i prilagođena na 0,5 McFarlanda (McF), što odgovara 10^8 CFU/mL (engl. *colony forming unit*). Testirana suspenzija zasijana je na površinu Mueller-Hinton agara (MHA) vatenim štapićem u tri smjera. Unutar 15

minuta, dispenzerom su na ploče postavljeni diskovi testiranih antibiotika: ceftazidim (30 µg), piperacilin/tazobaktam (100/10 µg), cefepim (30 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), ciprofloksacin (5 µg), imipenem (10 µg). Ploče su inkubirane 24 sata na 36°C. Kroz to vrijeme antibiotik difundira kroz agarozni gel stvarajući koncentracijski gradijent. U isto vrijeme odvija se porast testiranog soja, što rezultira formiranjem zone inhibicije rasta. Promjeri zona oko diska očitani su prema laboratorijskim protokolima i interpretirani kao osjetljivi (S, engl. *susceptible*), smanjeno osjetljivi (I, engl. *intermediate*) ili otporni (R, engl. *resistant*) prema CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) kriterijima (123).

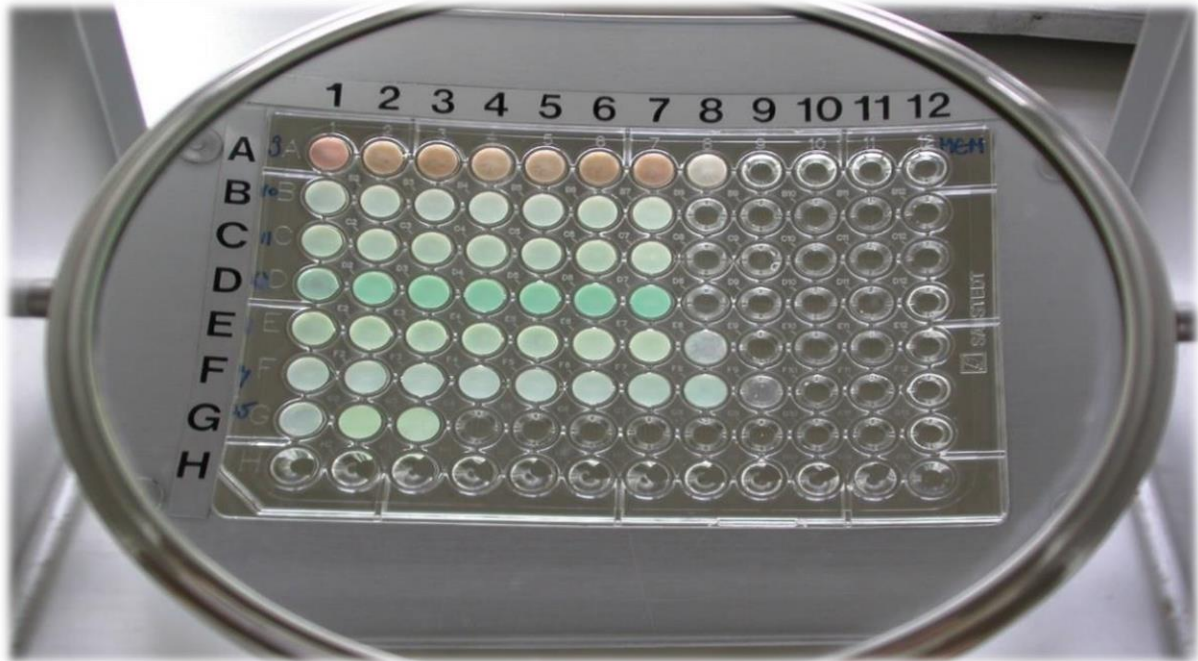
3.2.2.2 *Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije metodom dilucije u bujonu*

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija antibiotika koja onemogućuje umnažanje testiranog izolata. MIK vrijednosti testiranih izolata određene su za slijedeće antibiotike: ceftazidim, piperacilin/tazobaktam, cefepim, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, imipenem, meropenem i kolistin. Rezultati su interpretirani prema CLSI kriterijima. Za definiranje rezistencije na fosfomicin korištena je granična vrijednost od > 64 µg/mL (20). Izolati su klasificirani kao osjetljivi, višestruko otporni (MDR) i ekstenzivno otporni (XDR) prema Anna-Pelagii Magiorakos (1).

Metoda mikrodilucije s dvostrukim razrjeđenjem antibiotika u Mueller-Hinton bujonu (MHB) provedena je u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. U sterilnoj, destiliranoj vodi pripremljena je početna koncentracija antibiotika od 5120 µg/mL, koja je zatim razrijeđena u omjeru 1:10 (1 mL antibiotika i 9 mL MHB), čime je dobivena koncentracija od 512 µg/mL. Dvostruka serijska razrjeđenja antibiotika pripremljena su u Mueller-Hinton bujonu. Po 50 µL iz svake epruvete nanoseno je pipetom u po jedan stupac (8 jažica) mikrotitarske pločice. Dobiven je raspon koncentracija antibiotika od 0,12 do 256 µg/µL za ceftazidim, piperacilin/tazobaktam, cefepim, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, imipenem, meropenem i kolistin.

Testirani soj nasaden je u 5 mL MHB i inkubiran 24 sata na 36 °C. Dobivena suspenzija sadrži $10^9 - 10^{10}$ CFU/mL, te je prvo razrijeđena u fiziološkoj otopini u omjeru 1:100, pri čemu je gustoća suspenzije podešena na 0,5 McF, a zatim u MHB u istom omjeru. 50 µL dobivenog inokuluma testirane bakterije od 10^6 CFU/mL dodano je u svaku od jažica, čime je dobivena konačna veličina inokuluma od 5×10^5 CFU/mL. Kako se dodavanjem bakterijske suspenzije smjesa u jažicama razrjeđuje na pola, dobivaju se konačne koncentracije antibiotika od 0,06 do 128 µg/µL. Pločice su pokrivene sterilnim poklopcem i inkubirane 18 do 20 sati na 36 °C, a

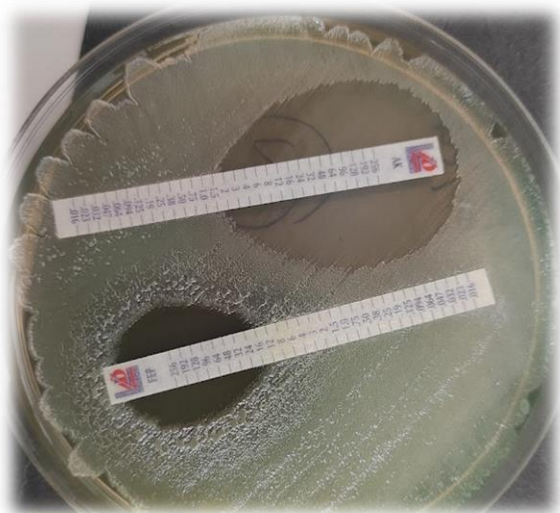
MIK vrijednost je očitana pomoću ogledala i interpretirana prema standardima CLSI-a. Prva koncentracija antibiotika u kojoj nema vidljivog zamućenja odgovara MIK-u, slika 8. Za kontrolu provedenog testiranja korišten je standardni soj *P. aeruginosa* ATCC 27853 (engl. *American type culture collection*).



Slika 8. Metoda mikrodilucije u bujonu, zbirka KBC Zagreb

E-test (epsilometar test)

Na MHA ploče vatenim štapićem je zasijana suspenzija testiranog izolata gustoće 0,5 McFarlanda u tri smjera. Na ploču su potom postavljene komercijalno dostupne papirnate test trakice impregnirane s predefiniranim gradijentom koncentracije, pokrivajući kontinuirani raspon koncentracija sljedećih antibiotika: ceftazidim, piperacilin/tazobaktam, cefepim, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, imipenem, kolistin i fosfomicin. MHA ploče su inkubirane 24 sata na 36 °C. Kroz to vrijeme dolazi do otpuštanja antibiotika s papirnatog nosača u agar, formirajući gradijent oko trake. Istovremeno dolazi do rasta nasadenog mikroorganizma i stvaranja simetrične zone inhibicije u obliku elipse duž trake, slika 9. MIK vrijednosti očitane su i interpretirane prema uputama proizvođača (MIC Test Strip , Liofilchem S.r.l.).



Slika 9. E-test (epsilometar test)

Agar dilucijska metoda

Agar dilucija je referentna metoda testiranja osjetljivosti za fosfomicin. U sterilnoj vodi pripremljena je početna koncentracija antibiotika od 5120 $\mu\text{g/mL}$. Dvostruka razrjeđenja fosfomicina su pipetirana u količini od 2 mL u otopljeni MH agar uz dodatak 25 $\mu\text{g/mL}$ glukoza-6-fosfata (123). Dobivena je serija ploča s dvostrukim razrjeđenjima fosfomicina od 0,12 – 256 $\mu\text{g/mL}$. Ploče su poklopljene sterilnim poklopcima, ohlađene te potom obilježene. Pripremljene su bakterijske suspenzije od 0,5 McFarlanda ($\sim 10^8$ CFU/mL) i razrijeđene u fiziološkoj otopini kako bi se dobila koncentracija od 10^7 CFU/mL. Po 2 μL bakterijske suspenzije svakog soja inokulirano je na za to predviđeno mjesto na svaku ploču u seriji. Standardizirana gustoća inokuluma iznosi 10^4 CFU po točki inokulacije. Podloge su potom posušene i inkubirane preko noći na 36 °C. MIK vrijednosti određuju su tako da se očita prva koncentracija antibiotika na podlozi na kojoj nije bilo vidljivog bakterijskog porasta.

3.2.3 Detekcija karbapenemaza

Proizvodnja karbapenemaza testirana je fenotipskim testovima (modificiranim Hodge testom (123), metodom inaktivacije karbapenema (124) i kombiniranom disk metodom za detekciju metalo- β -laktamaza (125)) te molekularnim metodama, odnosno lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) sa specifičnim početnicama za umnažanje kodirajućih gena za karbapenemaze.

3.2.3.1 Fenotipska detekcija karbapenemaza

3.2.3.1.1 Modificirani Hodge test

Na površinu Mueller Hinton agar (MHA) ploče inokulirana je suspenzija indikatorskog standardnog soja *E. coli* ATCC 25922 gustoće 0,5 McFarlanda. Disk meropenema (10 µg) postavljen je u središte agar ploče. Testirani izolat ezom je nasaden je obliku ravne linije okomito od ruba diska do ruba ploče. Ploče su inkubirane preko noći na 36 °C. Prisustvo deformirane zone inhibicije rasta u obliku lista djeteline oko diska meropenema, a duž linije ispitivanog mikroorganizma, interpretira se kao pozitivan rezultat, slika 10. i upućuje na proizvodnju karbapenemaza. Izostanak navedene deformacije smatra se negativnim rezultatom (123).



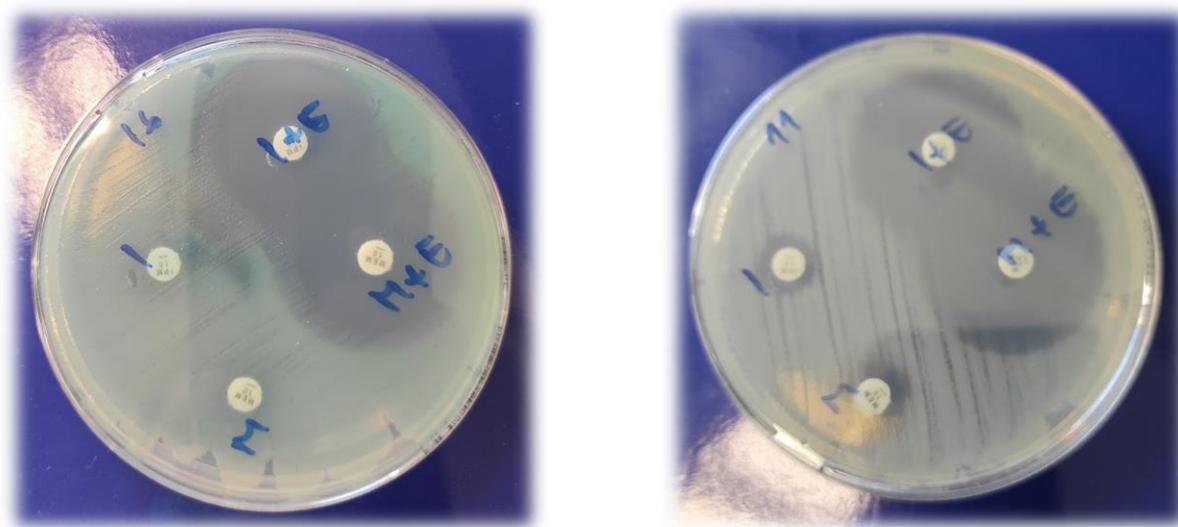
Slika 10. Modificirani Hodge test, pozitivan rezultat sa deformiranim zonama inhibicije rasta u obliku lista djeteline oko diska meropenema.

3.2.3.1.2 Metoda inaktivacije karbapenema

Fenotipski test inaktivacije karbapenema (engl. *carbapenem inactivation method*, CIM) koristi se za dokazivanje aktivnosti navedenih β -laktamaza. U guste suspenzije testiranih izolata ubačeni su diskovi meropenema od 10 µg. Suspenzije s diskovima inkubirane su 2 sata na 36° C. Na površinu MHA nasadena je suspenzija standardiziranog soja *E. coli* ATCC 25922 gustoće 0,5 McFarlanda. Prethodno inkubirani diskovi meropenema podvrgnuti enzimskoj hidrolizi uklonjeni su iz suspenzije te su postavljeni na površinu MHA ploča. Ploče su zatim inkubirane 24 sata na 36°C. Test se interpretira kao pozitivan kada je promjer zone ≤ 15 mm ili kada u zoni inhibicije rastu kolonije. Takav nalaz upućuje na hidrolitičku aktivnost testiranog izolata prema karbapenemima (124). (124)

3.2.3.1.3 Metoda kombiniranog diska za detekciju metalo- β -laktamaza

Na MHA ploču nasaden je testirani izolat gustoće 0,5 McFarlanda. Na ploču su zatim postavljena po dva diska meropenema (10 μ g) i dva diska imipenema (10 μ g). Na jedan disk imipenema i jedan disk meropenema ukapano je 10 μ L 0,5 mM otopine etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) pomoću automatskih pipetora (Eppendorf). Ploče su inkubirane preko noći na 36 °C. Razlika zone inhibicije ≥ 7 mm oko diskova koji sadrže ukapanu otopinu EDTA u usporedbi s kontrolnim diskovima bez otopine EDTA upućuju na moguću proizvodnju MBL(125), slika 11.



Slika 11. Metoda kombiniranog diska za detekciju metalo- β -laktamaza, razlika u zonama inhibicije imipenema (I) i meropenema (M) po ukapavanju EDTA (I+E, M+E)

3.2.3.2 Molekularna detekcija gena za karbapenemaze

3.2.3.2.1 Ekstrakcija DNA

Genomska DNA prikupljenih izolata korištena u lančanoj reakciji polimeraze za detekciju *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} i *bla*_{NDM} gena ekstrahirana je metodom termolize. Nekoliko 24-satnih kolonija čiste kulture izolata poraslih na MHA razmućene su u 500 μ L destilirane vode. Dobivena suspenzija prokuhana je u termobloku 10 min na 95 °C (Thermo Fisher Scientific Digital Dry Bath) te centrifugirana 1 min na 11000 g. Supernatant koji sadrži genomsku DNA odvojen je u novu mikroeprevetu i pohranjen na 4 °C, a talog je odbačen.

3.2.3.2.2 Lančana reakcija polimeraze

Prisustvo gena koji kodiraju VIM, IMP i NDM metalo- β -laktamaze određena je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), primjenom parova početnica (TIB Molbiol) za navedene gene kao što je prikazano u tablici 3. (118–121).

Kontrolne sojeve ustupila je dr. Annarita Mazzariol, sa sveučilišta u Veroni, Italija. PCR reakcije provedene su u konačnom volumenu od 50 μ L reakcijske smjese koja sadržava 20 μ L PCR sterilne destilirane vode, 25 μ L PCR Master smjese s termostabilnom polimerazom (EmeraldAmp Master Mix, Clonthech Takara Bio, Japan), 1 μ L početnice F, 1 μ L početnice R i 3 μ L DNA iz lizata testiranog izolata. Uvjeti amplifikacije *bla_{VIM}* i *bla_{IMP}* bili su sljedeći: početna denaturacija 94 °C/5 min, 35 ciklusa denaturacije 94 °C/1 min, vezanje početnica 55 °C/1 min, elongacija 72 °C/1 min i završna elongacija 72 °C/5 min. Uvjeti amplifikacije *bla_{NDM}* bili su: početna denaturacija 94 °C/5 min, 35 ciklusa denaturacije 95 °C/30 s, vezanje početnica 58 °C/30 s, elongacija 72 °C/30 s i završna elongacija 72 °C/10 min. PCR reakcije izvedene su na uređaju PCR Max Alpha Cyclor uređaju (Bibby Scientific Limited, UK).

Po 10 μ L PCR produkta potom je uneseno u jažice 1 % agaroznog gela i razdvojeno elektroforezom pri naponu od 100 V u uređuju za horizontalnu elektroforezu (Vari-Gel horizontal gel electrophoresis unit, SCIE-Plas). U jažice je nanesen i standard molekularnih masa DNA od 100 - 1500 parova baza (DNA ladder XIV, Roche, Njemačka) za određivanje veličine PCR produkta. Produkti su vizualizirani pod UV-svjetlošću nakon bojanja etidijevim bromidom.

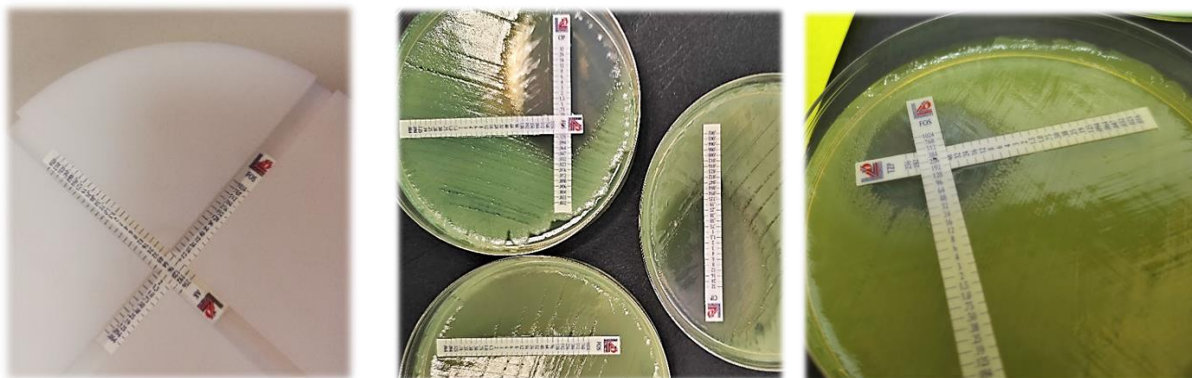
3.2.4 Ispitivanje sinergije antibiotika

Sinergija ceftazidima, piperacilin/tazobaktama, cefepima, gentamicina, amikacina, ciprofloksacina, imipenema i kolistina s fosfomicinom ispitana je metodom ukriženih trakica i „time-kill“ metodom (69,76,81).

3.2.4.1 Metoda ukriženih trakica s koncentracijskim gradijentom

Pripremljene suspenzije sojeva u koncentraciji koja odgovara zamućenju od 0,5 McFarland jedinica (koncentracija od 10^8 CFU/mL) zasijane su na MHA. Gradijent trakice s antibiotikom postavljene su pod kutom od 90° uz pomoć aplikacijskog sustava (MTS™ Synergy Application System, Liofilechem) pri čemu je mjesto križanja trakica MIK svakog antibiotika određenog zasebno, slika 12. MHA ploče su inkubirane preko noći na 36 °C. Određen je MIK antibiotika A u kombinaciji s antibiotikom B i MIK antibiotika B u kombinaciji s antibiotikom A kako bi se mogao odrediti frakcijski inhibični koncentracijski indeks (engl. *fractional inhibitory concentration index*, FICI) koji služi za opis interakcije antibiotika. FICI vrijednost definira se kao $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = MIK_A^{kombinacija} / MIK_A^{samostalno} + MIK_B^{kombinacija} / MIK_B^{samostalno}$ (69,70). FICI vrijednosti $\leq 0,5$ označavaju sinergiju, vrijednosti

od 0,5 do ≤ 1 označavaju aditivni učinak, od 1 do ≤ 4 smatraju se indiferentnim, a vrijednosti ≥ 4 antagonističkim.

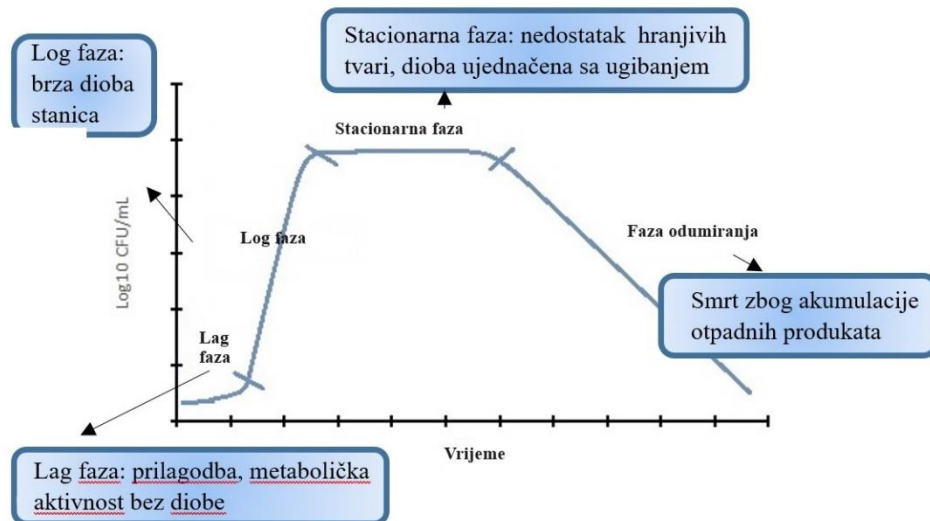


Slika 12. a) Aplikacijski sustav b) Metoda ukriženih trakica na MHA nakon 24 sata inkubacije i E-test istih antibiotika zasebno c) Metoda ukriženih trakica na MHA nakon 24 sata inkubacije

3.2.4.2 „Time-kill“ metoda

„Time-kill“, krivuljama ispitana je sinergija i baktericidna aktivnost antibiotika. „Time-kill“ istraživanje smatra se zlatnim standardom u ispitivanju sinergije (81). S obzirom na to da se radi o izrazito vremenski zahtjevnom ispitivanju, prema antimikrobnoj osjetljivosti izabrana su četiri soja na kojima je ono provedeno. Testiranje je provedeno u duplikatu. Četiri prekonoćne kulture bakterija pripremljene su za svaki izabrani soj u MHB. Kulture su prvo razrijeđene na 0,5 McFarland jedinica, a zatim u omjeru 1:100 i inkubirane 2 sata u vodenoj kupelji (GLF 1086, Gemini) uz lagano miješanje kako bi se početni inokulum podeseo na 10^6 do 10^7 CFU/mL. U trenutku kada su kulture u logaritamskoj fazi rasta, u kojoj je razmnožavanje bakterija najbrže, a osjetljivost na djelovanje antibiotika najveća, izložene su djelovanju antibiotika. U toj fazi dolazi uobičajeno do ubrzanog razmnožavanja bakterija geometrijskom

progresijom sve dok postoje hranjive tvari, a koncentracija otpadnih produkata ne naraste do vrijednosti koja ometa rast, slika 13.



Slika 13. Krivulja rasta bakterija.

Koncentracije antibiotika određene su prema vršnim serumskim koncentracijama nevezanog antibiotika prema bibliografskim podacima za cefepim, piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin, fosfomicin (96), ceftazidim (126), kolistin (11,127,128), gentamicin (129), amikacin (96,130,131) i imipenem (132). U jedan bakterijski uzorak dodan je fosfomicin (395 mg/L, Sigma Aldrich), u drugi po jedan odabrani antibiotik (Sigma Aldrich): ceftazidim (170 mg/L), piperacilin/tazobaktam (210/24 mg/L), cefepim (131 mg/L), gentamicin (9 mg/L), amikacin (38 mg/L), ciprofloksacin (2,8 mg/L), imipenem (55 mg/L) i kolistin (2,9 mg/L). U treći uzorak dodani su jedan i drugi antibiotik zajedno. S obzirom na to da je *in vitro* osjetljivost fosfomicina uvelike ovisna o prisutnosti glukoza-6-fosfata, u svaki uzorak koji je sadržavao fosfomicin dodan je glukoza-6-fosfat u konačnoj koncentraciji od 25 mg/L. Četvrti uzorak označava kontrolu rasta bez dodanog antibiotika. Pripremljena su po tri deseterostruka serijska razrjeđenja inokuluma. Alikvoti od 50 µL svakog razrjeđenja nasijani su periodično na hranjivu podlogu, MacConkey agar (Oxoid), u razmacima od po dva sata i nakon 24 sata radi određivanja broja kolonija u 1 mL. Podloge su inkubirane preko noći na 36 °C, a potom su prebrojane porasle kolonije, pomnožene s razrjeđenjem i određena je vrijednost CFU/mL.

Redukcija broja kolonija za $\geq 3 \log_{10}$ nakon 24 sata u odnosu na početnu vrijednost označava baktericidni učinak (69,76,77). Bakteriostatska aktivnost definirana je kao održavanje

izvorne koncentracije inokuluma ili smanjenje manje od 99,9 % ($< 3 \log_{10}$) ukupnog broja CFU/mL u odnosu na izvodni inokulum (78,79). Sinergija znači da će kombinacija dva antibiotika pokazivati redukciju broja kolonija za $\geq 2 \log_{10}$ nakon 24 sata u odnosu na svaki antibiotik kada se primjenjuje pojedinačno. Indiferencija je definirana kao smanjenje ili povećanje $< 2 \log_{10}$ CFU/mL nakon 24 sata, a antagonizam kao povećanje $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL nakon 24 sata u usporedbi s najjačim antibiotikom primijenjenim samostalno. Interpretacija može biti otežana s odmakom vremena kada dođe do ponovnog rasta bakterija, a najbolje se procjenjuje u prvih 12 sati (70). Postupak je rađen u duplikatu, određena je srednja vrijednost, a krivulja oporavka rasta bakterija je grafički prikazana u ovisnosti o vremenu.

3.2.5 Postantibiotički učinak

Postantibiotički učinak (PAE) je određen metodom brojanja kolonija za ista četiri izolata na kojima je provedeno „*time-kill*“ ispitivanje (102,104). Pripremljene premonoćne kulture testiranih sojeva razrijeđene su i inkubirane u vodenoj kupelji 2 sata na 37 °C uz lagano miješanje (GLF 1086, Gemini) kako bi se početni inokulum podesio na 10^6 do 10^7 CFU/mL. U logaritamskoj fazi rasta kulture su izložene djelovanju antibiotika u jednakim terapijskim koncentracijama kao i za „*time-kill*“ ispitivanje te potom ponovo inkubirane u kupelji na 37 °C uz lagano miješanje. Po završetku dvosatnog izlaganja, 2 mL kulture preneseno je u Eppendorf epruvete, a antibiotik odstranjen centrifugiranjem 3 min na 11 000 g i ispiranjem taloga sterilnom fiziološkom otopinom dva puta. Preostali talog je potom resuspendiran u 2 mL MHB i inkubiran preko noći na 37 °C u vodenoj kupelji. Oporavak rasta je praćen kroz 24 sata tako da su uzorci prikupljeni u vremenu 0, odmah nakon centrifugiranja, svaka dva sata tijekom 8 sati i nakon 24 h, pri čemu je 100 μ L uzorka razrijeđeno u fiziološkoj otopini (100 μ L kulture + 9.99 mL fiziološke otopine) kako bi se dobila razrjeđenja od 10^{-2} , 10^{-4} i 10^{-6} . Po 50 μ L svakog razrjeđenja zasijano je na krutu podlogu (MacConkey agar) radi brojenja kolonija. Ploče su inkubirane na 36 °C, a broj poraslih kolonija pomnožen je s razrjeđenjem kako bi se odredio broj kolonija u 1 mL. U svako testiranje uključen je i kontrolni uzorak koji nije bio izložen djelovanju antibiotika i određena je redukcija broja kolonija u tretiranim u odnosu na kontrolni uzorak bez antibiotika. PAE se izračunava prema formuli $PAE = T - C$, gdje T označava vrijeme potrebno da se broj kolonija u uzorcima tretiranim antibioticima poveća za 1 \log_{10} iznad vrijednosti dobivene odmah po uklanjanju antibiotika, a C označava isti vremenski interval potreban neizloženoj kontroli (104–106). Testiranje je provedeno u duplikatu. PAE od 0 – 2 sata smatra se kratkim, 2 - 4 sata umjereno dugim, a $PAE > 4$ sata produljenim (107). Kada je PAE induciran kombinacijom antimikrobnih lijekova najmanje 1 sat dulji od zbroja PAE učinka

pojedinačno primijenjenih antibiotika, kombinacija se smatrala sinergističkom. PAE sličan odnosno kraći od zbroja učinka svakog antibiotika zasebno, kategoriziran je kao aditivni odnosno antagonistički. Aditivni učinak kombinacije sličan je zbroju pojedinačnih učinaka, a indiferentni učinak kombinacije podjednak najduljem pojedinačnom učinku. Antagonistički učinak kombinirane primjene je definiran kao najmanje sat vremena kraći od najduljeg učinka samostalno primijenjenog antibiotika (133,134).

3.2.6 Ispitivanje stvaranja biofilma

Za kvantitativnu detekciju biofilma korišten je statički test u mikrotitarskim pločicama s U-dnom, a količina stvorenog biofilma određena je bojanjem kristal violetom (135). Tri do četiri kolonije prekonoćne kulture uzgojene na krvnom agaru inokulirane su u 5 mL Tryptic Soy bujona (TSB) i inkubirane 18 sati na 36 °C. Epruvete sa suspenzijama dobro su promiješane na laboratorijskoj miješalici te presađene u novi TSB u omjeru 1:100. 200 µL tako pripremljene bakterijske suspenzije nasadeno je u sterilne mikrotitarske pločice s 96 jažica s okruglim dnom i inkubirano 24 sata na 36 °C. Nakon inkubacije, medij je odstranjen, a pločica je dva puta isprana sterilnom destiliranom vodom i fiksirana sušenjem 60 minuta na 56 °C. Kako bi se biofilm obojao i vizualizirao, u svaku jažicu dodano je 250 µL boje kristal violet (Merck KGaA) na 15 minuta. Boja je potom odstranjena, a pločica ponovo nježno isprana sterilnom destiliranom vodom. Za kvantifikaciju biofilma, boja je eluirana dodavanjem 95 % etanola u svaku jažicu. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi 10 minuta kako bi se boja u potpunosti otopila. Sadržaj je pipetom nježno izmiješan i prebačen u sterilne mikrotitarske pločice s ravnim dnom. Optička gustoća (engl. *optical density*, OD) biofilma izmjerena je na spektrofotometru (Spectra II, Tecan) pri 620 nm. Postupak je rađen u tetraplikatu. Sterilni TSB je korišten kao negativna kontrola (135). Za svaki izolat i negativnu kontrolu izračunata je prosječna OD vrijednost. Za interpretaciju rezultata potrebno je odrediti graničnu vrijednost (OD_c) prema formuli $OD_c = \text{prosječan OD negativne kontrole} + (3 \times \text{standardna devijacija negativne kontrole})$. Finalna OD vrijednost izolata za klasifikaciju izračunava se oduzimanjem OD_c vrijednosti od prosječne OD vrijednosti izolata. Temeljem dobivenih vrijednosti apsorbancije, izolati su klasificirani kao jaki, umjereni, slabi ili ne-proizvođači biofilma, tablica 4.

Tablica 4. Kategorizacija izolata po proizvodnji biofilma

Apsorbancija (OD₆₂₀)	Proizvodnja biofilma
OD ≤ OD_c	nije proizvođač
OD_c < OD ≤ 2 x OD_c	slabi proizvođač
2 x OD_c < OD ≤ 4 x OD_c	umjereni proizvođač
4 x OD_c < OD	jaki proizvođač

Kratice: OD –optička gustoća, OD_c – granična vrijednost

3.2.6.1 Inhibicija stvaranja biofilma i razaranje već stvorenog biofilma

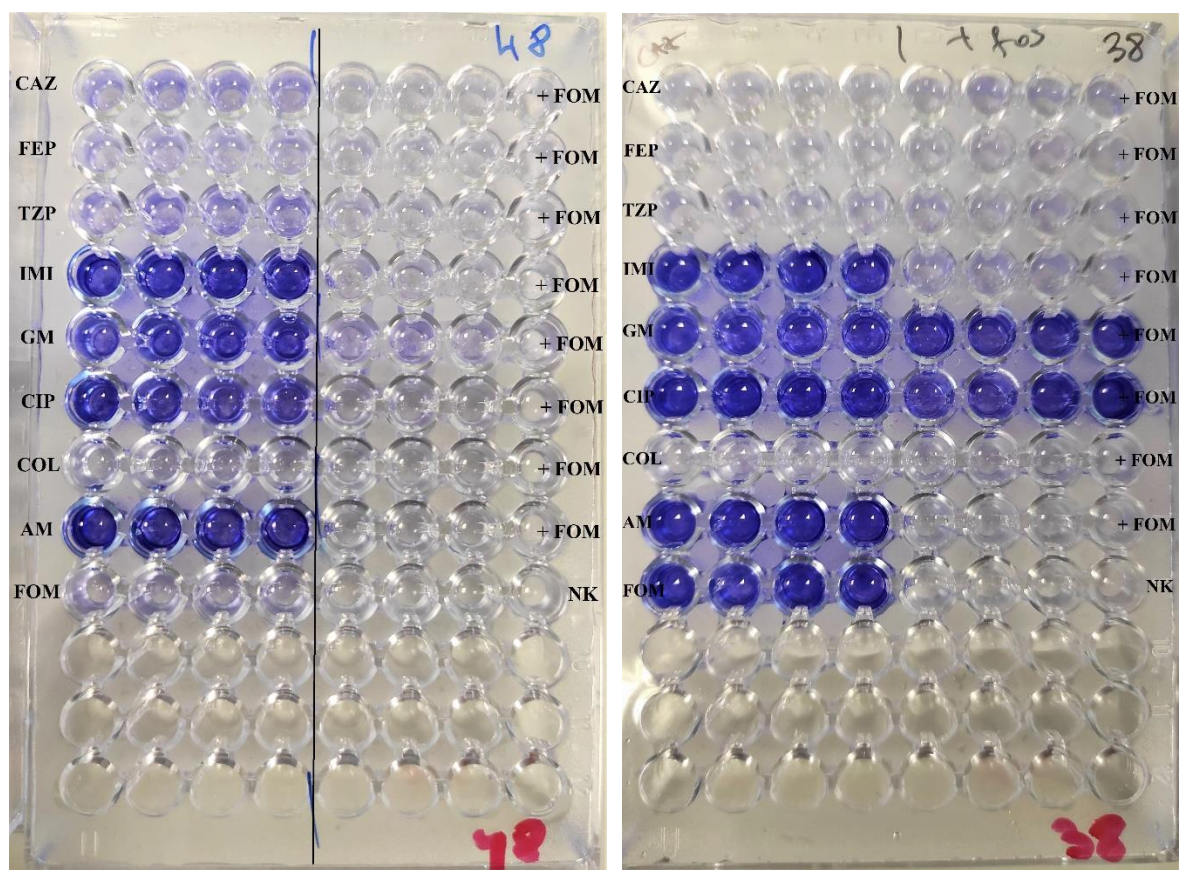
Kako bi se odredio učinak vršnih koncentracija antibiotika samostalno i u kombinaciji s fosfomicinom na biofilm, korišten je kristal violet test u mikrotitarskim pločicama (135). Korištene su vršne koncentracije antibiotika koje se postižu u plazmi, u istim koncentracijama kao i kod „*time-kill*“ metode. Tri do četiri kolonije prekonoćne kulture uzgojene na krvnom agaru inokulirane su u 5 mL triptik soja bujona (TSB) i inkubirane 18 sati na 36 °C. Epruvete sa suspenzijama dobro su promiješane na laboratorijskoj miješalici te presađene u novi TSB u omjeru 1:100.

Za test inhibicije stvaranja biofilma izabrani su najveći proizvođači biofilma: 13 jakih i 11 umjerenih proizvođača. Antibiotici, sami i u kombinaciji s fosfomicinom, dodani su u vremenu 0, u trenutku nasađivanja bakterijskih suspenzija u mikrotitarske pločice i inkubirani 24 sata na 36°C.

Kod ispitivanja učinka na prethodno stvoreni biofilm, izabrano je 8 jakih proizvođača biofilma. Bakterijske suspenzije nasađene su u sterilne mikrotitarske pločice i inkubirane 24 sata na 36 °C kao i za određivanje stvaranja biofilma. Po završetku inkubacije od 24 sata i odstranjenju planktonskih bakterija, antibiotici su dodani u mikrotitarske pločice na već formirani biofilm (136–139). Ploče su potom inkubirane 6 sati i 24 sata.

Potom je postupak fiksacije, bojanja i kvantifikacije bio isti kao i u kristal violet testu u mikrotitarskim pločicama bez antibiotika. Po završetku inkubacije, medij je odstranjen, ploče su nježno isprane sterilnom destiliranom vodom i fiksirane. Biofilm je potom obojan s 250 µL otopine kristal violeta 15 minuta, boja je odstranjena, a pločice ponovo nježno oprane sterilnom destiliranom vodom. Boja je otopljena pomoću etanola, te pipetom nježno promiješana i prebačena u mikrotitarske pločice s ravnim dnom, a optička gustoća je očitana na spektrofotometru pri 620 nm. Postupak je rađen u tetraplikatu. Sterilni TSB korišten je kao

negativna kontrola, slika 14.



Slika 14. Inhibicija stvaranja biofilma, mikrotitarska pločica nakon dodavanja etanola. Četiri jažice lijevo (E-H) - antibiotici samostalno, četiri jažice desno (A-D) antibiotici u kombinaciji sa fosfomicinom. Kratice CAZ – ceftazidim, FEP – cefepim, TZP – piperacilin/tazobaktam, IMI – imipenem, GM – gentamicin, CIP – ciprofloksacin, COL – kolistin, AM – amikacin, FOM – fosfomicin, NK – negativna kontrola

3.2.6.2 Kvantifikacija inhibicije biofilma

Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije biofilma izračunat iz srednje apsorbancije pri 620 nm za svaki izolat. Inhibicija, odnosno smanjenje biofilma, izračunati su prema sljedećoj formuli (114,140):

$$\text{Inhibicija biofilma (\%)} = \left(\frac{\text{OD negativna kontrola} - \text{OD izloženi uzorak}}{\text{OD negativna kontrola}} \right) \times 100$$

3.2.7 Statistička obrada podataka

Podaci o izolatima i rezultati ispitivanja sinergije su prikazani tablično i grafički. Statistička analiza podataka provedena je programom Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD). Pretpostavlja se da podaci prate normalnu diobu, stoga su prikazani srednjom vrijednošću i relativnim standardnim odstupanjima. Razlike između skupova podataka analizirane su χ -kvadrat testom, ANOVA metodom i t-testom. χ -kvadrat test korišten je za statističku analizu razlika u sinergiji dobivenih GDSC metodom između sojeva sa stečenim β -laktamazama i bez njih. ANOVA analizom ustanovljene su statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti redukcije bakterijskih kolonija u mililitru dobivenih „*time-kill*“ metodom. „*Time-kill*“ krivulje su prikazane su i grafički, izražene kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije dvostrukog mjerenja.

Ispitivanje stvaranja biofilma provedeno je u tetraplikatu. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama. Za utvrđivanje značajnih razlika među skupinama korišteni su Friedmanov i Wilcoxonov test rangova (engl. *Wilcoxon Signed-Rank test*) neparametrijski test. Statistička analiza provedena je SPSS programom.

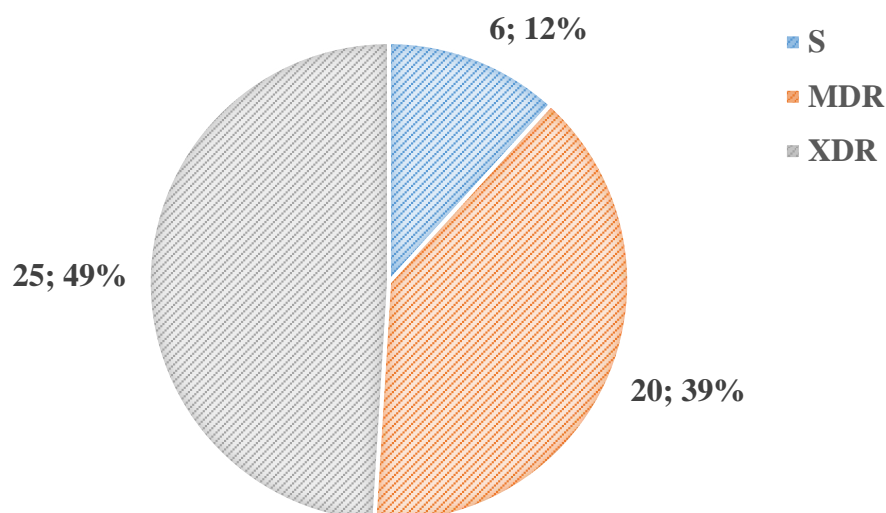
Prilikom usporedbi, svaka razlika s dobivenom P vrijednosti $\leq 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

4 REZULTATI

4.1 Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Osjetljivost izolata *P. aeruginosa* na antimikrobne lijekove je varirala. Ukupno je bilo 12 % osjetljivih (n=6) izolata (S), 39 % (n=20) višestruko otpornih izolata (MDR) i 49 % (n=25) prošireno otpornih izolata (XDR), slika 15. Niti jedan od izolata nije bio potpuno otporan (PDR). Određivanjem osjetljivosti na antimikrobne lijekove metodom mikrodilucije u bujonu najviše stope osjetljivosti zabilježene su s kolistinom, 88,2 % (n=45), zatim fosfomicinom, 47,1 % (n=24) te amikacinom, 43,1 % (n=22). Stope osjetljivosti na karbapeneme bile su ispod 20 % i to 17,6% za meropenem (n=9) i 13,7 % za imipenem (n=7). Stope osjetljivosti na preostale antimikrobne lijekove bile su sljedeće: piperacilin/tazobaktam 39,2 % (n=20), ciprofloksacin 21,6 % (n=11), cefepim 19,6 % (n=10), gentamicin 19,6 % (n=10), ceftazidim 11,8 % (n=6), tablica 5. Ukupno 53,8 % VIM pozitivnih sojeva bilo je osjetljivo na fosfomicin (n=14).

MIK₅₀ odgovarao je interpretaciji osjetljiv (S) kod kolistina i umjereno osjetljiv (I) kod amikacina i piperacilin/tazobaktama, dok je za sve ostale antimikrobne lijekove pripao kategoriji otporan (R). MIK₉₀ za sve antibiotike pripadao je kategoriji otporan (R). Raspon MIK-a testiranih antibiotika, MIK medijan, MIK₅₀ i MIK₉₀ za testirane izolate prikazani su u tablici 5.



Slika 15. Grafički prikaz raspodjele fenotipova rezistencije analiziranih izolata *P. aeruginosa*. Kratice: S: osjetljivi, MDR, višestruko otporni, XDR: prošireno otporni izolati

Tablica 5. Učinkovitost testiranih antibiotika prema izolatima *P. aeruginosa* testiranih mikrodilucijskom metodom, raspon MIK-a, MIK₅₀, MIK₉₀ za testirane izolate

Antibiotik	MIK raspon	MIK medijan	% osjetljivih izolata	MIK₅₀	MIK₉₀
FOM	2 - ≥128	64	47,1	128	≥128
CAZ	4 - ≥128	32	11,8	64	≥128
TZP	2 - ≥128	24	39,2	32	≥128
FEP	1 - ≥128	32	19,6	32	≥128
GM	1 - ≥128	8	19,6	≥128	≥128
AMI	1 - 128	32	43,1	32	128
CIP	0,06 - ≥128	32	21,6	32	≥128
IMI	0,5 - ≥128	16	13,7	32	≥128
MEM	0,12 - ≥128	16	17,6	16	≥128
COL	1 - 4	2	88,2	2	4

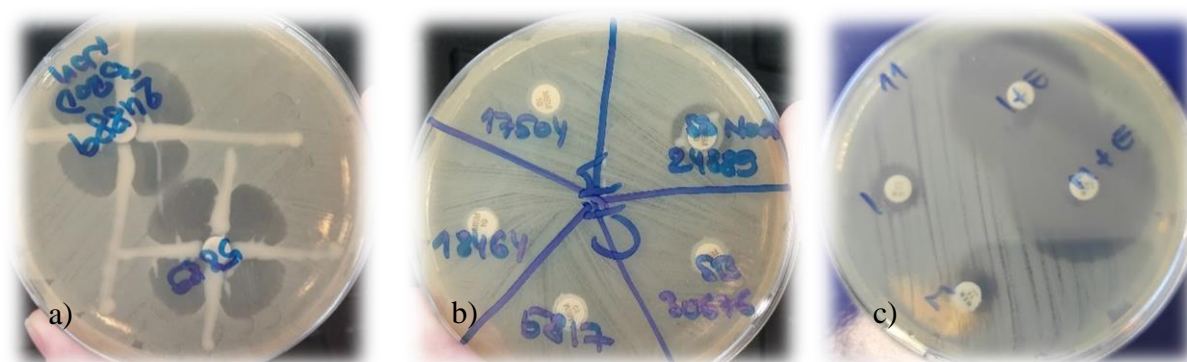
Kratice: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), piperacilin/tazobaktam (TZP), cefepim (FEP), gentamicin (GM), amikacin (AMI), ciprofloksacin (CIP), imipenem (IMI), meropenem (MEM), kolistin (COL)

4.2 Detekcija β-laktamaza fenotipskim metodama

Provedena su fenotipska ispitivanja na hiperekspresiju kromosomske AmpC β-laktamaze i prisustvo karbapenemaza.

Hiperekspresija AmpC dokazana je kod 7,8 % (4/51) izolata. Svi izolati s hiperekspresijom AmpC bili su višestruko otporni. Za fenotipski dokaz prisustva karbapenemaza prije provođenja molekularnih testiranja, provedeni su modificirani Hodge test, metoda inaktivacije karbapenema i metoda kombiniranog diska za detekciju metalo-β-laktamaza, slika 16. Pozitivan nalaz modificiranog Hodge testa s deformiranom zonom inhibicije koja nalikuje listu djeteline imalo je ukupno je 54,9 % (28/51) izolata. Kod istih izolata zabilježen je i pozitivan CIM test, što također ukazuje na proizvodnju karbapenemaza.

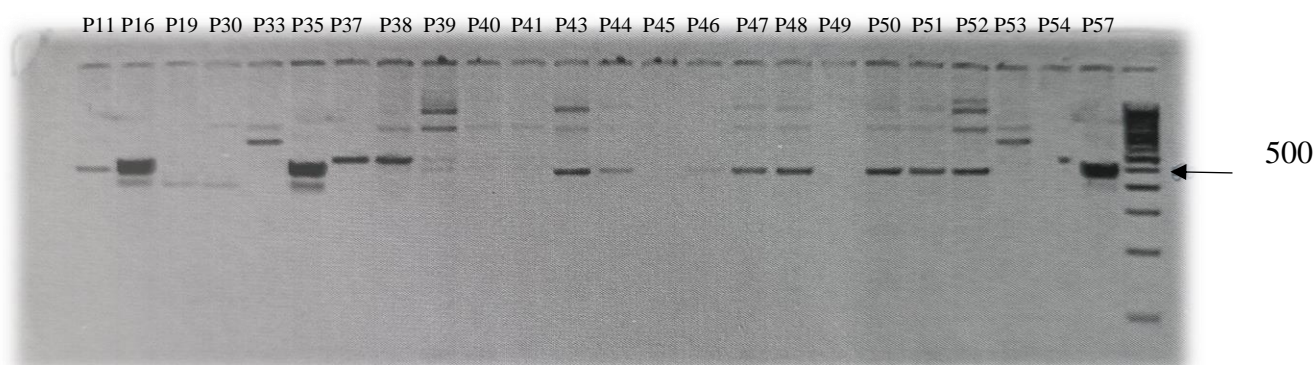
U 58,8 % (30/51) izolata također je bio pozitivan kombinirani test diska s EDTA testom koji ukazuje na prisutnost metalo- β -laktamaza, tablica 6.



Slika 16. Fenotipske metode detekcije karbapenemaza: pozitivan modificirani Hodge test: vidljive zone inhibicije u obliku lista djeteline, izolati P41 i P43 (a); metoda inaktivacije karbapenema: gubitak zone inhibicije oko diska meropenema, izolati P35, P40, P41, P44, P47 (b); metoda kombiniranog diska desno: diskovi imipenema i meropenema bez nakapane EDTA, sa uskim zonama inhibicije, i uz dodatak EDTA, sa proširenim zonama inhibicije, izolat P11 (c);

4.3 Molekularna detekcija gena rezistencije

Reakcijom lančane polimeraze ispitano je prisustvo gena rezistencije na β -laktamske antibiotike: *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{IMP}. Metalo- β -laktamaza VIM identificirana je u 51 % (26/51) izolata, pri čemu je kod 19 izolata dokazana PCR postupkom i vizualizirana u agaroznom gelu bojenjem etidijevim bromidom, slika 17. Dodatno je još sedam izolata bilo pozitivno na *bla*_{VIM-2}, a dva izolata na *bla*_{PER-1} β -laktamazu proširenog spektra, čije je prisustvo dokazano u prijašnjim studijama (58,122). Jedan izolat sadržavao je oba gena, VIM-2 i PER-1, tablica 6. Geni za β -laktamaze NDM i IMP nisu detektirani.



Slika 17. Amplifikacija gena *bla*_{VIM}. Fotografija agaroznog gela koja prikazuje produkt, ampikon gena *bla*_{VIM} za izolate redom od lijeva na desno: P11, P16, P19, P30, P33, P35, P37, P38, P39, P40, P41, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P57.

P44, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54. Zadnja linija izolat P57, koji je ujedno pozitivna kontrola.

Tablica 6. Fenotip rezistencije, detekcija i identifikacija β -laktamaza kod prikupljenih izolata *P. aeruginosa*

Izolati	MIK ($\mu\text{g/mL}$) ^a										Kategorija ^b	AmpC ^c	CIM ^d	HODGE ^d	CD ^d	bla genotip ^e
	FOM	CAZ	FEP	TZP	IMI	MEM	GM	CIP	COL	AM						
P1	128	64	32	128	128	>128	>128	32	1	8	XDR	-	+	+	+	VIM
P2	>256	>128	>128	>128	64	32	>128	64	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P3	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
P4	128	128	32	32	128	>128	>128	32	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P5	128	128	16	64	128	>128	1	2	1	2	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P6	>256	64	32	64	128	>128	32	64	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P7	256	64	32	128	128	>128	32	32	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P8	64	32	16	64	128	>128	32	32	1	32	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P9	128	64	32	32	32	>128	32	32	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P10	128	4	1	2	4	0,5	4	0,12	2	2	S	-	NT	NT	NT	NT
P11	8	>128	32	>128	>128	>128	>128	>128	1	2	MDR	+	+	+	+	VIM
P12	32	>128	32	32	128	>128	16	64	1	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P14	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P15	128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P16	16	64	32	64	>128	>128	8	>128	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
P17	128	32	16	16	32	16	>128	2	2	16	MDR	-	+	+	+	VIM
P18	>128	16	16	32	>128	16	8	2	4	4	XDR	-	+	+	+	VIM

P19	32	>128	32	>128	>128	16	>128	16	2	4	MDR	+	-	-	+	-
P22	>256	32	16	16	1	4	2	2	2	1	MDR	+	-	-	NT	NT
P23	64	4	4	8	2	1	>128	32	2	64	S	-	NT	NT	NT	NT
P24	128	4	2	2	2	0,12	2	0,12	2	4	S	-	NT	NT	NT	NT
P25	64	4	2	8	2	0,25	>128	0,06	2	8	S	-	NT	NT	NT	NT
P26	128	8	2	2	4	2	2	0,06	2	1	S	-	NT	NT	NT	NT
P27	128	16	32	16	8	1	256	0,5	2	8	MDR	+	-	-	NT	NT
P28	128	64	4	8	4	4	4	0,25	2	8	MDR	-	-	-	NT	NT
P29	128	8	16	16	2	1	>128	>128	2	128	MDR	-	-	-	NT	NT
P30	64	32	32	16	16	16	>128	>128	2	4	MDR	-	-	-	NT	-
P32	64	16	4	32	4	1	8	0,5	2	8	MDR	-	-	-	NT	NT
P33	128	16	16	16	32	16	8	2	2	4	MDR	-	-	-	+	-
P35	64	128	64	32	>128	64	>128	128	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P36	32	>128	32	16	4	64	2	32	2	16	MDR	-	-	-	+	-
P37	64	32	8	16	16	16	32	32	4	32	MDR	-	-	-	NT	-
P38	64	>128	32	128	16	16	>128	32	2	32	XDR	-	-	-	NT	-
P39	128	>128	32	16	16	16	32	64	2	64	MDR	-	-	-	NT	-
P40	128	64	32	16	16	16	>128	64	2	64	MDR	-	+	+	NT	-
P41	>128	64	16	16	8	16	64	64	2	32	MDR	-	+	+	NT	-
P43	4	>128	>128	>128	16	16	>128	64	4	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P44	4	>128	64	>128	64	16	>128	64	4	32	XDR	-	+	+	+	VIM

P45	64	64	16	32	16	16	8	0,5	2	8	MDR	-	-	-	NT	-
P46	2	128	64	256	16	16	>128	64	4	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P47	4	>128	>128	>128	128	32	>128	128	1	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P48	2	>128	64	>128	64	8	>128	128	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P49	64	16	16	32	32	8	4	0,5	1	8	MDR	-	-	-	+	-
P50	4	>128	>128	>128	64	16	>128	64	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P51	4	>128	>128	256	64	32	>128	64	4	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P52	16	>128	64	>128	32	16	>128	64	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
B53	>128	64	32	16	32	16	>128	2	2	16	MDR	-	-	-	NT	-
P54	>128	16	8	8	16	16	4	0,125	2	16	MDR	-	-	-	NT	-
P55	>128	128	8	16	2	4	4	0,5	2	2	S	-	-	-	NT	NT
P56	>128	>256	>256	64	0,5	1	>256	64	2	64	MDR	-	-	-	NT	PER-1
P57	>128	>256	128	64	128	64	>256	64	2	128	XDR	-	+	+	+	PER-1, VIM-2

^aMIK određen metodom mikrodilucije u bujonu, osim za fosfomicin gdje je korištena metoda agar dilucije. MIK FOM ≤ 64 µg/mL smatra se osjetljivim, MIC FOM > 64 µg/mL otpornim

^bS (engl. *susceptible*): osjetljivi izolati, MDR (višestruko otporni, engl. *multidrug resistant*): ne-osjetljivi na ≥ 1 lijek u ≥ 3 klasa antibiotika, XDR (prošireno otporni, engl. *extensively drug-resistant*): ne osjetljivi na ≥ 1 lijek u svima osim ≤ 2 klase antibiotika

^bHiperekspresija AmpC

^dCIM, HODGE i CD ispitivanje provedeno je na izolatima sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme

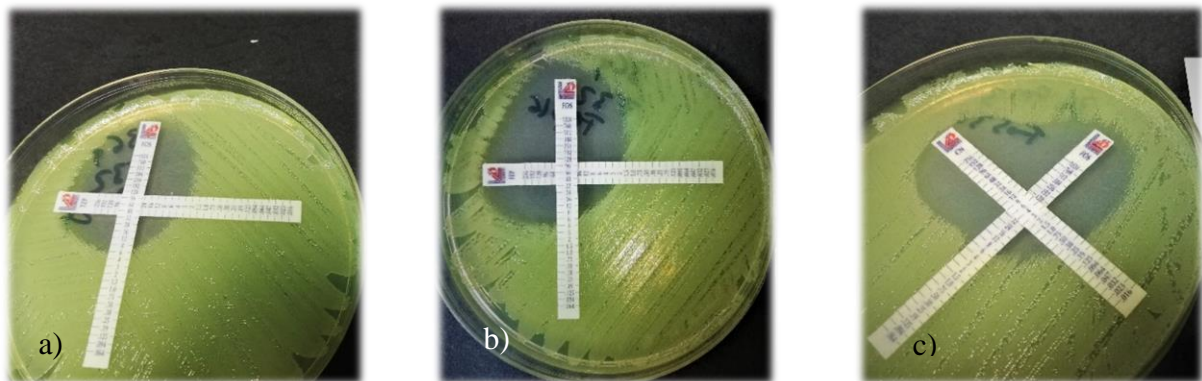
^eIspitano na prisustvo *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{IMP} gena za karbapenemaze PCR metodom

Kratice: AmpC: AmpC disk test s fenilboroničnom kiselinom, CIM: test inhibicije karbapenemaze, HODGE: modificirani Hodge test, CD: kombinirani disk test s EDTA za detekciju MBL-a, NT - nije ispitano, '-' negativan rezultat, '+' pozitivan rezultat. Kratice lijekova: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), meropenem (MEM), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AM)

4.4 Ispitivanje sinergije

4.4.1 Metoda ukriženih trakica

Kako bi se odredilo međudjelovanje antibiotika, svi su sojevi ispitani metodom ukriženih trakica, slika 18. Najveća stopa sinergije postignuta je za kombinaciju fosfomicina s ceftazidimom (21,6 %, n=11), nakon čega je slijedila kombinacija s gentamicinom (17,7 %, n=9). Drugim kombinacijama dobivene su niske stope sinergije, na primjer ciprofloksacin (9,8 %, n=5), piperacilin/tazobaktam (7,8 %, n=4), cefepim (7,8 %, n=4), amikacin (5,9 %, n=3) i imipenem (5,9 %, n=3). U kombinaciji s kolistinom, sinergija nije uočena, tablica 7. Aditivni učinak uočen je uglavnom za kombinacije s ceftazidimom (45,1 %, n=23) i gentamicinom (43,1 %, n=22). Uočene su visoke stope indifferencije u kombinaciji s kolistinom (88,2 %, n=45). U ovom ispitivanju antagonizam nije uočen, tablica 7.



Slika 18. Prikaz interakcija antibiotika ispitivanjem sinergije metodom ukriženih trakica na izolatu P36. Gradijent trakice su postavljene pod pravim kutom, pri čemu je mjesto križanja trakica MIK svakog antibiotika dobivenog E-testom zasebno. Slika lijevo prikazuje rezultat interakcija fosfomicina (MIK=32 mg/L) s piperacilin/tazobaktamom (MIK=24 mg/L), pri čemu su dobivene nove vrijednosti fosfomicina (MIK=8 mg/L) i piperacilin/tazobaktama (MIK=6 mg/L) (a). Slika u sredini prikazuje rezultat interakcije fosfomicina s cefepimom (MIK=16 mg/L) i dobivene nove MIK vrijednosti fosfomicina (MIK=6 mg/L) i cefepima (MIK=3 mg/L) (b), a slika desno interakciju fosfomicina s gentamicinom (MIK=3 mg/L) i dobivene nove MIK vrijednosti fosfomicina (MIK=8 mg/L) i gentamicina (MIK=3 mg/L) (c). Izračunate FICI vrijednosti za ove interakcije iznosile su $\leq 0,5$ i označavaju sinergiju.

Tablica 7. Stope interakcija testiranih antibiotika s fosfomicinom dobivene metodom ukriženih trakica

Kombinacija antibiotika	Broj izolata, n (%)			
	SIN ($\leq 0,5$) ^a	AD ($> 0,5 \leq 1$) ^a	IND ($> 1 \leq 4$) ^a	ANT (> 4) ^a
CAZ+FOM	11 (21,57 %)	23 (45,10 %)	17 (33,33 %)	0
FEP+FOM	4 (7,84 %)	18 (35,29 %)	29 (56,86 %)	0
PTZ+FOM	4 (7,84 %)	15 (29,41 %)	32 (62,75 %)	0
GM+FOM	9 (17,65 %)	22 (43,13 %)	20 (39,22 %)	0
AM+FOM	3 (5,88 %)	15 (29,41 %)	33 (64,71 %)	0
CIP+FOM	5 (9,80 %)	16 (31,37 %)	30 (58,82 %)	0
IMI+FOM	3 (5,88 %)	15 (29,41 %)	33 (64,70 %)	0
COL+FOM	0 (0 %)	6 (11,76 %)	45 (88,23F %)	0

^a Frakcijski inhibitorni koncentracijski indeks (FICI)

Kratice: fosfomicin (FOM), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), ciprofloksacin (CIP), ceftazidim (CAZ), gentamicin (GM), kolistin (COL) amikacin (AM); SIN - sinergija, AD – aditivni učinak, IND – indiferentni učinak, ANT – antagonizam

Nije uočena statistički značajna razlika u sinergiji između izolata sa stečenim β -laktamazama i bez njih kao što je prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Usporedba rezultata dobivenih metodom ukriženih trakica između izolata s dokazanim stečenim mehanizmima rezistencije i bez njih

Kombinacija atb	β L + (broj izolata, n)				β L - (broj izolata, n)				p
	SIN	AD	IND	ANT	SIN	AD	IND	ANT	
	($\leq 0,5$) ^a	($> 0,5 \leq 1$) ^a	($> 1 \leq 4$) ^a	(> 4) ^a	($\leq 0,5$) ^a	($> 0,5 \leq 1$) ^a	($> 1 \leq 4$) ^a	(> 4) ^a	
CAZ+FOM	5	13	12	0	6	10	5	0	0,400
FEP+FOM	3	12	15	0	1	6	14	0	0,474
PTZ+FOM	3	8	19	0	1	7	13	0	0,732
GM+FOM	6	12	12	0	3	10	8	0	0,816
AM+FOM	3	11	16	0	0	4	17	0	0,051
CIP+FOM	1	9	20	0	4	7	10	0	0,141
IMI+FOM	2	8	20	0	1	7	13	0	0,858
COL+FOM	0	4	26	0	0	2	19	0	0,678

^a Frakcijski inhibitorni koncentracijski indeks (FICI)

Kratice: ATB – antibiotik, β L+: sojevi s dokazanom stečenom β -laktamazom (VIM, PER, AmpC hiperekspresija), β L -: sojevi bez dokazne stečene β -laktamaze, p – „p“ vrijednost izračunata χ -kvadrat testom

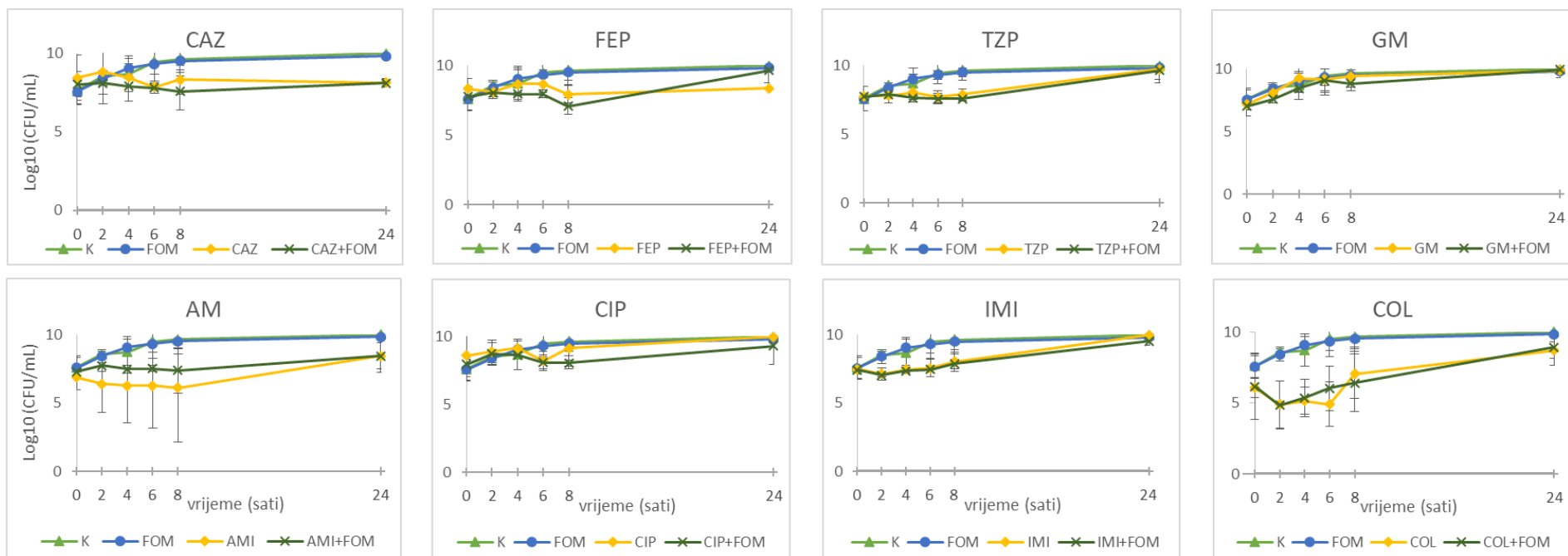
Kratice lijekova: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AM)

U ovoj studiji uočen je učinak redukcije MIK-a fosfomicina. Ceftazidim, gentamicin, cefepim, amikacin, imipenem, piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin i kolistin snizili su MIK fosfomicina za najmanje jedno razrjeđenje u 68,6 % (n=35), 62,7 % (n=32), n=29 % , 41,2 % (n=21), 41,2 % (n=21), 37,3 % (n=19), 37,3 % (n=19) i 27,5 % (n=14) izolata, redom. Od 26 sojeva otpornih na fosfomicin, promjena kategorije u osjetljive uočena je u 53,8 % (n=14) s gentamicinom, 50 % (n=13) s imipenemom i ceftazidimom, 46,2 % (n=12) s cefepimom, 42,3 % (n=11) s piperacilinom/tazobaktamom, 38,5 % (n=10) s amikacinom i 34,6 % (n=9) s ciprofloksacinom i kolistinom.

4.4.2 „Time-kill“ metoda

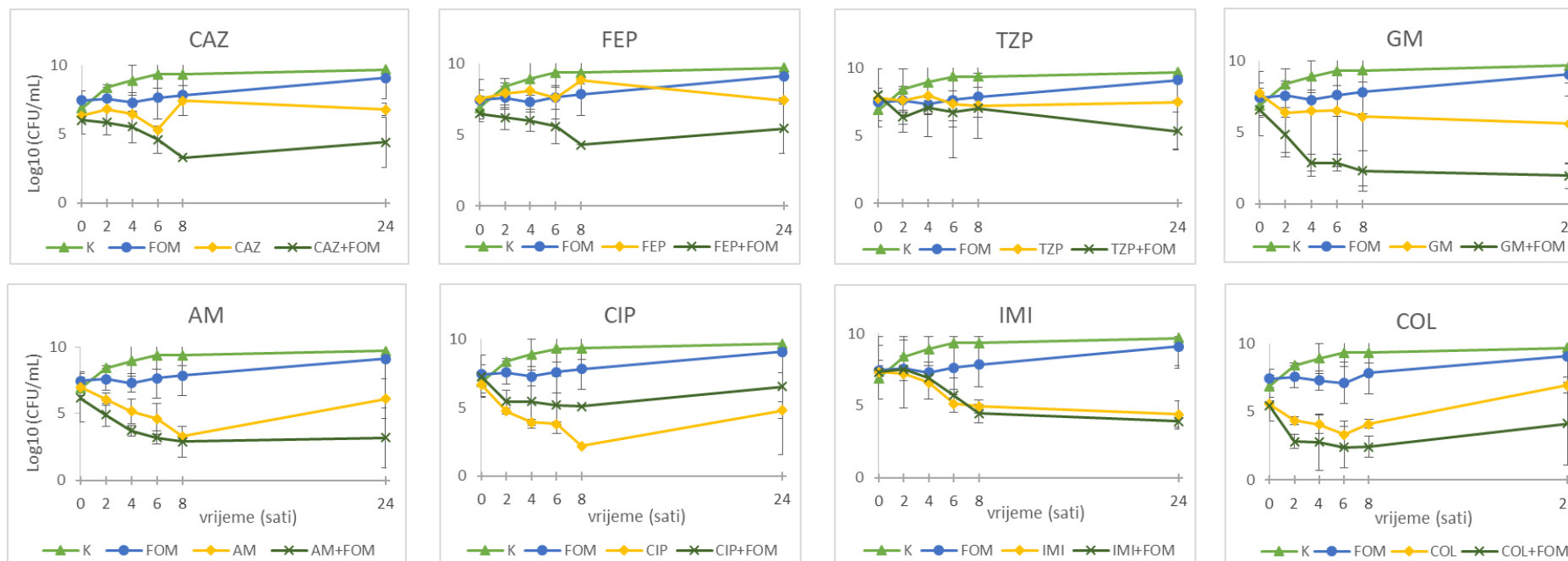
„Time-kill“ metodom ispitano je djelovanje antibiotika samostalno i u kombinaciji kod četiri izolata *P. aeruginosa*. Za ispitivanje su odabrana četiri izolata, prema fenotipu rezistencije, prisustvu MBL i rezultatima dobivenima metodom ukriženih trakica: P14 - VIM pozitivan XDR izolat, P32 i P45 - MDR izolati bez otkrivenih karbapenemaza, i P36 - MDR izolat kod kojeg je metodom ukriženih trakica sinergija registrirana u pet kombinacija s fosfomicinom (s ceftazidimom, cefepimom, piperacilin/tazobaktamom, gentamicinom i ciprofloksacinom).

Kod XDR izolata *P. aeruginosa* P. 14 pozitivnog na VIM MBL nisu opažene značajne razlike u „time-kill“ kinetici primjenom antibiotika samih i u kombinaciji s fosfomicinom. Nisu uočene ni sinergističke ni antagonističke interakcije. Štoviše, nije uočen nikakav baktericidni učinak kao što je prikazano na slici 19.



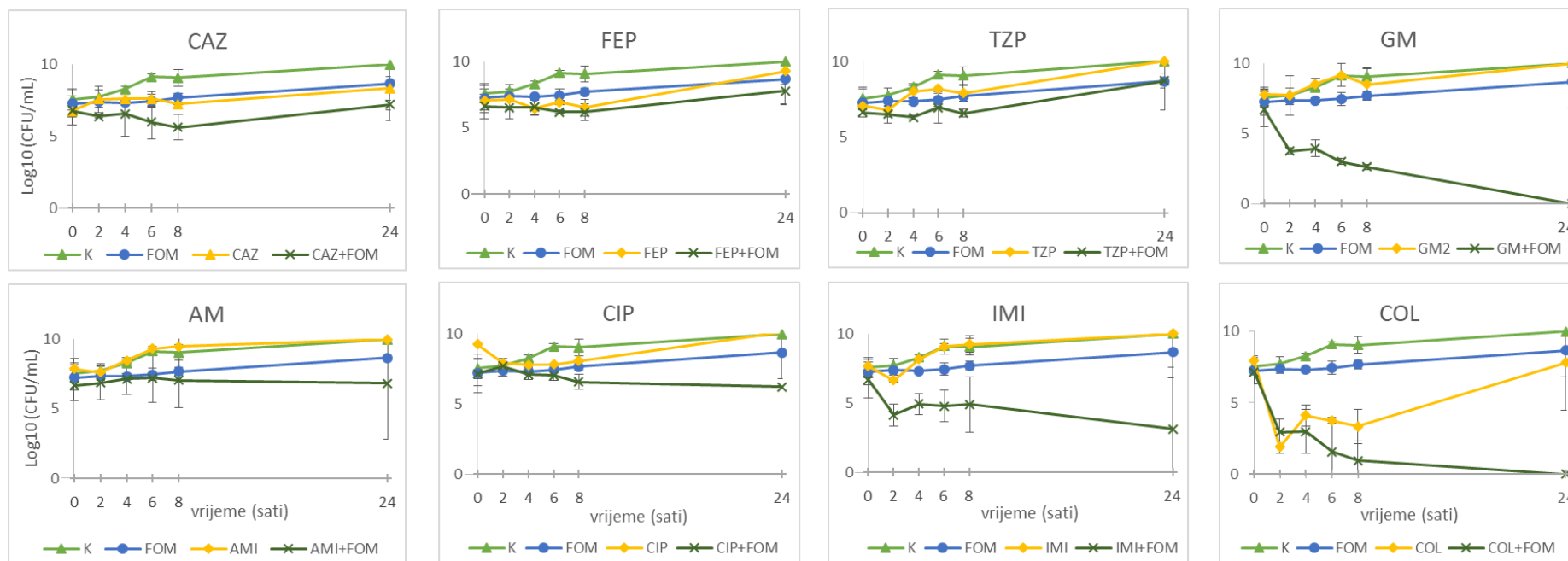
Slika 19. „Time-kill“ kinetika izolata P14 u vremenu, grafički prikaz. Kratice: kontrola (K), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AMI). Prikazani intervali pogrešaka predstavljaju standardne devijacije dvostrukih određivanja.

Kod *P. aeruginosa* P32 s MDR fenotipom ali bez dokazane stečene karbapenemaze, uočeno je smanjenje od $> 2 \log_{10}$ CFU/mL nakon 24 sata kod kombinacija s kolistinom, amikacinom, piperacilin/tazobaktamom, gentamicinom i ceftazidimom u odnosu na primjenu svakog od navedenih antibiotika zasebno, što ukazuje na sinergiju. Najizraženiji i najbrži sinergistički i baktericidni učinak, u odnosu na pojedinačni antibiotik, zabilježen je u kombinaciji s gentamicinom, već nakon 4 sata. Baktericidni učinak je primijećen i u kombinaciji s kolistinom nakon 6 sati, amikacinom samim i u kombinaciji nakon 8 sati, te ciprofloksacinom nakon 8 sati, no ponovni rast dogodio se nakon 24 sata, slika 20. Sinergija je zabilježena kod pet antimikrobnih kombinacija, a statističkom analizom potvrđena je za kombinacije s piperacilin/tazobaktamom, gentamicinom i amikacinom.



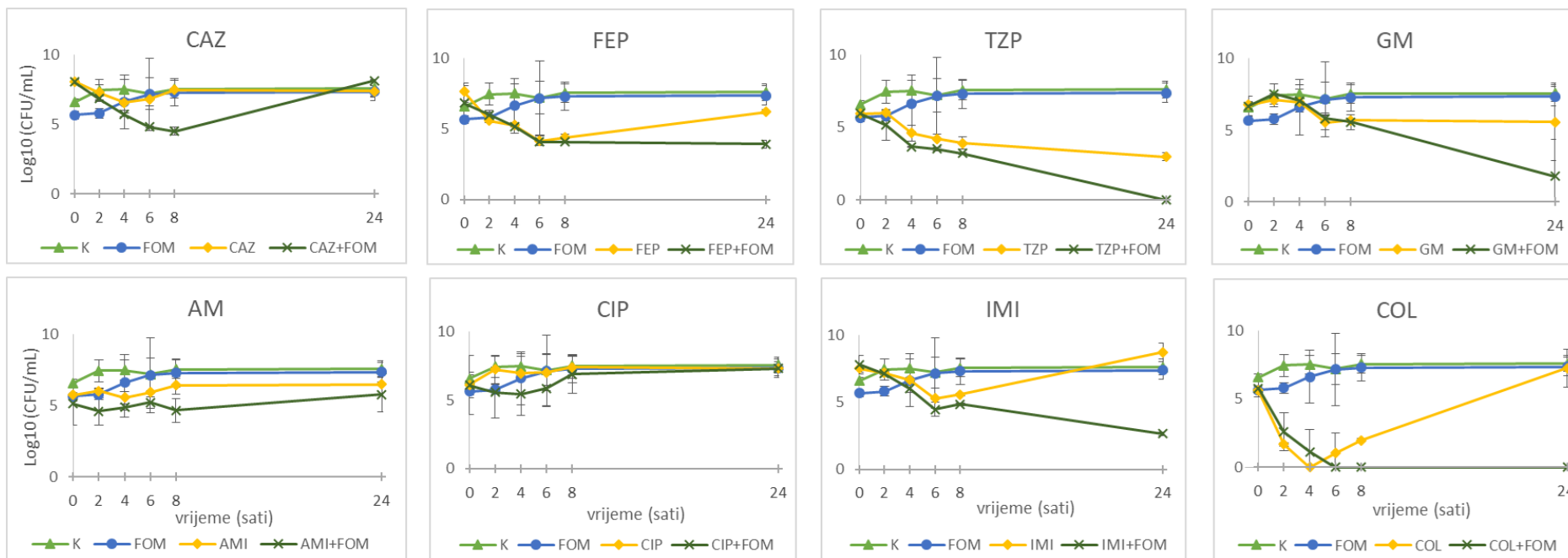
Slika 20. „Time-kill“ kinetika izolata P32 u vremenu, grafički prikaz. Kratice: kontrola (K), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AMI). Prikazani intervali pogrešaka predstavljaju standardne devijacije dvostrukih određivanja.

Ispitivanjem „*time-kill*“ kinetike MDR izolata P36 zabilježen je sinergistički učinak u kombinacijama s gentamicinom, ciprofloksacinom, imipenemom i kolistinom. Kod kombinacija s gentamicinom i imipenemom sinergija je uočena već nakon 2 sata. Baktericidni učinak je uočen u kombinaciji s imipenemom nakon 24 sata, a primjenom kolistina samostalno i u kombinaciji primijećen je već nakon 2 sata. Pri samostalnoj primjeni kolistina nakon 24 sata dolazi do proliferacije bakterija, dok ista izostaje primjenom kolistina u kombinaciji. Ponovna proliferacija bakterija nakon 24 sata nije detektirana ni u kombinaciji s gentamicinom, a baktericidni učinak navedene kombinacije postignut je nakon 6 sati. Značajne razlike nisu zabilježene kod kombinacija s amikacinom, cefepimom, ceftazidimom i piperacilinom/tazobaktamom, slika 21. Statističkom analizom potvrđena je sinergija u kombinacijama s gentamicinom i kolistinom.



Slika 21. „Time-kill“ kinetika izolata P36 u vremenu, grafički prikaz. Kratice: kontrola (K), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AMI). Prikazani intervali pogrešaka predstavljaju standardne devijacije dvostrukih određivanja.

Smanjenje od 2 log₁₀ CFU/ml nakon 24 sata zabilježeno je kod ispitivanja *P. aeruginosa* P45 s MDR fenotipom za kombinacije s cefepimom, piperacilinom/tazobaktamom, gentamicinom, imipenemom i kolistinom. Kombinacije s cefepimom, piperacilinom/tazobaktamom i kolistinom su statistički značajne. Baktericidno djelovanje uočeno je u kombinaciji s imipenemom nakon 6 sati i gentamicinom nakon 24 sata. Kombinacije s piperacilinom/tazobaktamom rezultirale su baktericidnim učinkom bez vidljivog porasta nakon 24 sata, dok je isti učinak registriran u kombinaciji s kolistinom već nakon 8 sati, bez bakterijske reproduliferacije nakon 24 sata. Baktericidni učinak samog kolistina registriran je nakon 4 sata, ali je došlo do ponovnog porasta bakterija nakon 24 sata. Sinergistički učinak uočen je u kombinaciji s ceftazidimom nakon 6 sati, ali se ponovni rast dogodio nakon 24 sata. Kod kombinacija s ciprofloksacinom i amikacinom nisu uočene značajne razlike u „*time-kill*“ kinetici, slika 22.



Slika 22. „Time-kill“ kinetika izolata P45 u vremenu, grafički prikaz. Kratice: kontrola (K), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL), amikacin (AMI). Prikazani intervali pogrešaka predstavljaju standardne devijacije dvostrukih određivanja.

Prema dobivenim rezultatima, kombinacije s gentamicinom i kolistinom uglavnom su rezultirale sinergijom i pokazale snažan baktericidni učinak nakon 24 sata. Snažan baktericidni učinak uočen je i u kombinacijama s imipenemom.

Dvije različite metode ispitivanja sinergije pokazale su različite razine korelacije. Podudaranje je uočeno kod jednog od četiri izolata u kombinaciji s ceftazidimom, piperacilinom/tazobaktamom, imipenemom i kolistinom, dva od četiri izolata u kombinaciji s gentamicinom, a najviše u kombinaciji s cefepimom, amikacinom i ciprofloksacinom u tri od četiri izolata, tablica 9. Treba napomenuti da metodom ukriženih trakica možemo odrediti aditivni učinak, koji nije procijenjen TK metodom, čime se u određenoj mjeri može objasniti nepodudarnost rezultata.

Tablica 9. Usporedba rezultata dobivenih ispitivanjem sinergije metodom ukriženih trakica (FICI) i „time-kill“ metodom (ΔLOG_{10})

		CAZ+FOM		FEP+FOM		TZP+FOM		GM+FOM	
P14	FICI	2,00	IND	2,00	IND	2,00	IND	2,00	IND
	ΔLOG_{10}	-0,03	IND	1,31	IND	-0,11	IND	0,12	IND
P32	FICI	2,00	IND	1,67	IND	1,17	IND	0,82	AD
	ΔLOG_{10}	-2,38	SYN	-1,99	IND	-2,13	SYN	-3,68	SIN
P36	FICI	0,31	SIN	0,38	SIN	0,42	SIN	0,42	SIN
	ΔLOG_{10}	-1,11	IND	-0,88	SIN	0,04	IND	-8,68	SIN
P45	FICI	0,83	AD	0,63	AD	1,50	IND	0,71	AD
	ΔLOG_{10}	0,79	IND	-2,27	SIN	-2,97	SIN	-3,78	SIN

		AM+FOM		CIP+FOM		IMI+FOM		COL+FOM	
P14	FICI	2,90	IND	2,00	IND	0,75	AD	3,00	IND
	ΔLOG_{10}	0,01	IND	-0,51	IND	-0,30	IND	0,20	IND
P32	FICI	1,00	AD	1,01	IND	2,00	IND	1,17	IND
	ΔLOG_{10}	-2,92	SIN	1,74	IND	-0,51	IND	-2,81	SYN
P36	FICI	2,38	IND	0,31	SIN	0,50	AD	2,00	IND
	ΔLOG_{10}	-1,83	IND	-2,42	SIN	-5,52	SIN	-7,83	SIN
P45	FICI	1,25	IND	0,38	SIN	0,71	AD	1,35	IND
	ΔLOG_{10}	-0,70	IND	0,03	IND	-4,71	SIN	-7,25	SIN

Kratice: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), gentamicin (GM), amikacin (AMI), ciprofloksacin (CIP), imipenem (IMI), kolistin (COL)

4.5 Postantibiotički učinak

Vrijednosti PAE određene su za iste izolate koji su korišteni za „time-kill“ ispitivanje. Kratki PAE zabilježen je primjenom fosfomicina kod svih testiranih izolata. Vrijednosti PAE prikazane su u tablici 10.

Kratak PAE u rasponu od 0,15 do 0,99 sati opažen je primjenom imipenema, a najduži učinak u trajanju do 4,45 sati registriran je primjenom ciprofloksacina. Kombinacije s

fosfomicinom uglavnom su produljile PAE. Produljenje učinka od kratkog do umjerenog PAE uočeno je kod jednog od četiri izolata s imipenemom, amikacinom i gentamicinom. U kombinaciji s kolistinom učinak je produljen od umjerenog do produženog kod pola izolata. Najdulji PAE registriran je u kombinaciji s ciprofloksacinom (> 6 sati).

PAE sinergija zabilježena je kod jedne od četiri kombinacije s kolistinom, dok su druge tri kombinacije rezultirale aditivnim učinkom. Kombinacije s gentamicinom, ciprofloksacinom i imipenemom rezultirale su aditivnim učinkom, odnosno indiferentnošću u polovici izolata. Sve kombinacije s amikacinom pokazale su indiferentni učinak.

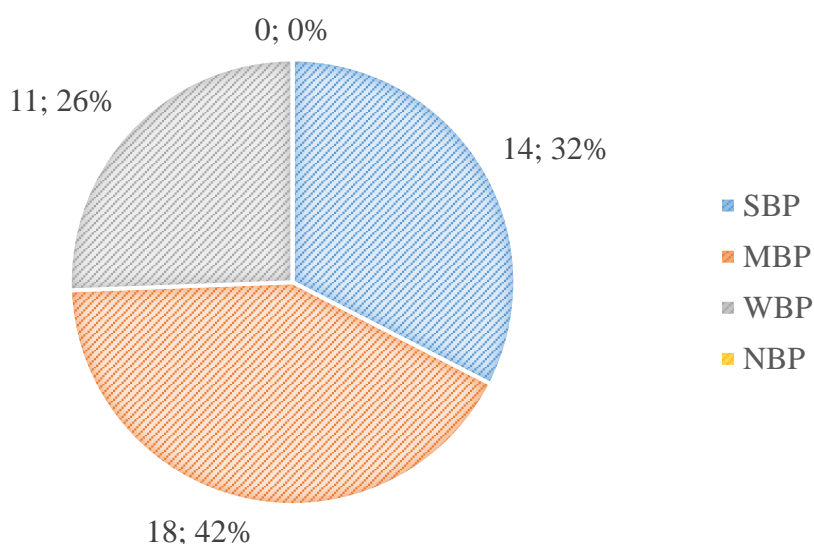
Tablica 10. PAE vrijednosti za izolate *P. aeruginosa* P14, P32, P45 i P36 kod primjene fosfomicina samog i u kombinaciji s drugim antibioticima, izražene u satima

	FOM	GM	GM+FOM	AM	AM+FOM	CIP	CIP+FOM	IMI	IMI+FOM	COL	COL+FOM
P14	0,79	0,44	1,96	0,44	0,58	0,24	0,46	0,15	0,90	1,10	1,69
P32	1,31	2,03	2,15	2,44	2,04	2,03	3,47	0,99	1,07	3,24	4,68
P45	1,20	0,19	1,05	2,33	2,17	4,45	6,06	0,83	1,38	2,03	5,50
P36	1,15	0,81	2,59	1,82	2,12	0,52	0,42	0,75	2,23	2,28	3,67

Kratice: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), gentamicin (GM), amikacin (AMI), ciprofloksacin (CIP), imipenem (IMI), kolistin (COL)

4.6 Detekcija biofilma

Prema rezultatima ispitivanja biofilma u mikrotitarskim pločicama svi ispitani sojevi (n=43) bili su proizvođači biofilma. Od 43 ispitana izolata, 32,6 % (n=14) bili su jaki proizvođači biofilma, 41,9 % (n=18) su bili srednji proizvođači biofilma, a 25,6 % (n=11) su bili slabi proizvođači biofilma, slika 23. Ispitivanje je provedeno na sljedećim izolatima: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P11, P12, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P27, P28, P29, P30, P33, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P43, P44, P45, P46, P47, P48, P49, P50, P51, P52, P53, P54, P56 i P57.



Slika 23. Podjela izolata po proizvodnji biofilma na jake, umjerene, slabe i ne-proizvođače biofilma. Kratice: SBP (jaki proizvođač biofilma, engl. *strong biofilm producer*), MBP (umjeren proizvođač biofilma, engl. *moderate biofilm producer*), WBP (slab proizvođač biofilma, engl. *weak biofilm producer*) i NBP (ne-proizvođač biofilma, engl. *no biofilm producer*)

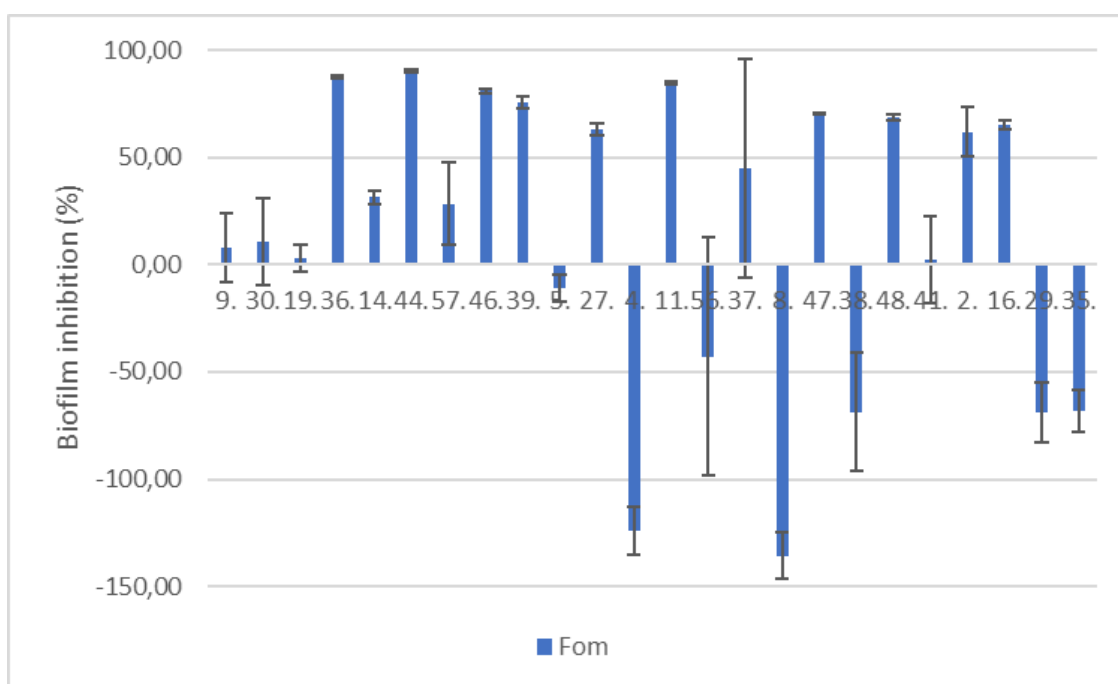
4.6.1 Otpornost na antibiotike izolata ispitanih na proizvodnju biofilma

Od 43 ispitana izolata, 42 % bilo je višestruko otporno (n=18), a 58 % je bilo prošireno otporno (n=25). 51 % izolata (n= 22) bilo je otporno na fosfomicin. Stope rezistencije na druge antibiotike bile su sljedeće: kolistin 14 % (n=6), piperacilin/tazobaktam 40 % (n=17), amikacin 47 % (n=20), cefepim 72 % (n=31), gentamicin 79 % (n=34), ceftazidim 86 % (n=37), ciprofloksacin 88 % (n=38), meropenem 91 % (n=39), imipenem 91 % (n=39).

4.7 Inhibicija stvaranja biofilma

Za test inhibicije stvaranja biofilma odabrano je 24 proizvođača biofilma, 13 jakih i 11 umjerenih proizvođača. Svaki izolat bio je izložen vršnim koncentracijama antibiotika u plazmi pojedinačno i u kombinaciji.

Izlaganje fosfomicinu rezultiralo je različitim stupnjevima inhibicije biofilma. Inhibicija stvaranja biofilma postignuta je kod 17 izolata (70,8 %) te je iznosila od 2,09 % do 90,43 %. Kod 7 izolata (29,2 %) zabilježene su veće OD₆₂₀ vrijednosti po primjeni fosfomicina, u usporedbi s OD₆₂₀ vrijednostima neizloženih izolata, slika 24. Pet izolata, od navedenih sedam, pripadalo je umjerenim proizvođačima biofilma prije izlaganja fosfomicinu, a jakim proizvođačima po izlaganju istom antibiotiku. Svih sedam izolata bilo je otporno na fosfomicin (MIK \geq 64 μ g/mL). Ukupna dobivena srednja vrijednost inhibicije iznosila je 14,9 %, tablica 11. U usporedbi s kontrolnom skupinom, primjenom fosfomicina nije zabilježeno statistički značajno smanjenje OD₆₂₀ ($p=0,069$).



Slika 24. Učinak inhibicije biofilma fosfomicinom (%), izražena srednja vrijednost sa standardnim devijacijama, grafički prikaz. Kratice: Fosfomicin (FOM)

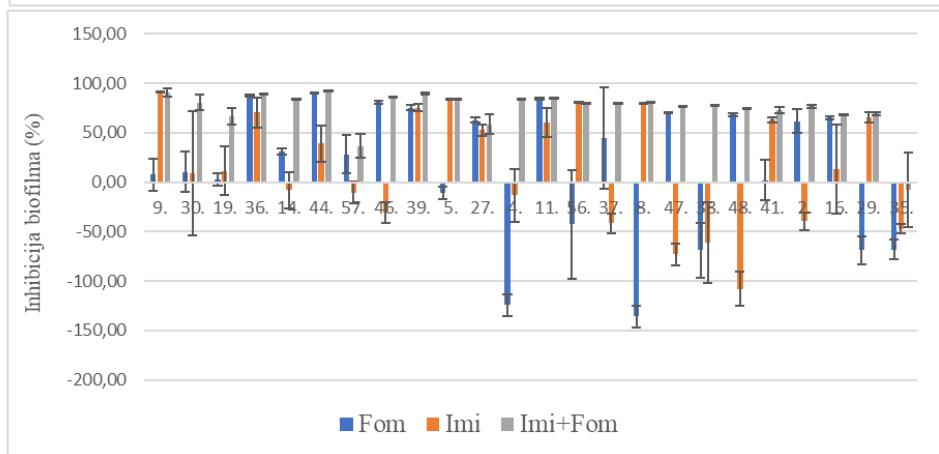
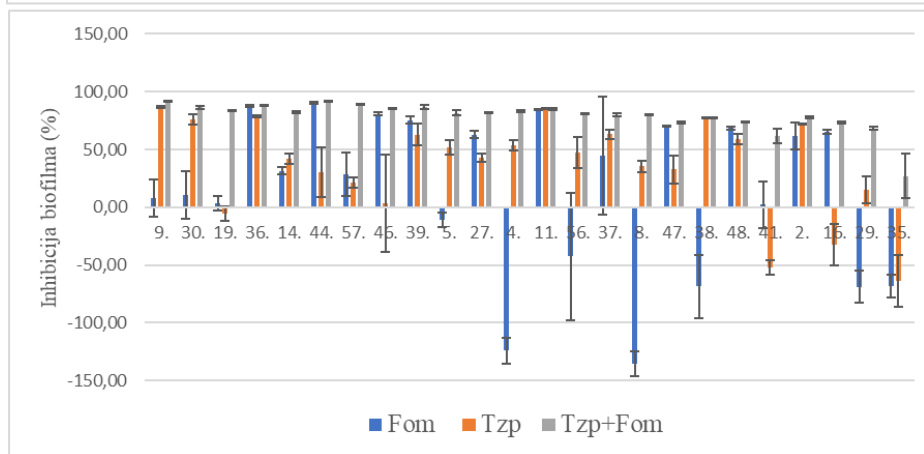
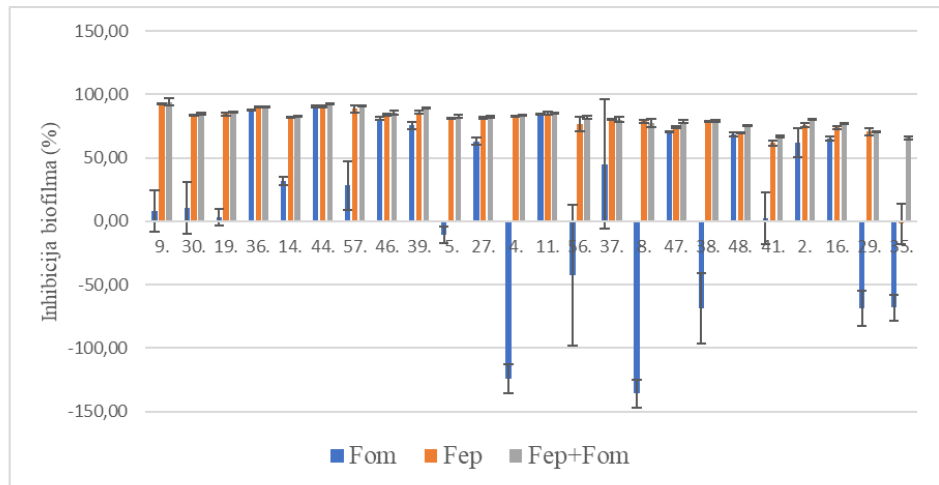
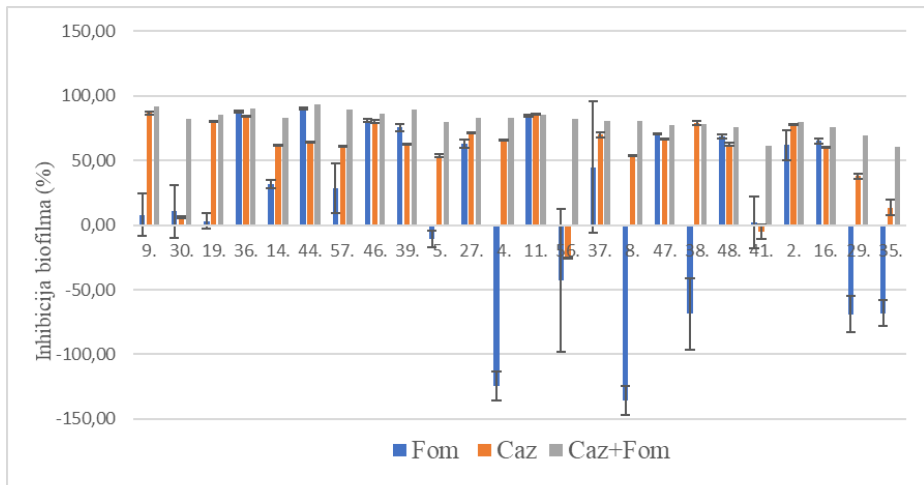
Prosječne vrijednosti inhibicije biofilma postignute primjenom antibiotika samostalno i u kombinaciji prikazane su u tablici 11. Registrirane su velike razlike u inhibicijskim svojstvima pojedinačno primijenjenih antibiotika, slika 25. Ujednačeniji obrazac inhibicije zabilježen je kada su ti antibiotici korišteni u kombinaciji s fosfomicinom. Najviše stope inhibicije zabilježene su primjenom kolistina samostalno i u kombinaciji. Takav rezultat nije neočekivan,

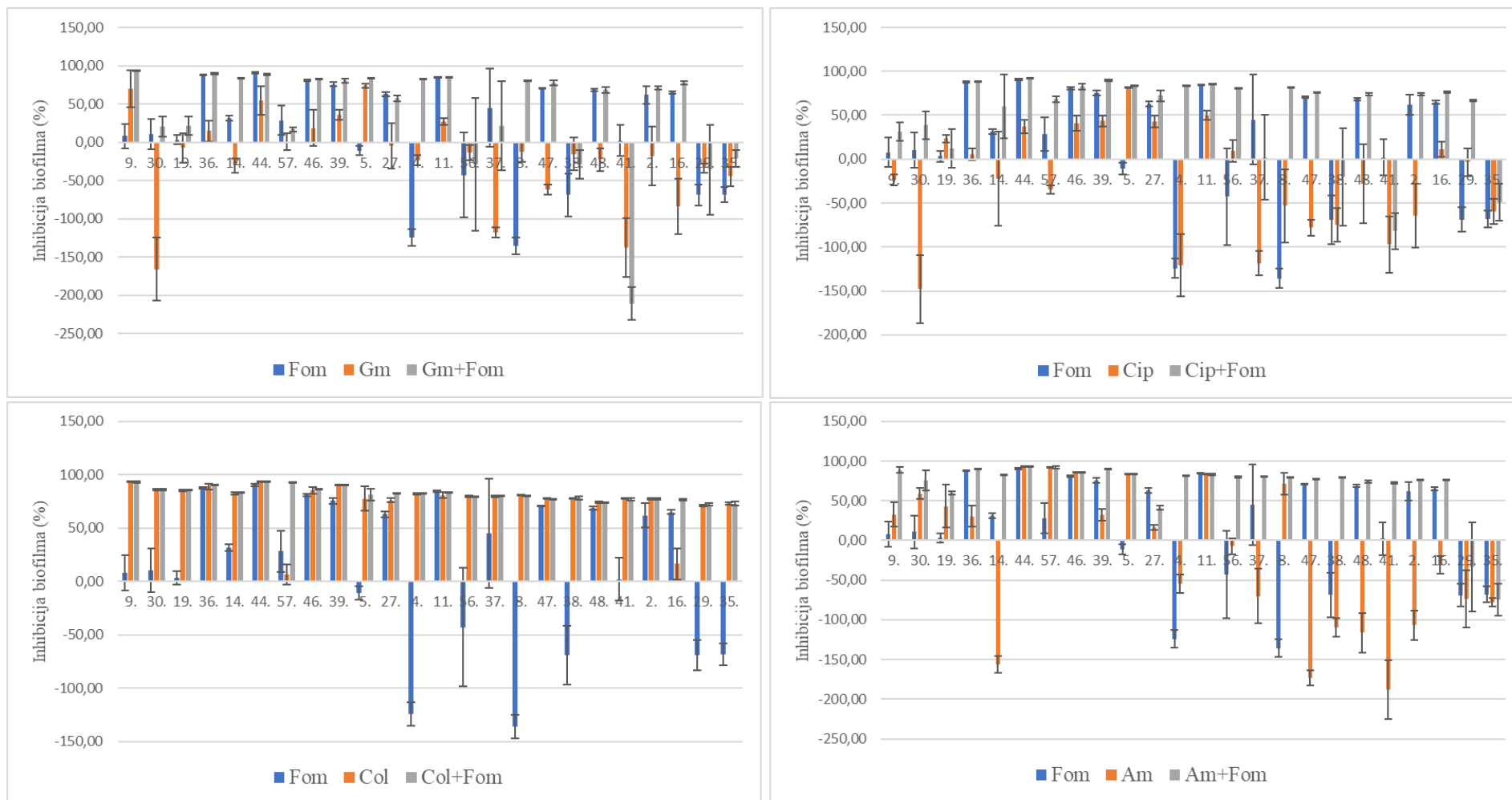
obzirom na to da su najniže stope otpornosti zabilježene upravo na kolistin (14 %). Visoke stope inhibicije zabilježene su također primjenom cefepima samostalno i u kombinaciji te ceftazidima u kombinaciji, unatoč visokim stopama otpornosti na cefepim (72 %), ceftazidim (86 %) i fosfomicin (51 %).

Tablica 11. Prosječne vrijednosti inhibicije biofilma dobivene antibioticima primijenjenim samostalno ili u kombinaciji s fosfomicinom, izražene kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama.

Atb	Prosječna vrijednost inhibicije biofilma				
	Samostalno (%)	SD	U kombinaciji (%)	SD	p
FOM	14,9	67,75			
CAZ	56,5	29,96	81,0	8,39	0,00000614
FEP	77,1	18,35	81,8	7,35	0,00000626
TZP	36,8	41,78	78,8	13,19	0,00000482
IMI	15,2	58,14	74,1	21,16	0,00006638
GM	-20,8	59,99	39,9	68,82	0,000893
CIP	-24,2	61,78	52,8	47,19	0,0000976
COL	75,6	20,73	82,3	6,41	0,00000487
AM	-18,3	91,26	68,1	39,66	0,0003539

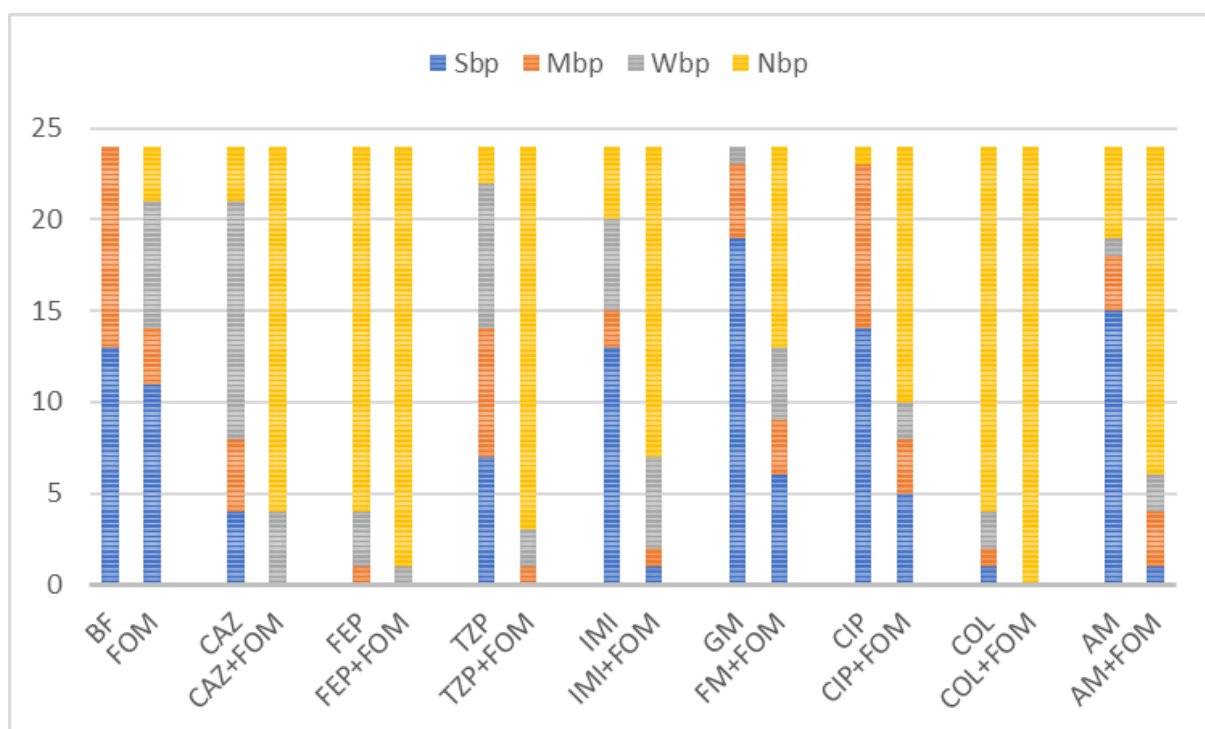
Kratice: antibiotik (atb), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), gentamicin (GM), amikacin (AMI), ciprofloksacin (CIP), imipenem (IMI), kolistin (COL), standardna devijacija (SD), p-vrijednost (p)





Slika 25. Učinak pojedinačnih i kombiniranih antibiotskih tretmana na razvoj biofilma, grafički prikaz; Vrijednosti postotka inhibicije biofilma izražene su kao srednje vrijednosti sa standardnim odstupanjima (SD) dobivenim kristal violet testom u mikrotitarskim pločicama. Kratice: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), gentamicin (GM), amikacin (AMI), ciprofloksacin (CIP), imipenem (IMI), kolistin (COL)

Iako su najviše razine inhibicije biofilma zabilježene u kombinacijama s kolistinom, sa srednjom vrijednosti postotka inhibicije od 82,3 %, nije primijećena statistička značajnost u usporedbi s jednokratnom primjenom kolistina ($p=0,47$). Primjena samog kolistina (75,6 %) i u kombinaciji (82,3 %) bila je efikasnija od upotrebe samog fosfomicina (14,9 %) u pogledu inhibicije biofilma. Ipak, usporedba kategorija proizvodnje biofilma pokazala je uspješnija svojstva kombinirane terapije, pri čemu su svi izolati pripali kategoriji NBP zbog kombinacije kolistin-fosfomicin, slika 25. Sličan učinak primijećen je u kombinaciji s cefepimom. Visoke razine inhibicije biofilma primijećene su i s cefepimom samim i u kombinaciji. Međutim, kombinirana primjena bila je uspješnija od uporabe jednog antibiotika u pogledu promjena kategorije, gdje je kombinirana terapija rezultirala višim postotkom NBP-a, graf 8. Sve druge kombinacije antibiotika, ceftazidim, piperacilin/tazobaktam, imipenem, gentamicin, ciprofloksacin i amikacin, rezultirale su statistički značajnim razinama inhibicije biofilma u usporedbi sa samostalnim primjenama antibiotika ($p<0,05$). Nadalje, sve kombinacije antibiotika rezultirale su većim udjelom ne-proizvođača biofilma, slika 26.



Slika 26. Distribucija kategorija proizvođača biofilma u ovisnosti o prisustvu pojedinačnih antibiotika ili njihovih kombinacija. Kratice: fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL) i amikacin (AM) , jaki proizvođači biofilma (SBP), umjereni proizvođači biofilma (MBP), slabi proizvođači biofilma (WBP), ne-proizvođači biofilma (NBP), stvaranje biofilma netretiranih izolata (BF)

Visoke razine prosječne inhibicije stvaranja biofilma također su zabilježene u kombinacijama s β -laktamskim antibioticima ceftazidimom (81 %), piperacilinom/tazobaktamom (78,8 %) i imipenemom (74,1 %). Stope inhibicije biofilma bile su značajno više u navedenim kombinacijama, u usporedbi sa samostalnom primjenom istih antibiotika (56,5 %, 36,8 % odnosno 15,2 %), tablica 12. Štoviše, sve kombinacije rezultirale su višim udjelom ne-proizvođača biofilma, slika 25. Upotrebom imipenema samog postignuta je inhibicija biofilma kod 58,3 % izolata (n=14) sa srednjom vrijednošću inhibicije od 15,2 %. Izmjerene vrijednosti OD_{620} za 10 izolata bile su više po primjeni imipenema, u usporedbi s izmjerenim vrijednostima OD_{620} stvorenog biofilma neizloženih kontrola, što je rezultiralo negativnim vrijednostima inhibicije biofilma. Od ovih 10 izolata, 70 % (n=7) imalo je MIC_{IMI} vrijednost ≥ 64 . Ti su izolati, stoga, bili izloženi subinhibicijskim koncentracijama imipenema. Sličan učinak primijećen je i pri samostalnoj primjeni gentamicina, amikacina i ciprofloksacina. 93,8 % izolata (15/16) koji su imali negativne prosječne vrijednosti inhibicije stvaranja biofilma bilo je izloženo subinhibicijskim koncentracijama gentamicina, 100 % izolata (14/14) s

negativnim prosječnim vrijednostima inhibicije stvaranja biofilma bilo je izloženo subinhibicijskim koncentracijama kolistina, a 66,7 % izolata (8/12) s negativnim prosječnim vrijednostima inhibicije stvaranja biofilma bilo je izloženo subinhibicijskim koncentracijama amikacina. Dok su prosječne razine postignute inhibicije stvaranja biofilma gentamicinom (-20,8 %), amikacinom (-18,3 %) i ciprofloksacinom (-24,2 %) bile niske, kombinirana terapija s fosfomicinom rezultirala je značajno višim prosječnim razinama inhibicije stvaranja biofilma (39,9 %, 68,1 % odnosno 52,8 %), tablica 12. Dodatno, ove kombinacije antibiotika rezultirale su i većim udjelom NPB-a, slika 25.

4.8 Razaranje stvorenog biofilma

Učinak razaranja stvorenog biofilma proučavan je na zrelim biofilmovima starim 24 sata. Za to ispitivanje odabrano je osam jakih proizvođača biofilma. Nastali biofilmovi izlagani su antibioticima 6 sati i 24 sata. Nije primijećeno statistički značajno smanjenje biofilma niti promjena OD_{620} , bez obzira na vrijeme izlaganja antibioticima, tablica 12. i tablica 13. Ipak, promjena kategorije od jakih do umjerenih proizvođača biofilma nakon 6 sati izlaganja antibioticima je zabilježena među nekim izolatima. Taj je učinak primijećen kada je biofilm izolata P14 bio izložen fosfomicinu pojedinačno, ceftazidimu i ciprofloksacinu u kombinaciji te cefepimu, imipenemu, gentamicinu, kolistinu i amikacinu pojedinačno kao i u kombinaciji. Isti učinak zabilježen je i nakon izlaganja biofilma izolata P46 imipenemu pojedinačno i u kombinaciji, te nakon izlaganja biofilma izolata P36 amikacinu u kombinaciji. Slično, 24-satno izlaganje antibioticima rezultiralo je jednakim promjenama kategorije, od jakih do umjerenih, zabilježenih izlaganjem biofilma P36 amikacinu, kolistinu i ciprofloksacinu u kombinaciji te piperacilin/tazobaktamu pojedinačno.

Tablica 12. Prosječne vrijednosti OD₆₂₀ biofilmova starih 24 sata nakon 6 sati izlaganja pojedinačnim i kombiniranim antibioticima i stope razaranja biofilma, izražene kao srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom.

	OD _{atb}	OD _{comb}	RB (%)	SD	RB _{comb} (%)	SD
CAZ	0,607594	0,521313	4,75	14,80	18,81	9,72
FEP	0,491531	0,495109	21,00	12,42	22,35	12,15
TZP	0,648563	0,552984	-4,64	12,71	13,24	13,23
IMI	0,490469	0,467781	23,20	9,57	27,59	12,48
GM	0,55825	0,539375	11,93	9,69	14,85	15,81
CIP	0,644125	0,572797	-4,15	10,95	10,26	14,79
COL	0,465239	0,495609	26,72	17,43	23,94	12,14
AM	0,580547	0,526031	10,77	10,17	19,48	13,24
FOM	0,562453		11,51	11,28		

Kratice: optička gustoća (OD), razaranje biofilma (RB), standardna devijacija (SD), atb (antibiotik), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL) i amikacin (AM).

Tablica 13. Prosječne vrijednosti OD₆₂₀ biofilмова starih 24 sata nakon 24 sata izlaganja pojedinačnim i kombiniranim antibioticima i stope razaranja biofilma sa standardnom devijacijom.

	OD _{atb}	OD _{comb}	RB (%)	SD	RB _{comb} (%)	SD
CAZ	0,625203	0,670141	8,49	16,87	2,71	19,91
FEP	0,593656	0,651391	11,91	12,37	2,77	12,91
TZP	0,561375	0,648823	16,70	11,89	3,95	10,97
IMI	0,590844	0,568	10,82	11,63	14,02	13,31
GM	0,586094	0,640443	13,68	6,44	4,01	9,45
CIP	0,601026	0,597516	10,70	8,51	9,94	17,19
COL	0,625568	0,62611	8,24	8,52	7,54	12,06
AM	0,636359	0,572573	6,61	13,19	15,38	11,91
FOM	0,678063		-3,81	23,85		

Kratice: optička gustoća (OD), razaranje biofilma (RB), standardna devijacija (SD), atb (antibiotik), fosfomicin (FOM), ceftazidim (CAZ), cefepim (FEP), piperacilin/tazobaktam (TZP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), ciprofloksacin (CIP), kolistin (COL) i amikacin (AM)

5 RASPRAVA

P. aeruginosa jedan je od najvažnijih bolničkih patogena, urođeno je otporan na mnoge antibiotike i nerijetko razvija rezistenciju u toku terapije antibioticima. Stečena rezistencija značajno ograničava terapijske mogućnosti, a zbog sve većeg širenja rezistencije danas predstavlja prepoznatu globalnu prijetnju. Od iznimnog kliničkog i epidemiološkog značaja je pojava i širenje stečenih karbapenemaza, osobito metalo- β -laktamaza, kako se radi o enzimima sa širokim supstratnim profilom koji su neosjetljivi na inhibitore serinskih β -laktamaza. Prvi izvještaj o metalo- β -laktamazi kod *P. aeruginosa* u Republici Hrvatskoj datira iz 2003. godine, kada je izvješteno o VIM-2 MBL (46). Osim sve češće otpornosti koja se razvija na karbapeneme, zabrinjava i stečena otpornost na druge pričuvene antibiotike, u koje ubrajamo i kolistin.

Jedan od važnijih faktora virulencije bakterije *P. aeruginosa* je sposobnost stvaranja biofilma. Time je omogućena kronična kolonizacija različitih tkiva, u uvjetima koji omogućavaju preživljenje bakterije i uz primjene visokih doza antibiotika, što posebno otežava liječenje. Liječenje biofilm infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* često rezultira neuspjehom (26). Treba, također, naglasiti da se procjenjuje da je gotovo 80 % perzistentnih bakterijskih infekcija povezano s biofilmom (26).

Fosfomicin, zbog svog specifičnog mehanizma djelovanja i očuvane aktivnosti protiv MDR bakterija, postaje zanimljiv izbor za liječenje infekcija uzrokovanih mikroorganizmima otpornima na antibiotike. Vrijednost terapije fosfomicinom je, također, mogućnost primjene peroralnim putem, što pruža mogućnost da se izbjegne hospitalizacija kod određenih infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama s očuvanom osjetljivošću na fosfomicin. Međutim, zbog čestih mutacija koje rezultiraju rezistencijom na fosfomicin registriranih *in vitro*, monoterapija fosfomicina za sistemske infekcije se ne preporuča (2–4). Stjecanje rezistencije tijekom terapije također je opisano u literaturi (16). Navedenom problemu stjecanja otpornosti može se doskočiti kombiniranom primjenom antimikrobnih lijekova. Bakterije, čini se, mogu ponovo postati osjetljive na antibiotike, na koje su inicijalno bile otporne, onda kada se oni koriste u kombinacijama (3,9,10). Kliničke studije vezane za pacijente s infekcijama uzrokovanim otpornim izolatima često su teško izvedive i komplicirane. Stoga, terapijske odluke nerijetko ovise o *in vitro* istraživanjima. Najveći stupanj sinergije, prema rezultatima preglednog rada iz 2020. za *P. aeruginosa* zabilježen je u kombinacijama s kloramfenikolom, aminoglikozidima i cefalosporinima (85), dok su podaci o *in vitro* sinergiji fosfomicina u kombinacijama s drugim

antibioticima prema MDR i XDR izolatima i izolatima koji sadrže karbapenemaze oskudni (3,4,10,82,96–100).

Iako fosfomicin i drugi antibiotici koji se koriste u terapiji infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa* pokazuju određenu anti-biofilm aktivnost na različitim razinama, antimikrobna monoterapija obično je nedostatna u eradikaciji biofilma. Kombinirana antimikrobna terapija i u ovom slučaju predstavlja terapijsku alternativu (113). Sinergija fosfomicina s drugim antibioticima u terapiji biofilma *P. aeruginosa* je zabilježena u kombinacijama s nekoliko antibiotika, najčešće s aminoglikozidima i kinolonima, obično na manjem broju kliničkih izolata, bez definiranog fenotipa rezistencije (12,27,28).

Cilj ove studije bio je ustanoviti međudjelovanje fosfomicina s drugim antibioticima koji se koriste u terapiji *P. aeruginosa* prema kliničkim izolatima i biofilmu te bakterije, uključujući MDR i XDR izolate. Jedan od fokusa bili su i izolati koji sadrže β -laktamaze, posebno metalo- β -laktamaze, s obzirom na to da mogućnost korištenja karbapenema, kao rezervnih antibiotika, značajno ovisi o njihovom prisustvu. Ponovna uspostava osjetljivosti navedenih antibiotika u kombinaciji predstavlja potencijalno značajan terapijski doprinos (10,141). Većina izolata *P. aeruginosa* u ovoj studiji bili su MDR (n=20) ili XDR (n=25). Više od pola izolata (n=26) sadržavalo je VIM metalo- β -laktamazu, dva izolata PER-1 β -laktamazu proširenog spektra, dok je kod 4 izolata detektirana hiperekspresija AmpC. Sinergija svih antimikrobnih kombinacija procijenjena je uspoređujući dinamičku „time-kill“ metodu, takozvani zlatni standard u ispitivanju sinergije, i metodu ukriženih trakica, koja predstavlja statičku metodu s pojedinačnim koncentracijama. Šah metoda nije korištena u ovoj studiji, obzirom na to da se metoda dilucije u bujonu ne preporučuje za određivanje MIK-a fosfomicina (123). Studije sinergije predstavljaju vrijedan alat za procjenu učinkovitosti kombinirane terapije kao potencijalne alternativne strategije liječenja, posebno kada su terapijske mogućnosti ograničene, kao kod MDR i XDR bakterija.

Glavno otkriće ovog istraživanja je da su sinergija i aditivni učinak najčešće uočeni u kombinacijama s ceftazidimom i gentamicinom, primjenom metode ukriženih trakica, neovisno o prisutnosti stečenih β -laktamaza. Koristeći „time-kill“ metodu, sinergija je registrirana kod jednog od četiri izolata u kombinaciji s oba antibiotika, ceftazidimom i gentamicinom, a aditivni učinak registriran je kod dva izolata u kombinaciji s gentamicinom. Slični podaci o sinergiji kod *P. aeruginosa*, poglavito osjetljivih, ali i izolata sa drugim, nerijetko nedefiniranim determinantama rezistencije te bez prisutnosti XDR izolata, objavljeni su u nedavnom

preglednom radu (85). Smatra se da do sinergije s ceftazidimom dolazi tako da fosfomicin, inhibirajući raniji enzimski korak u sintezi stanične stijenke, pojačava aktivnost β -laktama, povećavajući propusnost staničnog zida za β -laktamske antibiotike (9). Vjerojatno fosfomicin, također, povećava propusnost stanice i za aminoglikozide, što dovodi do povećane inhibicije sinteze proteina i, u konačnici, stanične smrti (86). Značajan baktericidni učinak, uz smanjenje broja kolonija vijabilnih bakterija (cfu/mL) više od 99,9 % ($> 3 \log_{10}$), registriran je u kombinacijama s gentamicinom, imipenemom i kolistinom kod tri od četiri izolata. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju također upućuju na bakteriostatsku aktivnost fosfomicina prema *P. aeruginosa*, što je u skladu s prethodno objavljenim podacima (2).

Najistaknutija razlika u rezultatima dobivenim ovim istraživanjem uočena je kod kombinacija s kolistinom. Visok postotak indiferencije registriran je ispitivanjem metodom ukriženih trakica, dok je „*time-kill*“ metodom zabilježena sinergija kod tri od četiri izolata sa značajnim baktericidnim učinkom. Jedno od objašnjenja sinergije moglo bi biti da kolistin povećava propusnost vanjske membrane čime olakšava ulazak i djelovanje fosfomicina (11,68,73). Prijašnje studije zabilježile su slične razlike u sinergiji s kolistinom u ovisnosti o metodi ispitivanja učinaka kombinirane terapije (4,142).

Razlike među korištenim metodama koje su registrirane u ovoj studiji mogu se objasniti činjenicom da se uspoređuju različiti učinci, pri čemu se metodom ukriženih trakica određuje bakteriostatska aktivnost antibiotika u kombinacijama, dok se „*time-kill*“ metodom određuje baktericidna aktivnost antibiotika u kombinacijama. Međutim, još treba ustanoviti kojom metodom se može bolje predvidjeti klinički učinak (70,82).

Određene kombinacije antimikrobnih lijekova rezultirale su baktericidnim učinkom u toku testiranja, međutim ponovni porast bakterija dogodio se nakon 24 sata. Možemo pretpostaviti da je došlo do razvoja heterorezistencije, kao što je već opisano u literaturi (11). Provođenjem populacijske analize mogao bi se ustanoviti mehanizam razvoja heterorezistencije. Kod izolata P32 primjenom amikacina samostalno i u kombinaciji registriran je baktericidni učinak nakon 8 sati, međutim kod kombinirane primjene antibiotika nije zabilježen ponovni porast bakterija nakon 24 sata. Slični rezultati zabilježeni su kod izolata P36 i P45 primjenom kolistina samostalno i u kombinaciji. Čini se kako se primjenom kombinirane terapije također može smanjiti i pojava heterorezistencije.

Nadalje, „*time-kill*“ ispitivanjem soja P14, koji sadrži VIM metalo- β -laktamazu, nije zabilježen ni baktericidni učinak niti sinergija. Kod druga tri MDR izolata kod kojih nisu

detektirane karbapenemaze, sinergija je registrirana i u kombinacijama s β -laktamskim antibioticima, ali i s drugim testiranim antibioticima. Jedno objašnjenje je hidroliza antibiotika u prisustvu metalo- β -laktamaze, što može umanjiti sinergistički učinak antimikrobne kombinacije. Treba, naravno, naglasiti da su izolati koji imaju određena svojstva otpornosti, na primjer VIM ili PER β -laktamaze, klinički izolati koji vrlo vjerojatno posjeduju i druge mehanizme rezistencije, kao što su hiperekspresija efluks pumpi ili gubitak porina. Ti mehanizmi također doprinose otpornosti mikroorganizma i stoga je vrlo teško procijeniti odnos između pojedinog svojstva otpornosti i farmakodinamskog odgovora na pojedinačni antibiotik ili njihove kombinacije. MBL pozitivni izolati su najčešće bili XDR, dok su oni bez dokazane karbapenemaze bili MDR. Štoviše, samo dva izolata su bila ESBL pozitivna, a ESBL se i inače rijetko detektiraju kod *P. aeruginosa*, a samo kod četiri soja je detektirana hiperekspresija AmpC. Radi se o premalenom broju za usporedbu s izolatima koji sadrže MBL i uspostavljanje pouzdane korelacije između osobina otpornosti i odgovora na pojedine antibiotike ili kombinacije antibiotika.

Ipak, prema rezultatima „*time-kill*“ analize, mogla bi se preporučiti terapija gentamicinom i kolistinom, a prema rezultatima metode ukriženih trakica najveća mogućnost za sinergiju i najpovoljniji terapijski ishod očekivan je u kombinacijama s gentamicinom i ceftazidimom.

Dodatno je, metodom ukriženih trakica, registriran i učinak snižavanja MIK-a kod svih kombinacija antibiotika, i u ovom slučaju najčešće s ceftazidimom i gentamicinom. U situacijama kada je MIK fosfomicina testiranog izolata malo iznad granične vrijednosti, fosfomicin bi, smanjenjem MIK-a fosfomicina antibiotikom s kojim se koristi u kombinaciji, mogao postati ponovo osjetljiv i upotrebljiv u terapiji. To je također slučaj i kod svih kombinacija koje su rezultirale aditivnim učinkom, gdje vrijednosti FICI od $> 0,5$ do ≤ 1 pokazuju da su MIK-ovi korištenih antibiotika niži u prisutnosti oba antibiotika. Ti rezultati mogu biti klinički značajni u situacijama kada su *in vitro* ispitivanjem dobivene granične vrijednosti otpornosti izolata. Treba naglasiti da je metoda ukriženih trakica brza i jednostavna tehnika koja bi se lagano mogla implementirati u kliničke laboratorije.

Do sada u literaturi nisu zabilježeni *in vitro* učinci kombinacija ceftazidima, cefepima, piperacilin/tazobaktama, gentamicina, amikacina, ciprofloksacina, imipenema i kolistina s fosfomicinom na PAE kod *P. aeruginosa*. Čini se da kombinacija s tobramicinom ima bolji učinak na PAE od pojedinačno primijenjenih antibiotika (87). U ovoj studiji uočen je kratak PAE fosfomicina kod četiri testirana izolata, oko 1 sat, pri vršnim serumskim koncentracijama

antibiotika. Kombinacije s aminoglikozidima rezultirale su produljenim PAE kod jednog od četiri izolata. Sve kombinacije s gentamicinom rezultirale su aditivnim učinkom. Iako nije zabilježena značajna PAE sinergija, učinak kombinacija antibiotika bio je dulji od učinaka antibiotika primijenjenih samostalno, što je bilo osobito uočljivo kod kombinacija s kolistinom, a negativne vrijednosti PAE nisu zabilježene niti s jednom kombinacijom.

U ovoj studiji analizirana je proizvodnja biofilma za 43 otporna izolata *P. aeruginosa* od kojih je 42 % bilo MDR, a 58 % XDR. Visoke stope rezistencije na antibiotike u monoterapiji zabilježene su i za prvu i za drugu liniju terapije kod ovih izolata. Zabilježene stope rezistencije bile su sljedeće: kolistin 14%, piperacilin/tazobaktam 40 %, amikacin 47 %, fosfomicin 51 %, cefepim 72 %, gentamicin 79 %, ceftazidim 86 %, ciprofloksacin 88 %, meropenem 91 % i imipenem 91 %. Svi prikupljeni izolati bili su proizvođači biofilma, pri čemu je bilo 32,6 % jakih proizvođača biofilma, 41,9 % srednjih proizvođača biofilma i 25,6 % slabih proizvođača biofilma. Sposobnosti proizvodnje biofilma vjerojatno variraju zbog razlika u ekspresiji gena, ali i kliničkih izvora odnosno stanja bolesnika (143). Također je analiziran učinak dostižnih vršnih serumskih koncentracija 8 različitih antibiotika koji se koriste u terapiji infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa* pojedinačno i u kombinaciji s fosfomicinom, na inhibiciju stvaranja biofilma 24 izolata *P. aeruginosa* i razaranje 8 već stvorenih, zrelih biofilmova iste bakterije. Prethodne studije učinaka kombinirane terapije sa fosfomicinom na biofilm *P. aeruginosa* uglavnom su provedene na malom broju izolata, referentnom soju ili se radi o rezultatima upitne kliničke koristi zbog visokih režima doziranja (29,114–117). Također, prema bibliografskim podacima uglavnom je analizirana sinergija fosfomicina s aminoglikozidima i fluorokinolonima (12,115–117,144–146). Ovdje je procijenjen učinak vršnih serumskih koncentracija aminoglikozida i fluorokinolona, ali i β -laktamskih antibiotika i kolistina na biofilm kliničkih izolata različitog profila rezistencije.

U ovom ispitivanju nisu registrirani ni inhibitorni ni razarajući učinci fosfomicina samog na biofilm MDR i XDR *P. aeruginosa*. Prema Wang i sur. slični rezultati bez anti-biofilm učinaka protiv fosfomicin osjetljivog *P. aeruginosa* dobiveni su unatoč visokim korištenim koncentracijama navedenog antibiotika (do 1.024 $\mu\text{g/ml}$) (12). Fosfomicin inhibira sintezu stanične stijenke i najbolje djeluje protiv brzo rastućih bakterija, što djelomično može objasniti ove rezultate.

Smatra se da bi učinak β -laktama na stvoreni biofilm mogao biti slab, zbog sporog rasta bakterija u biofilmu, onemogućavajući aktivnost β -laktama usmjerenih na sintezu

peptidoglikana aktivno rastućih bakterija koje se dijele (147). Ipak, u ovom istraživanju, primjenom β -laktamskih antibiotika u kombinaciji s fosfomicinom, zabilježene su visoke razine inhibicije stvaranja biofilma ($\geq 74,1$ %). Najveće stope inhibicije stvaranja biofilma među antibioticima korištenih pojedinačno zabilježene su s cefepimom (77,1 %) i kolistinom (75,6 %). Ovo je prvo izvješće o utjecaju kombinacija ceftazidima, cefepima i piperacilina/tazobaktama s fosfomicinom na biofilm *P. aeruginosa*. Ovdje smo po prvi put pokazali da β -laktamski antibiotici imaju snažniji učinak na IFB u usporedbi s inhibitorima sinteze proteina, čak i kada nisu u kombinaciji s fosfomicinom. Dapače, učinak IFB-a bio je najizraženiji u kombinacijama s ceftazidimom, cefepimom i kolistinom unatoč visokim stopama rezistencije na ceftazidim (86 %), cefepim (72 %) i fosfomicin (51 %). Ovi rezultati ukazuju na moguću vezu između peptidoglikana i stvaranja biofilma. Nadalje, IBF učinak kombinacija antibiotika bio je jači od učinaka pojedinačno primijenjenih antibiotika. Dodatno, udio NBP-a bio je veći.

I aminoglikozidi i kinoloni često se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *P. aeruginosa*. Sinergija kombinacije fosfomicin/aminoglikozid i kinolon prema biofilmu bakterije *P. aeruginosa* već je u određenoj mjeri dokumentirana, korištenjem različitih biofilm modela, različitih predstavnika antibiotika iz navedenih skupina i različitih brojeva izolata, ponekad samo na jednom, nerijetko na izolatima osjetljivim na ispitivane antibiotike (12,115–117,144–146). Anderson i sur. izvijestili su o razaranju biofilma *P. aeruginosa* na kultiviranim stanicama dišnih putova kombinacijom fosfomicina/tobramicina (29). Iako je dobro prodiranje u biofilm *P. aeruginosa* zabilježeno za fosfomicin, ciprofloksacin i gentamicin, najniže stope inhibicije stvaranja biofilma u ovom ispitivanju zabilježene su u kombinacijama s aminoglikozidima i ciprofloksacinom (12).

Također su uočene i velike razlike u inhibicijskim svojstvima određenih antibiotika, uključujući fosfomicin, aminoglikozide, imipenem i ciprofloksacin, prema različitim izolatima. Štoviše, izlaganjem određenih izolata vršnim serumskim koncentracijama antibiotika, registrirane su više vrijednosti OD_{620} od onih dobivenih kod neizloženih izolata. Navedeni izolati su u visokom postotku bili rezistentni na korištene antibiotike i izloženi nižim koncentracijama antibiotika od svojih MIK vrijednosti. To bi moglo biti u skladu s objavljenim podacima o *in vitro* biofilm indukcijskom potencijalu određenih antibiotika u subinhibicijskim koncentracijama, odnosno koncentracijama antibiotika ispod terapijskih razina, ali ipak prisutnih u organizmu. Taj učinak dokumentiran je kod izlaganja izolata bakterije *P. aeruginosa*

subinhibicijskim koncentracijama aminoglikozida, aztreonama, imipenema i ciprofloksacina (26,113,148).

Nije primijećen statistički značajan učinak na razaranje biofilma niti individualnim korištenjem antibiotika niti u kombinaciji, što govori o u prilog slabom razaračkom potencijalu antibiotika na zreli biofilm. Ipak, zabilježeno je smanjenje mase biofilma primjenom pojedinih antibiotika pojedinačno kao i u kombinaciji, pri čemu su za neke izolate zabilježene niže kategorije proizvođača biofilma. Takva aktivnost antimikrobnih lijekova i njihovih kombinacija ukazuje na potencijal koji treba dodatno istražiti.

Upotreba statičkog *in vitro* biofilm modela daje uvid u fiziologiju biofilma, međutim manjkavost tog modela očituje se u otežanoj kontroli okolišnih čimbenika, poput dotoka hranjivih tvari i sposobnosti ispiranja otpadnih metabolita, ali i potencijalnog utjecaja domaćina (29,144,149). Dinamički ili otvoreni sustavi primjenjuju uvjete koji bolje oponašaju one *in vivo*. Daljnje studije, s više kliničkih izolata i na različitim modelima biofilma, dale bi dodatni uvid u učinak kombinirane terapije na inhibiciju stvaranja i razaranje biofilma koji stvara *P. aeruginosa*. Također, kompletna šah metoda pružila bi sveobuhvatniju procjenu učinaka kombinirane terapije.

Prema rezultatima ovog istraživanja, značajan udio kliničkih izolata *P. aeruginosa* (52,9 %) već je otporan na fosfomicin. Što se tiče sinergije fosfomicina s drugim antibioticima, čini se da je ona ovisna o samom soju i ovisi o njegovim svojstvima, ali i o metodi odabranoj za analizu sinergije. Zbog potencijalnih nepodudarnosti među rezultatima dobivenima različitim metodama, dodatne *in vivo* studije sinergije pomogle bi u procijeni iskoristivosti *in vitro* metoda, ali i klinički relevantnih učinaka. Također, treba imati na umu da je analiziran skroman broj izolata, mali broj ESBL pozitivnih, te da je detektirana isključivo VIM karbapenemaza. Zato bi daljnje evaluacije obje metode, „*time-kill*“ i metode ukriženih trakica, na većem broju izolata, s dodatnim mehanizmima rezistencije, omogućile još bolju procjenu potencijala sinergije i točniju statističku analizu. Treba, ipak, naglasiti da su podaci dosadašnjih studija za *in vitro* sinergiju fosfomicina s drugim antibioticima, osobito u pogledu nekih antibiotika, temeljeni na ograničenom broju izolata, često bez definiranih fenotipova rezistencije. Nadalje, metoda ukriženih trakica mogla bi se pokazati kao iskoristiva i izvediva metoda u kliničkom laboratoriju za pomoć pri odabiru adekvatne terapije, osobito u situacijama kada su vrijednosti MIK-a oko ili malo iznad graničnih vrijednosti osjetljivosti.

Ovi rezultati također dokazuju da je *in vitro* učinak kombinacija antibiotika s fosfomicinom na biofilm, osobito u smislu IFB-a, znatno bolji od pojedinačne uporabe antibiotika, koristeći klinički dostižne koncentracije, čak i u onim situacijama kada oba antibiotika primijenjena pojedinačno nisu učinkovita. Dodatno, prema ovim rezultatima IFB potencijal kombinacija s β -laktamskim antibioticima i kolistinom je veći od onog s inhibitorima sinteze proteina. Rezultati dobiveni u ovoj studiji mogli bi biti klinički vrijedni osobito u pogledu profilakse stvaranja biofilma ne samo osjetljivih, nego i otpornih izolata.

6 ZAKLJUČCI

1. Značajan udio kliničkih izolata *P. aeruginosa* (52,9 %) već je otporan na fosfomicin.
2. Sinergistički učinak ovisi o soju i kombinaciji antibiotika, ali ne o detektiranom mehanizmu rezistencije.
3. Kombiniranom primjenom antibiotika smanjuje se razvoj heterorezistencije.
4. Prema rezultatima ovog istraživanja najbolje antimikrobne kombinacije s fosfomicinom koje bi mogle biti učinkovite u terapiji infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*, neovisno o prisutnim mehanizmima rezistencije, su kombinacije s gentamicinom, ceftazidimom i kolistinom.
5. Kombinacije sa svim antibioticima produljuju PAE, što bi moglo biti značajno u režimu doziranja lijeka.
6. Najveće produljenje PAE s potvrđenom sinergijom registrirano je u kombinacijama s kolistinom.
7. Najbolje kombinacije s fosfomicinom za sprječavanje razvoja biofilma kod MDR i XDR *P. aeruginosa* su kombinacije s kolistinom, cefepimom i ceftazidimom.
8. Kombinirana primjena drugih antibiotika s fosfomicinom je učinkovitija od samog fosfomicina u sprječavanju nastanka biofilma kod otpornih izolata, koristeći vršne serumske koncentracije antibiotika, dok značajniji utjecaj na razaranje već stvorenog biofilma nije registriran.
9. β -laktamski antibiotici i kolistin imaju snažniji BFI učinak u odnosu na inhibitore sinteze proteina, čak i kada nisu u kombinaciji s fosfomicinom
10. Kombinirana terapija može biti učinkovita i kod izolata otpornih na antibiotike.

7 POPIS LITERATURE

1. 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;18:268–81.
2. Walsh CC, McIntosh MP, Peleg AY, Kirkpatrick CM, Bergen PJ. *In vitro* pharmacodynamics of fosfomycin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:3042–50.
3. Walsh CC, Landersdorfer CB, McIntosh MP, Peleg AY, Hirsch EB, Kirkpatrick CM, et al. Clinically relevant concentrations of fosfomycin combined with polymyxin B, tobramycin or ciprofloxacin enhance bacterial killing of *Pseudomonas aeruginosa*, but do not suppress the emergence of fosfomycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2218–29.
4. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:695–701.
5. Díez-Aguilar M, Cantón R. New microbiological aspects of fosfomycin. *Rev Española Quimioter* 2019;32:8–18.
6. Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:506–15.
7. van Duin D, Paterson DL. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:377–90.
8. Tümmler B. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research* 2019;8:F1000.
9. Yousef Memar M, Adibkia K, Farajnia S, Kafil HS, Khalili Y, Azargun R, et al. In-vitro effect of imipenem, fosfomycin, colistin, and gentamicin combination against carbapenem-resistant and biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iran J Pharm Res* 2021;20:286–96.

10. Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. Prevalence of *in vitro* synergistic antibiotic interaction between fosfomicin and nonsusceptible antimicrobials in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2019;68:893–7.
11. Car H. *In vitro* synergy and postantibiotic effect of colistin combinations with meropenem and vancomycin against gram negative bacteria with multiple carbapenem resistance mechanisms. Doctoral dissertation. The Josip Juraj Strossmayer University of Osijek; 2020.
12. Wang L, Di Luca M, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic activity of fosfomicin, ciprofloxacin, and gentamicin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Front Microbiol 2019;10:2522.
13. Marino A, Stracquadiano S, Bellanca CM, Augello E, Ceccarelli M, Cantarella G, et al. Oral fosfomicin formulation in bacterial prostatitis: New role for an old molecule—brief literature review and clinical considerations. Infect Dis Rep 2022;14:621–34.
14. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakasa KZ. Fosfomicin. Clin Microbiol Rev 2016;29:321–47.
15. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicin. Ann N Y Acad Sci 1974;235:364–86.
16. Bielen L. Prospective controlled clinical trial of different fosfomicin dose regimens in the treatment of urinary tract infections caused by extended spectrum beta-lactamase producing strains of *Escherichia coli* and *K. pneumoniae*. Doctoral dissertation. School of Medicine, University of Zagreb; 2015.
17. Silver LL. Fosfomicin: Mechanism and resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 2017;7:a025262.
18. Raz R, Raz PR. Fosfomicin: an old—new antibiotic. Clin Microbiol Infect 2012;18:4–7.
19. Maraki S, Samonis G, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Mavromanolakis E, Falagas ME. Susceptibility of urinary tract bacteria to fosfomicin. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:4508–10.
20. López-Montesinos I, Horcajada JP. Oral and intravenous fosfomicin in complicated

- urinary tract infections. *Rev Esp Quimioter* 2019;32 Suppl 1:37–44.
21. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomycin: Use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. *Clin Infect Dis* 2008;46:1069–77.
 22. Keating GM. 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* 2013;73:1951–66.
 23. Rojo-Molinero E, Macià MD, Rubio R, Moyà B, Cabot G, López-Causapé C, et al. Sequential treatment of biofilms with aztreonam and tobramycin is a novel strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:2912–22.
 24. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS* 2017;125:304–19.
 25. Penesyan A, Paulsen IT, Gillings MR, Kjelleberg S, Manefield MJ. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front Microbiol* 2020;11:2109.
 26. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front Microbiol* 2020;10:2894.
 27. Ghorbani H, Memar MY, Sefidan FY, Yekani M, Ghotaslou R. *In vitro* synergy of antibiotic combinations against planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *GMS Hyg Infect Control* 2017;12:Doc17.
 28. Černohorská L, Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol (Praha)* 2008;53:57–60.
 29. Anderson GG, Kenney TF, MacLeod DL, Henig NR, O’Toole GA. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomycin/tobramycin antibiotic combination. *Pathog Dis* 2013;67:39–45.
 30. González MJ, Da Cunda P, Notejane M, Zunino P, Scavone P, Robino L. Fosfomycin tromethamine activity on biofilm and intracellular bacterial communities produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Pathog Dis* 2019;77:ftz022.

31. Mosime LB, Newton-Foot M, Nel P. Fosfomycin resistance in community-acquired urinary pathogens from Western Cape, South Africa. *South African J Infect Dis* 2022;37:321.
32. Xu W, Chen T, Wang H, Zeng W, Wu Q, Yu K, et al. Molecular mechanisms and epidemiology of fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from patients at a teaching hospital in China. *Front Microbiol* 2020;11:1290.
33. Seok H, Choi JY, Wi YM, Park DW, Peck KR, Ko KS. Fosfomycin resistance in *Escherichia coli* isolates from South Korea and *in vitro* activity of fosfomycin alone and in combination with other antibiotics. *Antibiotics* 2020;9:112.
34. Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Spyridopoulou K, Daikos GL. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2777–9.
35. Zurfluh K, Treier A, Schmitt K, Stephan R. Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae—An increasing threat. *Microbiologyopen* 2020;9:e1135.
36. De Groote VN, Fauvart M, Kint CI, Verstraeten N, Jans A, Cornelis P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* fosfomycin resistance mechanisms affect non-inherited fluoroquinolone tolerance. *J Med Microbiol* 2011;60:329–36.
37. Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2009;191:6968–74.
38. Rodríguez-Rojas A, Couce A, Blázquez J. Frequency of spontaneous resistance to fosfomycin combined with different antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4948–9.
39. Jorgesen, James H; Pfaller, Michael A; Carroll, Karen C; Funke, Guido; Landry, Marie Louise; Richter, Sandra S; Warnock DW, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th editi. Washington, DC: ASM Press; 2015. 773–791 p.
40. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01076-18.

41. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* 2015;22:90–101.
42. Viana Marques D de A, Machado SEF, Carvalho Santos Ebinuma V, Duarte C de AL, Converti A, Porto ALF. Production of β -Lactamase Inhibitors by *Streptomyces* Species. *Antibiot* 2018, Vol 7, Page 61 2018;7:61.
43. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161–82.
44. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58.
45. Borgianni L, Vandenameele J, Matagne A, Bini L, Bonomo RA, Frère JM, et al. Mutational analysis of VIM-2 reveals an essential determinant for metallo- β -lactamase stability and folding. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3197–204.
46. Sardelić S. Metallo-beta-lactamases in carbapenem-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Doctoral dissertation. School of Medicine, University of Zagreb; 2010.
47. Drenjančević D, Vraneš J. *Pseudomonas, acinetobacter i srodne bakterije* [*Pseudomonas, acinetobacter and related bacteria*]. In: Kalenić S, editor. 2nd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 214–20.
48. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 2010;5:1663–74.
49. McDaniel CT, Panmanee W, Hassett DJ. An overview of infections in cystic fibrosis airways and the role of environmental conditions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and viability. In: *Cystic fibrosis in the light of new research* InTech Open; 2015.
50. Chung ES, Lee JY, Rhee JY, Ko KS. Colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* that is not linked to *arnB*. *J Med Microbiol* 2017;66:833–41.
51. Motta SS, Cluzel P, Aldana M. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PLoS One* 2015;10:e0118464.
52. Arjana TA, editor. *Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici*

- Hrvatskoj u 2022.g. [Antibiotic resistance in Croatia, 2022]. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2022. 151 p.
53. Sardelic S, Bedenic B. Rezistencija na antibiotike u *Pseudomonas aeruginosa* - CROSB. Infektološki Glas 2009;29:177–83.
 54. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2043–8.
 55. Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. Front Med 2021;8:677720.
 56. Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4733–8.
 57. Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Infektološki Glas 2012;32:71–80.
 58. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase in northern Italy. J Clin Microbiol 2004;42:2523–9.
 59. Laudy AE, Róg P, Smolińska-Król K, Ćmiel M, Słoczyńska A, Patzer J, et al. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. Gonzalez-Bello C, editor. PLoS One 2017;12:e0180121.
 60. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002;34:634–40.
 61. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol 2011;2:65.
 62. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:118–25.
 63. Goli HR, Nahaei MR, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Samadi Kafil H, Aghazadeh M. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran.

- Iran J Microbiol 2016;8:62–9.
64. Schurek KN, Sampaio JLMM, Kiffer CRV V., Sinto S, Mendes CMFF, Hancock REWW. Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4345–51.
 65. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5150–4.
 66. Jeannot K, Hagart K, Dortet L, Kostrzewa M, Filloux A, Plesiat P, et al. Detection of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using the MALDIxin test on the routine MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometer. *Front Microbiol* 2021;12:725383.
 67. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. *PmrB* mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1019–30.
 68. Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci* 2014;119:149–53.
 69. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1914–8.
 70. Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol* 2014;52:4124–8.
 71. EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:503–8.
 72. Yang SK, Yusoff K, Mai CW, Lim WM, Yap WS, Lim SH, et al. Additivity vs synergism: Investigation of the additive interaction of cinnamon bark oil and meropenem in combinatory therapy. *Molecules* 2017;22:1733.
 73. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to

- networks. *Nat Rev Microbiol* 2010 8:423–35.
74. Mullane EM, Avery LM, Nicolau DP. Comparative evaluation of the *in vitro* activities of WCK 5222 (cefepime-zidebactam) and combination antibiotic therapies against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e01669-19.
 75. 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;54:5316–22.
 76. Pankey G, Ashcraft D, Kahn H, Ismail A. Time-kill assay and Etest evaluation for synergy with polymyxin B and fluconazole against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5795–800.
 77. Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double-and triple-antibiotic combinations for VIM-and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. 2014;58:1757–62.
 78. Silva F, Lourenço O, Queiroz JA, Domingues FC. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *J Antibiot (Tokyo)* 2011;64:321–5.
 79. Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Miègeville AF, Donnio PY, Bugnon D, et al. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:857–64.
 80. Brennan-Krohn T, Kirby JE. Antimicrobial synergy testing by the inkjet printer-assisted automated checkerboard array and the manual time-kill method. *J Vis Exp* 2019;10.3791/58636.
 81. Avery LM, Nicolau DP. Feasibility of routine synergy testing using antibiotic gradient diffusion strips in the clinical laboratory. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:2264–5.
 82. Cuba GT, Rocha-Santos G, Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Gales AC, et al. *In vitro* synergy of ceftolozane/tazobactam in combination with fosfomycin or aztreonam against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2020;75:1874–8.

83. Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:359–68.
84. Drusano GL, Neely MN, Yamada WM, Duncanson B, Brown D, Maynard M, et al. The combination of fosfomycin plus meropenem is synergistic for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01682-18.
85. Antonello RM, Principe L, Maraolo AE, Viaggi V, Pol R, Fabbiani M, et al. Fosfomycin as partner drug for systemic infection management. A systematic review of its synergistic properties from *in vitro* and *in vivo* studies. *Antibiotics* 2020;9:500.
86. MacLeod DL, Velayudhan J, Kenney TF, Therrien JH, Sutherland JL, Barker LM, et al. Fosfomycin enhances the active transport of tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1529–38.
87. MacLeod DL, Barker LM, Sutherland JL, Moss SC, Gurgel JL, Kenney TF, et al. Antibacterial activities of a fosfomycin/tobramycin combination: a novel inhaled antibiotic for bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:829–36.
88. Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, Ohuchi M. Role of Ciprofloxacin in Its Synergistic Effect with Fosfomycin on Drug-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 2007;53:202–9.
89. Figueredo VM, Neu HC. Synergy of ciprofloxacin with fosfomycin *in vitro* against *Pseudomonas* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:41–50.
90. Buisson Y, Bercion R, Maucière P, Hugard L, Schill H. Preliminary study of the antagonistic effects between fosfomycin and beta-lactams on *Pseudomonas aeruginosa* observed on the antibiogram. *Pathol Biol (Paris)* 1988;36:671–4.
91. Reguera JA, Baquero F, Berenguer J, Martinez-Ferrer M, Martinez JL. Beta-lactam-fosfomycin antagonism involving modification of penicillin-binding protein 3 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2093–6.
92. Pruekprasert P, Tunyapanit W. *In vitro* activity of fosfomycin-gentamicin, fosfomycin-ceftazidime, fosfomycin-imipenem and ceftazidime-gentamicin combinations against

- ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005;36:1239–42.
93. Flamm RK, Rhomberg PR, Lindley JM, Sweeney K, Ellis-Grosse EJ, Shortridge D. Evaluation of the bactericidal activity of fosfomycin in combination with selected antimicrobial comparison agents tested against gram-negative bacterial strains by using time-kill curves. Antimicrob Agents Chemother 2019;63:e02549-18.
 94. Vicente M V., Olay T, Rodriguez A. Experimental endocarditis caused by *Streptococcus sanguis*: Single and combined antibiotic therapy. Antimicrob Agents Chemother 1981;20:10–4.
 95. Vogt K, Hahn H. Synergism between ciprofloxacin and fosfomycin against gram-negative bacteria *in vitro*. Zentralblatt für Bakteriologie 1989;272:225–30.
 96. Monogue ML, Nicolau DP. Antibacterial activity of ceftolozane/tazobactam alone and in combination with other antimicrobial agents against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2018;73:942–52.
 97. Jahan S, Davis H, Ashcraft DS, Pankey GA. Evaluation of the *in vitro* interaction of fosfomycin and meropenem against metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* using Etest and time-kill assay. J Investig Med 2021;69:371–6.
 98. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, et al. Evaluation of the synergy of ceftazidime-avibactam in combination with meropenem, amikacin, aztreonam, colistin, or fosfomycin against well-characterized multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2019;63:e00779-19.
 99. Papp-Wallace KM, Zeiser ET, Becka SA, Park S, Wilson BM, Winkler ML, et al. Ceftazidime-avibactam in combination with fosfomycin: A novel therapeutic strategy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 2019;220:666–76.
 100. Olsson A, Wistrand-Yuen P, Nielsen EI, Friberg LE, Sandegren L, Lagerbäck P, et al. Efficacy of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in automated time-lapse microscopy and static time-kill experiments. Antimicrob Agents Chemother 2020;64:e02111-19.
 101. K. Sharma, H. Sangraula PM. Some new concepts in antibacterial drug therapy. Indian

- J Pharmacol 2002;34:390–9.
102. Craig WA. The postantibiotic effect. Clin Microbiol Newsl 1991;13:121–4.
 103. Spivey JM. The postantibiotic effect. Clin Pharm 1992;11:865–75.
 104. Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DL, Craig WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. Clin Infect Dis 1981;3:28–37.
 105. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. 2001;45:781–5.
 106. Munckhof WJ, Borlace G, Turnidge JD. Postantibiotic suppression of growth of erythromycin A-susceptible and -resistant gram-positive bacteria by the ketolides telithromycin (HMR 3647) and HMR 3004. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1749–53.
 107. Bedenić B, Beader N, Godič-Torkar K, Prahin E, Mihaljević L, Čačić M, et al. Postantibiotic effect of colistin alone and combined with vancomycin or meropenem against *Acinetobacter spp.* with well defined resistance mechanisms. J Chemother 2016;28:375–82.
 108. Zhanel GG, Walkty AJ, Karlowsky JA. Fosfomycin: A first-line oral therapy for acute uncomplicated cystitis. Can J Infect Dis Med Microbiol 2016;2016:1–10.
 109. Staneva AD, Dimitrov DK, Gospodinova DN, Vladkova TG. Antibiofouling activity of graphene materials and graphene-based antimicrobial coatings. Microorganisms 2021;9:1839.
 110. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci 2020;21:1–25.
 111. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. Int J Infect Dis 2011;15:e732–9.
 112. Chai D, Liu X, Wang R, Bai Y, Cai Y. Efficacy of linezolid and fosfomycin in catheter-related biofilm infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed Res Int 2016;2016:1–7.
 113. Tré-Hardy M, Nagant C, El Manssouri N, Vanderbist F, Traore H, Vaneechoutte M, et

- al. Efficacy of the combination of tobramycin and a macrolide in an *in vitro* *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4409–15.
114. Su T, He J, Li N, Liu S, Xu S, Gu L. A rational designed PslG with normal biofilm hydrolysis and enhanced resistance to trypsin-like protease digestion. *Front Microbiol* 2020;11:760.
115. Monden K, Ando E, Iida M, Kumon H. Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *J Infect Chemother* 2002;8:218–26.
116. Mikuniya T, Kato Y, Kariyama R, Monden K, Hikida M, Kumon H. Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Acta Med Okayama* 2005;59:209–16.
117. Kumon H, Ono N, Iida M, Nickel JC. Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1038–44.
118. Bubonja-Sonje M, Matovina M, Skrobonja I, Bedenic B, Abram M. Mechanisms of carbapenem resistance in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Croatian hospital. *Microb Drug Resist* 2015;21:261–9.
119. Bošnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A, Jarža-Davila N, Šuto S, Kalenić S. VIM-2 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* 2010;42:193–7.
120. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43:3129–35.
121. Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, Di Gaetano V, Di Carlo P, Cipolla D, et al. A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:722–4.
122. Sardelic S, Bedenic B, Colinon-Dupuich C, Orhanovic S, Bosnjak Z, Plecko V, et al. Infrequent finding of metallo- β -lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2746–9.
123. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100, 30th edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
 124. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One* 2015;10:e0123690.
 125. Sachdeva R, Sharma B, Sharma R. Evaluation of different phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Lab Physicians* 2017;9:249–53.
 126. FDA. Ceptaz (ceftazidime for injection) [Internet]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/050646s014lbl.pdf England, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC 27709;
 127. Markou N, Markantonis SL, Dimitrakis E, Panidis D, Boutzouka E, Karatzas S, et al. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: A prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin Ther* 2008;30:143–51.
 128. Moni M, Sudhir S, Dipu TS, Mohamed Z, Prabhu BP, Edathadathil F, et al. Clinical efficacy and pharmacokinetics of colistimethate sodium and colistin in critically ill patients in an Indian hospital with high endemic rates of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: A prospective observational study. *Int J Infect Dis* 2020;100:497–506.
 129. FDA. Gentamicin injection [Internet]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/062366s033lbl.pdf 2013.
 130. Jenkins A, Thomson AH, Brown NM, Semple Y, Sluman C, MacGowan A, et al. Amikacin use and therapeutic drug monitoring in adults: do dose regimens and drug exposures affect either outcome or adverse events? A systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2754–9.
 131. FDA. Amikacin Sulfate [Internet]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/64146AP.PDF Abbott

laboratories, North Chicago, IL 60064, USA;

132. FDA. Primaxin (imipenem and cilastatin) for injection, for intravenous use [Internet]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050587s074lbl.pdf 2016.
133. Li RC, Tang MC. Post-antibiotic effect induced by an antibiotic combination: influence of altered susceptibility to individual components. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:583–6.
134. Ferrara A, Santos C Dos, Cimbro M. Postantibiotic effect of meropenem in combination with gentamicin or sparfloxacin on Gram-positive and Gram-negative organisms. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:431–5.
135. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115:891–9.
136. Liu Y, Wu L, Han J, Dong P, Luo X, Zhang Y, et al. Inhibition of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to four natural antimicrobial compounds and sodium hypochlorite. *Front Microbiol* 2020;11:617473.
137. Bernal-Mercado A, Vazquez-Armenta F, Tapia-Rodriguez M, Islas-Osuna M, Mata-Haro V, Gonzalez-Aguilar G, et al. Comparison of single and combined use of catechin, protocatechuic, and vanillic acids as antioxidant and antibacterial agents against uropathogenic *Escherichia Coli* at planktonic and biofilm levels. *Molecules* 2018;23:2813.
138. Warraich AA, Mohammed AR, Perrie Y, Hussain M, Gibson H, Rahman A. Evaluation of anti-biofilm activity of acidic amino acids and synergy with ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Sci Rep* 2020;10:9021.
139. Wickremasinghe H, Yu HH, Azad MAK, Zhao J, Bergen PJ, Velkov T, et al. Clinically relevant concentrations of polymyxin B and meropenem synergistically kill multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and minimize biofilm formation. *Antibiotics* 2021;10:405.
140. Das MC, Sandhu P, Gupta P, Rudrapaul P, De UC, Tribedi P, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with

- azithromycin and gentamicin. *Sci Rep* 2016;6:23347.
141. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci* 2018;6:1.
 142. Di X, Wang R, Liu B, Zhang X, Ni W, Wang J, et al. *In vitro* activity of fosfomicin in combination with colistin against clinical isolates of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot (Tokyo)* 2015;68:551–5.
 143. Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MAH. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol* 2020;51:1079–92.
 144. Díez-Aguilar M, Morosini MI, Köksal E, Oliver A, Ekkelenkamp M, Cantón R. Use of Calgary and microfluidic BioFlux systems to test the activity of fosfomicin and tobramycin alone and in combination against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e01650-17.
 145. Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomicin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:563–6.
 146. Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomicin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother* 2007;13:285–90.
 147. Agyeman AA, López-Causapé C, Rogers KE, Lucas DD, Cortés-Lara S, Gomis-Font MA, et al. Ceftolozane/tazobactam plus tobramycin against free-floating and biofilm bacteria of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strains: Resistance mechanisms and synergistic activity. *Int J Antimicrob Agents* 2023;62:106887.
 148. Habash MB, Park AJ, Vis EC, Harris RJ, Khursigara CM. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5818–30.
 149. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens* 2013;2:288–356.

8 ŽIVOTOPIS

Mia Slade Vitković rođena je u Zagrebu 28.03.1985. godine, gdje je završila osnovnu školu i jezičnu XVI. gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2003. godine, a diplomirala je 2009. godine.

Obvezni pripravnički staž završila je pri Klinici za dječje bolesti u Zagrebu. Državni ispit pri Ministarstvu Zdravstva položila je 2011. godine. Od 2011. godine radi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, najprije kao liječnik na prikupljanju krvi a zatim u 2014. godini dobiva specijalizaciju iz kliničke mikrobiologije. Specijalizaciju najvećim dijelom provodi na Kliničkom bolničkom centru Zagreb, gdje razvija interes za probleme otpornosti bakterija na antibiotike.

Od 2014. godine također je i aktivni predavač prve pomoći osobama ozlijeđenima u prometnim nesrećama za autoškole pri Hrvatskom Crvenom križu u Zagrebu.

Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti upisala je 2018. godine pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Specijalistički ispit položila je 2019. godine te od tada radi na Odjelu za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

Aktivno sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajne edukacije. Autor je jednog i koautor tri znanstvena rada indeksirana u bazi Current Contents te autor odnosno koautor 12 sažetaka s domaćih i međunarodnih kongresa i simpozija.

Član je Hrvatske liječničke komore.

Udana je i majka dvoje djece.

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

1. Slade-Vitković M, Batarilo I, Bielen L, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B. *In Vitro* Antibiofilm Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Other Antibiotics against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals*. 2024;17:769. <https://doi.org/10.3390/ph17060769>

2. Batarilo I, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B, Slade-Vitković M. *Enterobius vermicularis* family infection detected by urine sediment screening. *Acta Med Croatica*, 2022;76:273-276.
3. Slade-Vitković M, Bedenić B, Bielen L, Batarilo I, Kibel S, Maravić-Vlahoviček G. *In vitro* killing of multidrug/extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by fosfomicin alone or in combination with antipseudomonal antibiotics, *J Chemother*. 2023;35:219-230. doi:10.1080/1120009X.2022.2108247.
4. Batarilo I, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B, Kazazić S, Bingulac-Popovic J, Slade-Vitković M, et al. Oxacillinases and antimicrobial susceptibility of *Ralstonia pickettii* from pharmaceutical water systems in Croatia. *Lett Appl Microbiol*. 2022;75:103-113. doi:10.1111/lam.13711.
5. Bedenić B, Siroglavić M, Slade M, Šijak D, Dekić S, Šeruga-Musić M, et al. Comparison of clinical and sewage isolates of *Acinetobacter baumannii* from two long-term care facilities in Zagreb; mechanisms and routes of spread. *Arch Microbiol*. 2020;202:361-368. doi:10.1007/s00203-019-01750-9.
6. Bedenić B, Slade M, Žele Starčević L, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, et al. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol*. 2018;67:1031-1041. doi:10.1099/jmm.0.000777.

KONGRESNA PRIOPĆENJA

1. Slade M, Bielen L, Bader N, Maravić-Vlahoviček G., Batarilo I, Bedenić B. The *in vitro* effect of fosfomicin alone and in combination with antipseudomonal antibiotics on inhibition and disruption of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Copenhagen, Knjiga sažetaka (2023), 636/P0955, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
2. Slade M, Bader N, Bielen L, Batarilo I, Kibel S, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B. Synergistic activity of fosfomicin in combination with antipseudomonal antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with various resistance phenotypes, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Lisabon, Portugal, Knjiga sažetaka (2022), P0778, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. Mia S, Batarilo I, Gulan Harcet J, Ljubičić J, Jukić I. Skrining koncentrata trombocita prikupljenih aferezom u periodu od studenog 2019. do rujna 2021. – rezultati, 8. Hrvatski transfuziološki kongres, Zagreb, Liječnički vjesnik (2021), str. 90-91 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, stručni).
4. Slade M, Batarilo I, Vuk T, Jukić I. Može li krvni pripravak biti uzrokom infekcije? Bakterijska kontaminacija krvnih pripravaka - rezultati praćenja u HZTM za period 2008.-2017., CROCMID 2019. Split, Knjiga sažetaka (2019), str. 178-178 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
5. Batarilo I, Slade M, Jukić I. Pregledom sedimenta urina do dijagnoze enterobijaze među članovima obitelji - Prikaz slučaja, CROCMID 2019. Split, Knjiga sažetaka (2019) str. 304-304 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
6. Batarilo I, Maravić-Vlahoviček G, Bedenić B, Bingulac Popović J, Slade M, Đogić V, et al.. Susceptibility to β -lactam antibiotics and presence of *bla*_{OXA22} and *bla*_{OXA60} genes in *Ralstonia pickettii* strains in Croatia, CESAR, Sv. Martin na Muri, Knjiga sažetaka (2018) str. 101-101 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
7. Bedenić B, Slade M, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Zujčić Atalić V, Bogdan M, et al. Epidemic diffusion of OXA-48 beta-lactamase in Croatia, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Madrid, Španjolska, Knjiga sažetaka (2018), P1060 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
8. Bielen L, Bedenić B, Slade M, Siroglavić M, Varda-Brkić D, Tot T, et al. Cross resistance to fosfomicin in multidrug- resistant *Klebsiella pneumoniae* European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Madrid, Španjolska, Knjiga sažetaka (2018), E0124 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
9. Bedenić B, Beader N, Siroglavić M, Slade M, Car H, Dekić S, et al. *Acinetobacter baumannii* from a sewage of a nursing home in Croatia, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Madrid, Španjolska, Knjiga sažetaka (2018), E0143 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
10. Mareković I, Horvatić J, Versporten A, Bošnjak Z, Pleško S, Varda Brkić D, et al. The global point-prevalence survey of antimicrobial consumption and resistance (Global-PPS): antimicrobial prescribing in the University Hospital Centre Zagreb, Croatia, European congress for clinical microbiology and infectious diseases, Madrid,

Španjolska, Knjiga sažetaka (2018), E0035 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

11. Slade M, Batarilo I, Jukić I. *Enterobacter cloacae* u koncentratu trombocita 7. Hrvatski transfuziološki kongres, Zagreb, Liječnički vjesnik, (2017) str. 38-39 (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
12. Đidara I, Batarilo I, Slade M, Rukavina L, Šnajder-Šajatović M, Jukić I. Kontrola radne okoline u Odsjeku za savjetovanje, uzimanje i transport krvi, rezultati petogodišnjeg praćenja, 6. Stručni sastanak medicinskih sestara i tehničara u transfuzijskoj medicini; Biograd n/m, Knjiga sažetaka, (2017), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
13. Rukavina L, Batarilo I, Slade M, Đidara I, Šnajder-Šajatović M. Metode i obrada uzoraka iz Banke tkiva, 7. Hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, Knjiga sažetaka (2017), (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).
14. Batarilo I, Slade M, Strauss Patko M, Liker M, Jukić I. The most common isolates of microbiological environmental monitoring in the blood production department in the Croatian Institute of transfusion medicine, ISBT, Kopenhagen, Vox Sanguinis (2017), str. 181-181 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
15. Batarilo I, Saftić R, Gulan Harcet J, Strauss Patko M, Slade M, Jukić I. Can *Staphylococcus epidermidis* from blood products be dangerous for patients subjected to arthroplasty? The importance of communication between blood bank and clinician, ISBT, London, Vox sanguinis (2015) str. 109-109 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
16. Slade M, Batarilo I, Cipek V, Maglov Č. Mikrobiološki nadzor radne okoline u odsjeku za savjetovanje, uzimanje i transport krvi (DUT). 6. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Liječnički vjesnik (2014), Rovinj, Hrvatska, (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni).

9 POPIS KRATICA

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion (moždano-srčani bujon)

CD – Combined Disc test (kombinirani disk test s EDTA)

CIM - Carbapenem Inactivation Method (test inaktivacije karbapenema)

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute (Institut za kliničke i laboratorijske standarde)

CFU - Colony Forming Units (broj izraslih kolonija)

DD – Disk Difuzija

DNA – Deoxyribonucleic Acid (deoksiribionukleinska kiselina)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (etilen diamin tetraoctena kiselina)

ESBL - Extended Spectrum β -lactamase (β -laktamaze proširenog spektra)

FICI - Fractional Inhibitory Concentration (frakcijski Inhibitorni Koncentracijski Indeks)

GDSC - Gradient Diffusion Strip Cross Cethod (metoda ukriženih trakica)

I – Intermediate (smanjeno osjetljiv)

IDSA - Infectious Diseases Society of America (Američko društvo zaraznih bolesti)

KPC - Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase

MALDI-TOF - Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight (matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom - analizator masa vremenom leta)

MBP – Moderate Biofilm Producer (umjereni proizvođač biofilma)

MDR - Multidrug-resistant (višestruko otporna)

MHA - Mueller-Hinton Agar

MHB - Mueller-Hinton Bujon

MIK – Minimalna Inhibitorna Koncentracija

NBP – No-biofilm Producer (neproizvođač biofilma)

OD - Optical Density (optička gustoća)

ODc - Optical Density Cut-off value (prijelomna točka optičke gustoće)

PAE - Post Antibiotic Effect (postantibiotički učinak)

Pb – Parovi baza

PBP – Penicillin Binding Protein, (protein koji veže penicilin)

PCR - Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)

PFGE - Pulse-field Gel Electrophoresis (gel elektroforeza u pulsirajućem polju)

PDR - Pandrug-resistant (potpuno ili posvemašnje otporna)

R – Resistant (otporni)

S – Susceptible (osjetljivi)

SBP – Strong Biofilm Producer (jaki proizvođač biofilma)

TSA - Trypton Soja Agar

TSB - Tryptic Soy Bujon

VAP - Ventilator-associated Pneumonia (upala pluća povezana s mehaničkom ventilacijom)

WBP – Weak Biofilm Producer (slabi proizvođač biofilma)

XDR - Extensively Drug-resistant (prošireno otporna)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

UČINAK FOSFOMICINA *IN VITRO* U KOMBINACIJI S DRUGIM ANTIBIOTICIMA PREMA KLINIČKIM IZOLATIMA I BIOFILMU BAKTERIJE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mia Slade Vitković

SAŽETAK

Pseudomonas aeruginosa (PA) jedan je od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. Uzrokuje zabrinutost s obzirom na stalni porast otpornosti na antibiotike i mogućnost stvaranja biofilma. Stari antibiotik fosfomicin sve se češće koristi u terapiji sistemnih infekcija uzrokovanih otpornim bakterijama. Bolja učinkovitost može se postići kombiniranim davanjem antibiotika. Cilj istraživanja bio je odrediti *in vitro* sinergiju fosfomicina s 8 antibiotika koji se koriste u liječenju PA infekcija na izolatima te bakterije s različitim determinantama rezistencije. Cilj je također bio ispitati postantibiotički učinak fosfomicina samog i u kombinaciji s istim antibioticima i utvrditi učinak kombinacija vršnih koncentracija antibiotika na inhibiciju i razaranje biofilma koji stvaraju otporni izolati te bakterije. Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je metodom disk difuzije i određivanjem minimalnih inhibitory koncentracija. Prisustvo β -laktamaza utvrđeno je fenotipskim testovima i lančanom reakcijom polimeraze. Metodom ukriženih trakica i „*time-kill*“ metodom ispitana je sinergija. Postantibiotički učinak je određen metodom brojanja poraslih kolonija po uklanjanju antibiotika kojemu su bakterije bile izložene. Stvaranje biofilma, inhibicija formiranja i disrupcija biofilma ispitani su statičkim testom u mikrotitarskim pločicama s kristal violetom. Otpornost na fosfomicin registrirana je kod značajnog dijela kliničkih izolata *P. aeruginosa* (52,9 %). Najveća stopa sinergije određena metodom ukriženih trakica postignuta je u kombinacijama fosfomicina s ceftazidimom (21,6 %) i gentamicinom (17,7 %), a „*time-kill*“ metodom s kolistinom i gentamicinom. Iako su sve kombinacije s antibioticima produljile postantibiotički učinak, najbolji rezultat postignut je u kombinaciji s kolistinom. Negativne vrijednosti PAE nisu zabilježene niti s jednom kombinacijom. Prema rezultatima ispitivanja biofilma u mikrotitarskim pločicama svi ispitani sojevi bili su proizvođači biofilma. Predominantno je registriran učinak kombinirane terapije na inhibiciju stvaranja biofilma. Kombinirana terapija bila je učinkovitija u sprječavanju nastanka biofilma od monoterapije, čak i kod izolata otpornih na pojedinačno primijenjene antibiotike. Najviše stope inhibicije stvaranja biofilma zabilježene su u kombinacijama s kolistinom, cefepimom i ceftazidimom. Kombinacije s ispitivanim β -laktamskim antibioticima i kolistinom imale su snažniji učinak na inhibiciju formiranja biofilma od inhibitora sinteze proteina. Rezultati dobiveni u ovoj studiji mogli bi biti klinički značajni u pogledu terapije različito otpornog *P. aeruginosa*, ali i profilakse stvaranja biofilma kod takvih izolata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad sadrži: 119 stranica, 26 slike, 13 tablica, 149 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: *Pseudomonas aeruginosa*, višestruko otporna bakterija, prošireno otporna bakterija, fosfomicin, sinergija antibiotika, „*time-kill*“ metoda, metoda ukriženih trakica, postantibiotički učinak, biofilm, inhibicija stvaranja biofilma, razaranje biofilma

Mentori: Prof. dr. sc. Branka Bedenić, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Izv. Prof. dr. sc. Ivana Perković, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Prof. dr. sc. Amarela Lukić-Grlić, Klinika za dječje bolesti Zagreb

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral Thesis

IN VITRO EFFECT OF FOSFOMYCIN COMBINED WITH OTHER ANTIBIOTICS ON CLINICAL ISOLATES AND BIOFILM OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mia Slade Vitković

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa (PA) is one of the leading causes of hospital infections. It is a cause for concern given the rapid antibiotic resistance development and the ability of biofilm formation. Fosfomycin has recently reemerged as an interesting treatment option for antimicrobial-resistant infections, and combination therapy is an important treatment alternative. The aim of this research was to determine *in vitro* synergy of fosfomycin with 8 antibiotics used for treatment of PA infections on variously resistant PA isolates. The aim was also to examine the postantibiotic effect of fosfomycin alone and in combination with those antibiotics and to determine inhibition and disruption of PA biofilm in the presence of peak plasma concentrations of those antibiotics alone and in combination with fosfomycin. Antibiotic susceptibility was determined using the disk diffusion method and the microdilution method. The presence of β -lactamases was determined using phenotypic tests and polymerase chain reaction. Synergy was determined using the gradient diffusion strip cross method (GDSC) and the "time-kill" method. The post-antibiotic effect was determined by the viable colony counting method after antibiotic removal. Biofilm formation, inhibition of biofilm formation and disruption were determined using the crystal violet microtiter plate assay. Resistance to fosfomycin was registered in a significant part of clinical isolates of *P. aeruginosa* (52.9 %). The highest synergy rate determined using the GDSC method was observed for combinations with ceftazidime (21.6 %) and gentamicin (17.7 %) and using the "time-kill" method with colistin and gentamicin. Although all antibiotic combinations prolonged the postantibiotic effect, the best result was achieved in combination with colistin. Negative PAE values were not recorded. All tested isolates were biofilm producers. The effect of combination therapy was predominantly registered in prevention of biofilm formation. Combination therapy was more effective in preventing biofilm formation than monotherapy, even in isolates resistant to individually administered antibiotics. The highest inhibition rates of biofilm formation were recorded in combinations with colistin, cefepime and ceftazidime. Combinations with β -lactam antibiotics and colistin had a stronger effect on the inhibition of biofilm formation than protein synthesis inhibitors. The results of this study could be clinically valuable not only regarding treatment of variously resistant *P. aeruginosa* isolates, but also regarding biofilm formation profilaxis of those isolates.

The thesis is stored in the Central Library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Thesis includes: 119 pages, 26 figures, 13 tables and 149 references. The original is in Croatian language.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug-resistant, extensively drug-resistant, fosfomycin, antibiotic synergy, "time-kill" method, cross strip method, post-antibiotic effect, biofilm, inhibition of biofilm formation, biofilm destruction


Supervisors: Branka Bedenić, Ph.D., Full professor, School of Medicine, University of Zagreb
Gordana Maravić Vlahoviček, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Reviewers: Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Ivana Perković, Ph.D. Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Prof. dr. sc. Amarela Lukić-Grlić, Ph.D., Full Professor, Children's hospital Zagreb

Rad prihvaćen:



In vitro killing of multidrug/extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by fosfomycin alone or in combination with antipseudomonal antibiotics

Mia Slade-Vitković^{a,c} , Branka Bedenić^{b,c}, Luka Bielen^c, Ivanka Batarilo^a, Sara Kibel^d and Gordana Maravić-Vlahoviček^e

^aCroatian Institute for Transfusion Medicine, Zagreb, Croatia; ^bSchool of Medicine, University of Zagreb, Croatia; ^cClinical Hospital Centre Zagreb, Croatia; ^dUniversity Hospital Centre Osijek, Croatia; ^eFaculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a leading cause of nosocomial infections. Given the constant rise in resistance, adequate therapy is increasingly demanding. Fosfomycin recently became an appealing treatment option of bacterial infections due to multidrug-resistant bacteria (MDR). So far, fosfomycin synergy with other antibiotics has been assessed in studies, but only a limited number focused on MDR *P. aeruginosa* and on the effect of these combinations on the duration of the postantibiotic effect (PAE). We investigated synergy of fosfomycin with an array of antipseudomonal antibiotics using gradient diffusion strip cross method and time-kill method, and their effect on the duration of PAE against 51 variously resistant *P. aeruginosa* isolates. The highest rate of synergy was observed for combination with ceftazidime (23.4%) and gentamicin (19.1%). The PAE of antibiotic combinations was superior to that of the drugs alone. Our findings indicate that fosfomycin combination therapy may be a valuable treatment alternative.

ARTICLE HISTORY

Received 29 January 2022
Revised 14 June 2022
Accepted 27 July 2022

KEYWORDS

Pseudomonas aeruginosa;
fosfomycin; antibiotic
synergy; time-kill method;
gradient diffusion strip
method; postantibiotic
effect

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an important hospital pathogen causing a variety of infections such as ventilator associated pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, wound and burn infections. Therapy of infections with resistant isolates pose a serious challenge to clinicians because of its chromosomal, intrinsic, and acquired resistance traits [1–3]. Acquired resistance to β -lactam antibiotics in *P. aeruginosa* is partly due to the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) belonging to SHV, GES, VEB, BEL, PME and PER family and more frequently to the production carbapenemases of class A (KPC, GES), B (VIM, IMP, DIM, NDM, AIM, FIM, AIM) and D [1,4,5]. Hyperexpression of chromosomal AmpC β -lactamases, upregulation of efflux systems (MexAB, MexCD, MexEF) and decreased outer membrane permeability caused by modification of OprD porin contribute to resistance [5,6]. For that reason, clinicians rely on antibiotic combinations to treat infections associated with multidrug (MDR) or extensively drug resistant (XDR) *P. aeruginosa*. Fosfomycin does not exhibit cross resistance with other antibiotic

classes and has been shown to exert synergy with antibiotics belonging to other classes. Fosfomycin monotherapy is not recommended, as rapid emergence of resistance has been reported [7–9], but the drug may increase membrane permeability for other antimicrobials, even those to which the bacteria are resistant to, rendering them susceptible when administered in combination [7,10,11]. Because of its specific mechanism of action and preserved activity against MDR bacteria, there is growing interest in fosfomycin usage for the treatment of highly resistant microbial infections, including those associated with MDR *P. aeruginosa*.

Synergy studies are a valuable tool to assess potential alternative treatment strategies especially against MDR and XDR pathogens and to aid clinicians in the optimal antibiotic combination choice in times of limited options. Data from studies for *in vitro* synergism of fosfomycin in combination with other antibiotics have been variable and, regarding some antibiotics, based on a limited number of isolates without defined resistance phenotypes [7,8,11–21]. Also, a substantial amount was published before year 2005 with very

heterogeneous definitions of synergy. Recent studies have shown synergy of fosfomycin with different β -lactam antibiotics [11,15–17], aminoglycosides [16,18,19], quinolones [7,16,20,21], and polymyxins [7]. However, the rate of synergy depended on the method used to detect it. According to a 2020 review study, fosfomycin exhibited synergy mostly with chloramphenicol (53%), aminoglycosides (43%) and cephalosporins (36%) [22]. Moreover, antagonism has been reported with β -lactam antibiotics, quinolones and aminoglycosides [12–14,22]. So far, evidence of synergy in MDR and XDR isolates, particularly those harbouring metallo- β -lactamases (MBLs), compromising therapy with antipseudomonal β -lactam antibiotics except of monobactams, are extremely scarce. Only a few studies evaluated the effect of combination therapy on MDR or carbapenem resistant *P. aeruginosa*, mostly using few antibiotic combinations [7,8,11,15,23–27]. Ceftazidime and imipenem displayed high rates of synergy, followed by cefepime, colistine and piperacillin/tazobactam.^{8,11} Also, improvements in bacterial killings have been reported in combination with ciprofloxacin in three of four clinical isolates [7]. To our knowledge, no bibliographic data covering XDR isolates is available.

Analysis of *in vitro* synergy of antibiotics is usually performed by checkerboard method, time-kill technique (TK), and gradient diffusion strip (GDS) cross method, which demonstrate low or moderate level of concordance and questionable correlation with clinical studies [28–30]. The GDS cross method determines bacteriostatic activity, while the time-kill method determines bactericidal activity of antibiotics in combinations. Since the methods are based on different effects, discrepancy between results is expected.

The postantibiotic effect (PAE) is a parameter linked to the pharmacokinetics of an antimicrobial and could be used in modulation of dosage regimes [31]. Only a few studies have recorded a modest fosfomycin PAE (0,3 - 2,5 h with concentrations of 4 mg/L and 1.1 – 5.5 h with concentrations of 256 mg/L) against clinical isolates of *P. aeruginosa in vitro* [9,19]. There are no reports on the effect of fosfomycin combination on the duration of PAE. This void in evidence calls for further investigation, as a less frequent dosage regime may be of value in regard of drug toxicity.

In this study we analysed the synergistic effect of fosfomycin in combination with other antibiotics active on *P. aeruginosa* using time-kill technique and GDS cross method. A considerable number of antibiotics of several classes have been included, some of

which, to our knowledge, have not previously been tested either using these methods, or against MDR and XDR *P. aeruginosa* isolates. The aim was to determine the most successful antibiotics to be combined with fosfomycin against clinical isolates of *P. aeruginosa* with various resistance patterns and resistance genes content, including MDR and XDR isolates, and to determine the effect of different antibiotics on the duration of PAE induced by fosfomycin.

Material and methods

Bacterial isolates

In total 51 *P. aeruginosa* isolates included in the study were collected from various clinical specimens in five hospital centres in Croatia: University Hospital Centre Zagreb, University Hospital Centre Osijek, University Hospital Centre Split, General Hospital Pula, General Hospital Bjelovar and General Hospital Slavonski brod. The isolates were identified by Vitek 2 or MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) (Microflex LT mass spectrometer, Bruker Daltonics, Illinois, USA). Six isolates from Split were identified as positive for VIM-2 in previous studies [32]. The isolates harbouring PER-1 and coharbouring PER-1 and VIM-2 were kindly provided by G. M. Rossolini (Microbiology and Virology Unit, Careggi University Hospital, 50134 Florence, Italy).

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility testing to antipseudomonal antibiotics was performed by disc-diffusion and broth microdilution method in 96 well microtiter plates and Mueller-Hinton broth (MHB) according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [33]. Antibiotic powders were purchased from Sigma-Aldrich, prepared as stock solutions (5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and diluted in sterile water. The range of antibiotic concentrations 0.12 to 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared stepwise, doubling dilutions in Mueller Hinton broth. The dilutions (50 μL) were dispensed into wells of the microtiter plates with a multichannel pipette. Overnight broth culture of the tested strain was diluted to correspond to 0.5 McFarland and then diluted 1:100 to reach an inoculum size of 5×10^5 CFU/mL. The samples were added to the microtiter plates in the amount of 50 μL and a final concentration range of 0.06 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was obtained. The plates were incubated overnight at 37 °C. The MIC was determined as the lowest

antibiotic concentration that prevented visible growth of bacteria.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of fosfomycin was determined by agar dilution test and E-test. A breakpoint value of $>64 \mu\text{g/mL}$ was used to define resistance [34]. The isolates were classified as susceptible (S), multidrug (MDR), extensively drug resistant (XDR) and pandrug resistant (PDR) according to Magiorakos et al. [35] MDR isolates are resistant to at least one antibiotic in three different antibiotic classes, whereas XDR isolates are susceptible to only two antibiotics belonging to different classes, usually to amikacin and colistin. S isolates are wild type strains without acquired resistance mechanisms. PDR isolates are resistant to all available antibiotics.

AmpC phenotype detection

The AmpC disc test was performed on Mueller Hinton agar (MHA) plates inoculated with a suspension of 0.5 McFarland (10^8 CFU/mL) of the tested isolate. Ceftazidime (30 μg) and cefepime (30 μg) discs were placed on the plate alone and in combination with 400 μg of phenylboronic acid (PBA). Plates were incubated overnight at 35 °C. A ≥ 5 mm increase of the zone diameter in combination with PBA was considered AmpC hyperexpression [36].

Phenotypic detection of carbapenemases

The modified Hodge test

The modified Hodge test was performed on Mueller Hinton agar (MHA) plates inoculated with a suspension of 0.5 McFarland of the indicator strain *E. coli* ATCC 25922. A 10 μg meropenem disc was placed in the centre of the plate and a straight line of the tested isolate was streaked from the edge of the disc to the edge of the plate. Plates were incubated overnight at 35 °C. Growth of the indicator strain in a clover leaf-like indentation along the tested organism was considered a positive result and the absence of growth was labelled as a negative one [37].

The carbapenem inactivation method (CIM)

Ten μg meropenem discs were immersed in a thick suspension of tested organisms and incubated for 2 h at 35 °C. MHA plates were inoculated with *E. coli* ATCC 25922. Meropenem discs were removed from the suspension, placed on the inoculated MHA plates, and incubated at 35 °C for 24 h. The test was considered positive if the zone diameter was ≤ 15 mm or if

there were colonies growing inside the inhibition zone [38].

Combined disc (CD) test for detection of metallo- β -lactamases (MBL)

Two imipenem and two meropenem discs were placed on a MHA plate previously inoculated with a 0.5 McFarland suspension of the tested isolate. Ten μL of a 0.5 M EDTA solution was added to one imipenem and one meropenem disc. The plates were incubated overnight at 36 °C. Augmentation of the inhibition zone of ≥ 7 mm around EDTA containing discs compared to control discs without EDTA indicated possible MBL production [39,40].

Molecular detection of carbapenemase genes

The presence of genes encoding metallo- β -lactamases belonging to VIM, IMP and NDM family was determined by polymerase chain reaction (PCR) as previously described [41–44]. DNA was extracted by boiling method. Briefly, five colonies were suspended in 500 μL of ultrapure water, boiled at 95 °C for 10 minutes in the heat block, and spun in the bench centrifuge to remove the pellet. Clear supernatant was used as the DNA template. Reaction mixtures of 50 μL were prepared using 25 μL of EmeraldAmp Max PCR Master Mix, Takara, 20 μL ultrapure water, 1 μL of each primer and 3 μL of the DNA template. Primers VIM-F (5'-CAG-ATT-GCC-GAT-GGT-GGT-TGG-3') and VIM-R (5'-AGG-TGG-GCC-ATT-CAG-CCA-GA-3') were used to amplify *bla*_{VIM} genes, primers IMP-F (5'-GAA-GGY-GTT-TAT-GTT-CAT-AC-3') and IMP-R (5'-GTA-MGT-TTC-AAG-AGT-GAT-GC-3') for the amplification of *bla*_{IMP} genes, whereas primers NDM-F (5'-AAT-GGA-ATT-GCC-CAA-TAT-TAT-GC-3') and NDM-R (5'-CGA-AAG-TCA-GGC-TGT-GTT-GC-3') were used to detect *bla*_{NDM} genes. The amplification was done in Alpha AC Thermal cycler, Ac-196, (Cole-Palmer, Ltd, Staffordshire, UK). For the amplification of *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes the following reaction conditions were used: initial denaturation at 94 °C/5 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C/1 min, annealing at 55 °C/1 min and elongation at 72 °C/1 min followed by final extension 72 °C/5 min. The cycling conditions of *bla*_{NDM} genes were as follows: initial denaturation at 94 °C/5 min, 35 cycles of denaturation at 95 °C/30 s, annealing at 58 °C/30 s and elongation at 72 °C/30 s followed by final elongation at 72 °C/10 min. PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis, at UV illuminator, after staining with ethidium bromide. The size of the PCR amplicon was

determined using the DNA ladder (DNA mol. weight marker XIV, Medical Intertrade, Zagreb, Croatia).

Synergy testing

Synergy was determined by gradient diffusion strips cross method (GDC) and time-kill assays. GDC was performed on MHA plates. The strips were set at a 90° with the strip crossing point at the MIC of each antibiotic determined separately. MHA plates with inoculated bacterial suspensions and strips with an antibiotic concentration gradient were incubated overnight at 36 °C. MIC of antibiotic A in combination with antibiotic B and the MIC of antibiotic B in combination with antibiotic A were determined to calculate the fractional inhibitory concentration index (FICI). FICI is defined as $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_A^{combined}}{MIC_A^{alone}} + \frac{MIC_B^{combined}}{MIC_B^{alone}}$. FICI values ≤ 0.5 denote synergism, values from 0.5 to ≤ 1 denote an additive effect, from 1 to ≤ 4 are considered indifferent and values > 4 are considered antagonistic [29,45]. The following antibiotics were tested for synergy effect: ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, imipenem and colistin.

Time-kill assays were done in MHB as previously described. For the time-kill assay four isolates were selected, according to their resistance phenotype, presence of MBLs and GDSC method results: P14 as a VIM positive XDR isolate, P32 and P45 as MDR isolates without detected carbapenemases, and P36 as a MDR isolate, which exhibited synergy in five combinations when GDSC was performed: ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, gentamicin and ciprofloxacin. An overnight broth culture was diluted to 0.5 McFarland then diluted 1:100, incubated for 2 h at 37 °C to reach the starting inoculum of 10^6 - 10^7 CFU/mL and exposed to fosfomycin alone or combined with other antibiotics for 24 h. Antibiotic concentrations used during time-kill experiments represented peak concentrations of non-protein bound drug in human body fluids according to the bibliographic data for ceftazidime (170 µg/mL) [46], cefepime (131 µg/mL), piperacillin/tazobactam (210/24 µg/mL), ciprofloxacin (2.8 µg/mL), fosfomycin (395 µg/mL) [23], gentamicin (9 µg/mL) [47], amikacin (38 µg/mL) [23,48], imipenem (55 µg/mL) [49] and colistin (2.9 µg/mL) [50–52]. An unexposed control was run in parallel. Bacterial counts at times 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h were determined by viable counting. The experiments were done in duplicate. Synergy was defined as ≥ 2 log₁₀ decrease in colony count at 24 h

with the antimicrobial combination compared to the most active single agent. Indifference was defined as a decrease or increase < 2 log₁₀ CFU/mL after 24 h, and antagonism as an increase ≥ 2 log₁₀ CFU/mL after 24 hours in comparison to the most potent antibiotic alone. Bactericidal effect was defined as ≥ 3 log₁₀ decrease ($> 99.9\%$) in the colony count after 24 h compared with the starting inoculum [29,53]. Bacteriostatic activity was defined as maintenance of the original inoculum concentration or a reduction of less than 99.9% (< 3 log₁₀) of the total number of CFU/mL in the original inoculum [54,55].

The postantibiotic effect (PAE)

The PAE was determined by a standard viable counting method for the four isolates used in the time-kill study [56,57]. Strains were incubated overnight, diluted 1:100 in prewarmed MHB and incubated in the shaking water bath for 2 h to reach the logarithmic phase of growth before addition of an antibiotic or a combination of antibiotics. The starting inoculum was adjusted to 10^6 - 10^7 CFU/mL. After 2 h antibiotics were removed by centrifugation and cells were washed twice in saline solution. The pellet was resuspended in 5 mL of prewarmed MHB and further incubated with shaking for 24 h. The samples were withdrawn at time zero, immediately after centrifugation, and then every two hours at 4, 6 and 8 h and after 24 h. Fifty µL of 10-fold dilutions were spread on MacConkey agar plates. Antibiotic carryover was prevented by dilution of the sample and spreading it over the whole plate. Plates were read after incubation of 18 h at 37 °C. A growth control without antibiotic exposure was performed in the same way. PAE was calculated according to the following formula: $PAE = T - C$, where T is the time required for the viable counts of the antibiotic exposed cultures to increase by 1 log₁₀ above the counts observed immediately after dilution, and C is the corresponding time for the unexposed culture [56,58]. PAE values of 0-2 h were considered short, 2-4 h moderately long, and prolonged if they were > 4 h [59]. When the PAE induced by the combination of drugs was at least 1 h longer than the sum of the PAEs of individual antibiotics, the combination was considered synergistic. When the PAE was similar to or shorter than the sum of the effect of each antibiotic individually, it was categorized as additive or antagonistic, respectively. Addition is considered as an effect roughly similar to the sum of individual effects, and indifference as a combination effect no different from the

Table 1. Susceptibility of *P. aeruginosa* isolates, resistance phenotype and β -lactamase detection.

Isolate	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a										Phenotype ^b	AmpC ^c	CIM ^d	HODGE ^d	CD ^d	<i>bla</i> genotype ^e
	FOM	CAZ	FEP	TZP	IMI	MEM	GM	CIP	COL	AMI						
P1	128	64	32	128	128	>128	>128	32	1	8	XDR	-	+	+	+	VIM
P2	>256	>128	>128	>128	64	32	>128	64	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P3	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
P4	128	128	32	32	128	>128	>128	32	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P5	128	128	16	64	128	>128	1	2	1	2	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P6	>256	64	32	64	128	>128	32	64	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P7	256	64	32	128	128	>128	32	32	1	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P8	64	32	16	64	128	>128	32	32	1	32	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P9	128	64	32	32	32	>128	32	32	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM-2
P10	128	4	1	2	4	0.5	4	0.12	2	2	S	-	NT	NT	NT	NT
P11	8	>128	32	>128	>128	>128	>128	>128	1	2	MDR	+	+	+	+	VIM
P12	32	>128	32	32	128	>128	16	64	1	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P14	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P15	128	>128	64	>128	>128	>128	>128	>128	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P16	16	64	32	64	>128	>128	8	>128	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
P17	128	32	16	16	32	16	>128	2	2	16	MDR	-	+	+	+	VIM
P18	>128	16	16	32	>128	16	8	2	4	4	XDR	-	+	+	+	VIM
P19	32	>128	32	>128	>128	16	>128	16	2	4	MDR	+	-	-	+	-
P22	>256	32	16	16	1	4	2	2	2	1	MDR	+	-	-	NT	NT
P23	64	4	4	8	2	1	>128	32	2	64	S	-	NT	NT	NT	NT
P24	128	4	2	2	2	0.12	2	0.12	2	4	S	-	NT	NT	NT	NT
P25	64	4	2	8	2	0.25	>128	0.06	2	8	S	-	NT	NT	NT	NT
P26	128	8	2	2	4	2	2	0.06	2	1	S	-	NT	NT	NT	NT
P27	128	16	32	16	8	1	256	0.5	2	8	MDR	+	-	-	NT	NT
P28	128	64	4	8	4	4	4	0.25	2	8	MDR	-	-	-	NT	NT
P29	128	8	16	16	2	1	>128	>128	2	128	MDR	-	-	-	NT	NT
P30	64	32	32	16	16	16	>128	>128	2	4	MDR	-	-	-	NT	-
P32	64	16	4	32	4	1	8	0.5	2	8	MDR	-	-	-	NT	NT
P33	128	16	16	16	32	16	8	2	2	4	MDR	-	-	-	+	-
P35	64	128	64	32	>128	64	>128	128	2	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P36	32	>128	32	16	4	64	2	32	2	16	MDR	-	-	-	+	-
P37	64	32	8	16	16	16	32	32	4	32	MDR	-	-	-	NT	-
P38	64	>128	32	128	16	16	>128	32	2	32	XDR	-	-	-	NT	-
P39	128	>128	32	16	16	16	32	64	2	64	MDR	-	-	-	NT	-
P40	128	64	32	16	16	16	>128	64	2	64	MDR	-	+	+	NT	-
P41	>128	64	16	16	8	16	64	64	2	32	MDR	-	+	+	NT	-
P43	4	>128	>128	>128	16	16	>128	64	4	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P44	4	>128	64	>128	64	16	>128	64	4	32	XDR	-	+	+	+	VIM
P45	64	64	16	32	16	16	8	0.5	2	8	MDR	-	-	-	NT	-
P46	2	128	64	256	16	16	>128	64	4	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P47	4	>128	>128	>128	128	32	>128	128	1	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P48	2	>128	64	>128	64	8	>128	128	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P49	64	16	16	32	32	8	4	0.5	1	8	MDR	-	-	-	+	-
P50	4	>128	>128	>128	64	16	>128	64	2	64	XDR	-	+	+	+	VIM
P51	4	>128	>128	256	64	32	>128	64	4	128	XDR	-	+	+	+	VIM
P52	16	>128	64	>128	32	16	>128	64	2	32	XDR	-	+	+	+	VIM
B53	>128	64	32	16	32	16	>128	2	2	16	MDR	-	-	-	NT	-
P54	>128	16	8	8	16	16	4	0.125	2	16	MDR	-	-	-	NT	-
P55	>128	128	8	16	2	4	4	0.5	2	2	S	-	-	-	NT	NT
P56	>128	>256	>256	64	0.5	1	>256	64	2	64	MDR	-	-	-	NT	PER-1
P57	>128	>256	128	64	128	64	>256	64	2	128	XDR	-	+	+	+	PER-1, VIM-2

^aMIC determined by microdilution method except for fosfomicin where agar dilution method was used. MIC FOM $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ was considered susceptible, MIC FOM $>64 \mu\text{g/mL}$ resistant.

^bS: susceptible, MDR (multidrug resistant): non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories, XDR (extensively drug-resistant): non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories.

^cAmpC hyperexpression.

^dCIM, HODGE and CD were performed on isolates with reduced susceptibility to carbapenems.

^eTested for *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} and *bla*_{IMP} carbapenemase genes.

Abbreviations: AmpC - AmpC disc test with phenylboronic acid, CIM - carbapenemase inhibition test, HODGE - modified Hodge test, CD - combined disc with EDTA for detection of MBLs, NT - not tested, '-' negative result, '+' positive result.

Drug abbreviations: fosfomicin (FOM), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMI), meropenem (MEM), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), amikacin (AMI).

longest individual PAE. An antagonistic effect produced by a combination is defined to be at least 1 h shorter than the longest effect of individual antibiotics of the specified combination [60,61].

Statistical analysis

To address the differences in synergy between isolates with and without acquired β -lactamases statistical analysis using chi-squared test was performed. Time

Table 2. GDS cross method rates of fosfomycin in combination with various antibiotics.

Antibiotic combination	Number of isolates, n (%)			
	SYN ($\leq 0,5$) ^a	AD ($> 0,5 \leq 1$) ^a	IND ($> 1 \leq 4$) ^a	ANT (>4) ^a
CAZ + FOM	11 (21.57%)	23 (45.10%)	17 (33.33%)	0
FEP + FOM	4 (7.84%)	18 (35.29%)	29 (56.86%)	0
PTZ + FOM	4 (7.84%)	15 (29.41%)	32 (62.75%)	0
GM + FOM	9 (17.65%)	22 (43.13%)	20 (39.22%)	0
AM + FOM	3 (5.88%)	15 (29.41%)	33 (64.71%)	0
CIP + FOM	5 (9.80%)	16 (31.37%)	30 (58.82%)	0
IMI + FOM	3 (5.88%)	15 (29.41%)	33 (64.70%)	0
COL + FOM	0 (0%)	6 (11.76%)	45 (88.23%)	0

^aFractional inhibitory concentration index (FICI).

Abbreviations: fosfomycin (FOM), cefepime (FEP), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMI), ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CAZ), gentamicin (GM), colistin (COL) amikacin (AM); SIN - synergy, AD - additive effect, IND - indifferent effect, ANT - antagonism.

kill data were expressed as means \pm standard deviations (SD) of duplicate determinations. To determine significant differences ($p < 0.05$) among the means, one way analysis of variance (ANOVA) was performed.

Results

Antibiotic susceptibility and detection of β -lactamases

The isolates showed variable levels of susceptibility to antipseudomonal antibiotics. There were 39.2% ($n = 20$) multidrug-resistant (MDR) and 49% ($n = 25$) extensively drug-resistant (XDR) isolates. None of the isolates belonged to the PDR category. The rate of susceptibility to fosfomycin was 47.1% ($n = 24$). The rates of susceptibility to other antibiotics were as follows: colistin 88.2% ($n = 45$), amikacin 43.1% ($n = 22$), piperacillin/tazobactam 39.2% ($n = 20$), ciprofloxacin 21.6% ($n = 11$), cefepime 19.6% ($n = 10$), gentamicin 19.6% ($n = 10$), meropenem 17.6% ($n = 9$), imipenem 13.7% ($n = 7$), ceftazidime 11.8% ($n = 6$). In total 53.8% of VIM positive strains were susceptible to fosfomycin ($n = 14$). MIC values of tested antibiotics are shown in Table 1.

AmpC β -lactamase hyperexpression was detected in four isolates (7.8%), all of which were MDR.

In total 54.9% (28/51) isolates displayed a positive modified Hodge and positive CIM test indicating production of carbapenemases. There were 58.8% (30/51) isolates demonstrating positive combined disk test with EDTA test indicating the presence of MBL (Table 1.).

VIM metallo- β -lactamase was identified in 51% (26/51) isolates. Seven isolates tested positive for *bla*_{VIM2} and two for *bla*_{PER-1} extended-spectrum β -lactamase in the previous studies (Table 1.) [1,32].

One isolate coharboured both genes encoding VIM-2 and PER-1.

Synergy testing

GDS cross method

The highest rate of synergy was obtained for fosfomycin combination with ceftazidime (21.6%, $n = 11$), followed by gentamicin (17.7%, $n = 9$). Other combinations yielded low rates of synergy, for instance ciprofloxacin (9.8%, $n = 5$), piperacillin/tazobactam (7.8%, $n = 4$), cefepime (7.8%, $n = 4$), amikacin (5.9%, $n = 3$) and imipenem (5.9%, $n = 3$). In combination with colistin, synergy was not observed.

The additive effect was observed mostly for combinations with ceftazidime (45.1%, $n = 23$) and gentamicin (43.1%, $n = 22$). High rates of indifference were observed in combination with colistin (88.2%, $n = 45$). No antagonism was observed in this study (Table 2.).

No statistically significant difference in synergy between isolates with and without acquired β -lactamases was observed.

A fosfomycin MIC lowering effect was observed in this study. Ceftazidime, gentamicin, cefepime, amikacin, imipenem, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin and colistin lowered the fosfomycin MIC for at least one dilution in 68.6% ($n = 35$), 62.7% ($n = 32$), 56.9% ($n = 29$), 41.2% ($n = 21$), 41.2% ($n = 21$), 37.3% ($n = 19$), 37.3% ($n = 19$) and 27.5% ($n = 14$) of the isolates, respectively. Out of 26 fosfomycin resistant strains, a category change to sensitive was observed in 53.8% ($n = 14$) with gentamicin, 50% ($n = 13$) with imipenem and ceftazidime, 46.2% ($n = 12$) with cefepime, 42.3% ($n = 11$) with piperacillin/tazobactam, 38.5% ($n = 10$) with amikacin and 34.6% ($n = 9$) with ciprofloxacin and colistin.

Time-kill assays

The XDR isolate *P. aeruginosa* P14 positive for VIM MBL did not show any significant differences in the time-kill kinetics between any of the tested antibiotics alone and in combination with fosfomycin. Neither synergistic nor antagonistic interactions were noticed. Moreover, no bactericidal effect was observed (Figure 1).

P. aeruginosa P32 with MDR phenotype and without carbapenemase, showed a reduction of $> 2 \log_{10}$ CFU/mL after 24 h for combinations including colistin, amikacin, piperacillin/tazobactam, gentamicin and ceftazidime compared to each single antibiotic, indicating synergy. Gentamicin combination exhibited the most pronounced and the fastest synergistic and

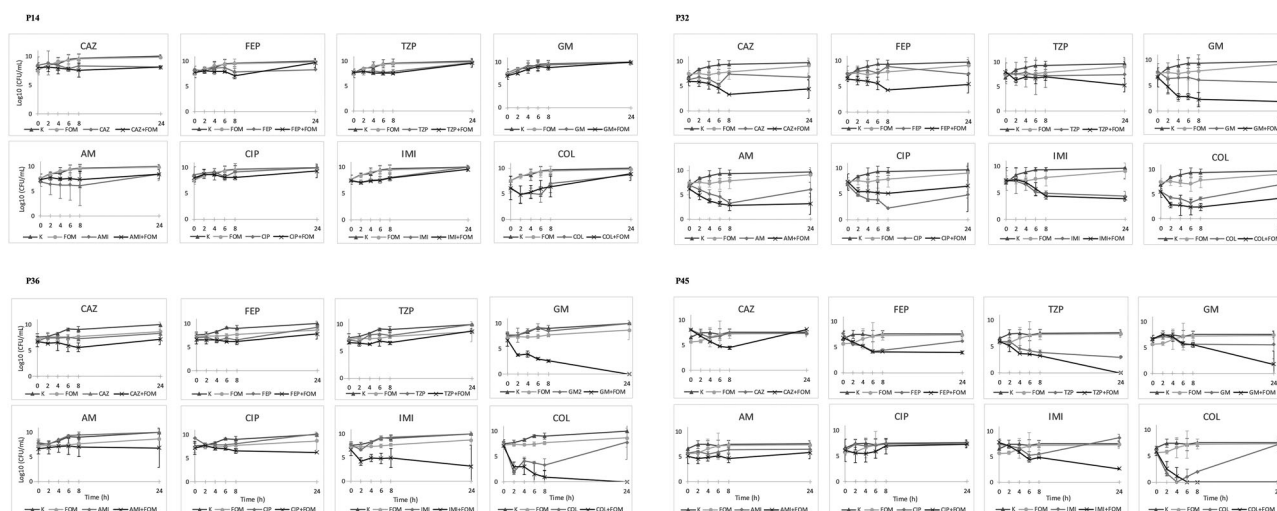


Figure 1. Time kill kinetics for P14, P32, P36 and P45: unexposed control, exposed to single antibiotics and in combination. Abbreviations: K – unexposed control, Fosfomycin (FOM), cefepime (FEP), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMI), ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CAZ), gentamicin (GM), colistin (COL) and amikacin (AM). Error bars represent standard deviations of duplicate determinations

bactericidal effect, compared to single gentamicin, already after 4 h. A bactericidal effect was also noticed in combination with colistin after 6 h, amikacin alone and in combination after 8 h, and imipenem after 8 h, respectively, but regrowth occurred after 24 h (Figure 1). Although synergy was observed for five antibiotic combinations, a statistically significant difference was determined among combinations with piperacillin/tazobactam, gentamicin and amikacin, due to intra-strain variability of the tested organism.

Time-kill kinetics of MDR P36 isolate showed a synergistic effect in combinations with gentamicin, ciprofloxacin, imipenem and colistin. Combinations with gentamicin and imipenem expressed synergism already after 2 h. A bactericidal effect was also observed with imipenem after 24 h. Colistin alone and in combination exerted a bactericidal effect already after 2 h, but unlike when used alone, no bacterial growth after 24 h was observed when colistin was used in combination. Bacterial growth after 24 h was not detectable also in combination with gentamicin, with a bactericidal effect after 6 h. Combinations with amikacin, cefepime, ceftazidime and piperacillin/tazobactam demonstrated no significant differences (Figure 1). Statistical analysis confirmed synergy in combinations with gentamicin and colistin.

Isolate *P. aeruginosa* P45 with MDR phenotype showed a reduction of 2 log₁₀ CFU/ml after 24 h for combinations with cefepime, piperacillin/tazobactam, gentamicin, imipenem and colistin, where combinations with cefepime, piperacillin/tazobactam and colistin were statistically significant. A bactericidal effect was exhibited in combinations with imipenem and

gentamicin after 6 h and 24 h, respectively. Combinations with piperacillin/tazobactam resulted in bacterial killing with no detectable growth after 24 h, while the same effect was demonstrated in combination with colistin already after 8 h with no regrowth at 24 h. A synergistic effect was noticed in combination with ceftazidime after 6 h, but regrowth occurred after 24 h. Combinations with ciprofloxacin and amikacin demonstrated no significant differences in the time-kill kinetics (Figure 1).

Overall, combinations with gentamicin and colistin mostly resulted in synergy and presented a strong bactericidal effect after 24 h. A strong bactericidal effect was also observed in combinations with imipenem (Figure 1).

The two different synergy assays showed different levels of correlation. Correspondence was observed in one of four isolates in combination with ceftazidime, piperacillin/tazobactam, imipenem and colistin, two of four isolates in combination with gentamicin, and mostly in combination with cefepime, amikacin and ciprofloxacin in three of four isolates (Table 3). It should be noted that GDS cross method offers determination of the additive effect, which cannot be assessed with TK method.

PAE. PAE values were determined for the same isolates for which time-kill kinetics were assessed. Fosfomycin produced a short PAE in all tested strains. PAE values are shown in Table 4.

A short PAE was observed with imipenem ranging from 0.15 to 0.99, while the longest was observed with ciprofloxacin with duration up to 4.45 h. Combinations with fosfomycin mostly prolonged the PAE, with a

Table 3. Comparison of synergy tests: GDS cross method (results in FICI) and time kill assay (results in Δ LOG10) for *P. aeruginosa* P14, P32, P36 and P45.

		CAZ + FOM		FEP + FOM		TZP + FOM		GM + FOM	
P14	FICI	2.00	IND	2.00	IND	2.00	IND	2.00	IND
	Δ LOG10	-0.03	IND	1.31	IND	-0.11	IND	0.12	IND
P32	FICI	2.00	IND	1.67	IND	1.17	IND	0.82	AD
	Δ LOG10	-2.38	SYN	-1.99	IND	-2.13	SYN	-3.68	SIN
P36	FICI	0.31	SIN	0.38	SIN	0.42	SIN	0.42	SIN
	Δ LOG10	-1.11	IND	-0.88	SIN	0.04	IND	-8.68	SIN
P45	FICI	0.83	AD	0.63	AD	1.50	IND	0.71	AD
	Δ LOG10	0.79	IND	-2.27	SIN	-2.97	SIN	-3.78	SIN

		AM + FOM		CIP + FOM		IMI + FOM		COL + FOM	
P14	FICI	2.90	IND	2.00	IND	0.75	AD	3.00	IND
	Δ LOG10	0.01	IND	-0.51	IND	-0.30	IND	0.20	IND
P32	FICI	1.00	AD	1.01	IND	2.00	IND	1.17	IND
	Δ LOG10	-2.92	SIN	1.74	IND	-0.51	IND	-2.81	SYN
P36	FICI	2.38	IND	0.31	SIN	0.50	AD	2.00	IND
	Δ LOG10	-1.83	IND	-2.42	SIN	-5.52	SIN	-7.83	SIN
P45	FICI	1.25	IND	0.38	SIN	0.71	AD	1.35	IND
	Δ LOG10	-0.70	IND	0.03	IND	-4.71	SIN	-7.25	SIN

Abbreviations: fosfomycin (FOM), cefepime (FEP), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMI), ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CAZ), gentamicin (GM), colistin (COL) and amikacin (AM). SIN – synergy, AD – additive effect, IND – indifference, ANT – antagonism.

Table 4. PAE values (hours) for *P. aeruginosa* P14, P32, P36 and P45.

	FOM	GM	GM + FOM	AM	AM + FOM	CIP	CIP + FOM	IMI	IMI + FOM	COL	COL + FOM
P14	0.79	0.44	1.96	0.44	0.58	0.24	0.46	0.15	0.90	1.10	1.69
P32	1.31	2.03	2.15	2.44	2.04	2.03	3.47	0.99	1.07	3.24	4.68
P45	1.20	0.19	1.05	2.33	2.17	4.45	6.06	0.83	1.38	2.03	5.50
P36	1.15	0.81	2.59	1.82	2.12	0.52	0.42	0.75	2.23	2.28	3.67

Abbreviations: fosfomycin (FOM), cefepime (FEP), piperacillin/tazobactam (TZP), imipenem (IMI), ciprofloxacin (CIP), ceftazidime (CAZ), gentamicin (GM), colistin (COL) and amikacin (AM).

switch from short to moderate in one of four isolates with imipenem, amikacin and gentamicin. In combination with colistin the effect was extended from moderate to prolonged in half of the isolates. The longest PAE was observed in combination with ciprofloxacin (> 6 h).

PAE synergism was observed in one of four combinations with colistin. Other combinations with colistin resulted in addition. Combinations with gentamicin, ciprofloxacin and imipenem resulted in addition and indifference in half of the isolates, respectively. All combinations with amikacin were indifferent.

Discussion

In this study we tried to assess the lack in evidence of fosfomycin synergy regarding MDR and XDR *P. aeruginosa*. We also focused on isolates harbouring β -lactamases, particularly MBLs, as last-resort carbapenem utility is vastly impacted by their presence [62], and it would be of great benefit to restore antibiotic susceptibility in combination [11]. For all antibiotic combinations synergy was assessed comparing the dynamic time-kill method, as the gold standard for synergy testing, and GDS cross method, as a static single concentration method. Since broth dilution methods are not

recommended for fosfomycin MIC determination, checkerboard method was not used in this study [33].

The main finding of our study is that synergy and the additive effect were most frequently observed in combination with ceftazidime and gentamicin, utilizing GDS cross method, regardless of the presence of acquired β -lactamases. Employing the time-kill method, we noted synergy in one of four isolates in combination with both, ceftazidime and gentamicin, and an additive effect in two of our isolates in combination with gentamicin. Similar data concerning *P. aeruginosa*, regardless of the resistance phenotype, were discussed in a recent review paper [22]. The mechanism suggested for synergy with ceftazidime is that fosfomycin boosts β -lactam activity inhibiting an earlier enzymatic step in cell wall synthesis, and thus increases membrane permeability for β -lactam antibiotics [10]. It is plausible that fosfomycin also increases cellular uptake of aminoglycosides, resulting in increased protein synthesis inhibition and death [18]. Substantial bacterial killing of more than 99.9% (> 3 log10) was revealed in combinations with gentamicin, imipenem and colistin in three of four isolates. Our data also indicate bacteriostatic activity of fosfomycin against *P. aeruginosa*, which is in accordance with previously published data [9].

In our study, the most prominent difference in synergy results obtained by the two methods, was observed in combinations with colistin. We observed high levels of indifference when GDS cross method was used, while according to our time-kill assay results, colistin demonstrated synergy in three out of four isolates with a substantial bactericidal effect. Discrepancy in the levels of synergy with colistin depending on the method used is in agreement with two previous studies [8,63].

Furthermore, when we used time-kill method, neither bactericidal effect nor synergy were detected for the XDR isolate P14 harbouring VIM MBL, but for the other three MDR isolates lacking carbapenemases, synergy was observed in combinations with β -lactam, as well as other antipseudomonal antibiotics. One explanation could be that antibiotic hydrolysis in the presence of VIM metallo- β -lactamase diminishes the synergistic effect of the combinations. It should be taken into account that the isolates positive for certain resistance traits, for instance VIM-2 or PER, were clinical isolates very likely possessing other resistance mechanisms, such as hyperexpression of efflux pumps or porin loss, which also contribute to resistance, and thus it is very difficult to estimate the relationship between the resistance traits and pharmacodynamics response to single antibiotics or antibiotic combinations. Isolates positive for MBL were in most cases XDR, whereas those without the carbapenemase were MDR. Moreover, there were only two isolates with ESBLs, as ESBLs are rarely detected in *P. aeruginosa*, and only four with detected AmpC hyperexpression, included in the study, which is far too less to make comparisons with those harbouring MBLs and to establish reliable correlation between the resistance traits and antibiotic response.

Additionally, we observed a MIC lowering effect using GDS cross method in all antibiotic combinations, again mostly with ceftazidime and gentamicin. Lowering of the fosfomycin MIC by the antibiotic used in combination could render fosfomycin susceptible and usable in therapy in case that the MIC of the tested isolate is slightly above the breakpoint value. This is also the case in all additive interactions, where the FICI values from > 0.5 to ≤ 1 indicate that the MIC values of used antibiotics are lowered in the presence of each other, which may be of interest to clinicians in marginal susceptibility reports. Moreover, GDS cross method is a quick technique easy to implement in clinical laboratories.

To our knowledge, this is the first report describing the *in vitro* PAE of the here used antimicrobial combinations with fosfomycin: ceftazidime, cefepime,

piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, imipenem and colistin. The PAE of the tobramycin/fosfomycin combination was reported to be superior to the effect of antimicrobials alone [19]. We observed a short fosfomycin PAE of the four tested isolates, roughly around 1 h with peak serum levels of the drug. Combinations with aminoglycosides prolonged the PAE in one of four isolates. Also, combinations with gentamicin demonstrated addition in half of the isolates. Although no major PAE synergism was noticed in our study, the effect of antibiotic combinations was superior to that of the drugs alone. This was especially observed in combinations with colistin.

Our findings indicated that a substantial proportion (52.9%) of clinical isolates are already resistant to fosfomycin. In our study synergy of fosfomycin with other antibiotics appears to be strain dependent, related to the specific properties of a particular strain and dependent on the method chosen for synergy analysis. A modest total number of analysed isolates and a very small number of ESBL positive isolates with only VIM-2 carbapenemase detected, pose a limitation of this study. Further evaluation of both time-kill and GDS method using a larger number of isolates are needed to provide a more accurate assessment of synergy potential and a more precise statistical analysis. Nevertheless, our *in vitro* results suggest potential benefits of using fosfomycin in combination with other antibiotics against resistant *P. aeruginosa* isolates where therapy options are extremely scarce and narrowing by day. In addition, GDS cross method may prove to be a feasible method in a clinical laboratory to assist in the optimal therapy choice when MIC values are intermediate or slightly above the resistance breakpoint value.

Contributors

Mia Slade-Vitković: experiment performance, data and laboratory analysis, manuscript preparation; Branka Bedenić: study design, supervision of laboratory work and manuscript preparation; Luka Bielen: study design, manuscript preparation; Ivanka Batarilo: manuscript preparation; Sara Kiebel: laboratory analysis; Gordana Maravić-Vlahoviček: study design, result analysis and manuscript preparation

Ethical approval

The Ethical Committee permission was the obtained from University Hospital Center Zagreb Ethical Committee, class 8.1-19/242-2, number 02/21 AG.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was partially funded by the Croatian Institute for transfusion medicine and partially by Pharmas d.o.o.

ORCID

Mia Slade-Vitković  <http://orcid.org/0000-0002-3936-6400>

References

- [1] Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the per-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2523–2529.
- [2] Tümmler B. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Res.* 2019;8:1371.
- [3] Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):43–48.
- [4] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34(5):634–640.
- [5] Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011;2:65.
- [6] Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(4):761–764.
- [7] Walsh CC, Landersdorfer CB, McIntosh MP, et al. Clinically relevant concentrations of fosfomycin combined with polymyxin B, tobramycin or ciprofloxacin enhance bacterial killing of *Pseudomonas aeruginosa*, but do not suppress the emergence of fosfomycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2218–2229.
- [8] Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, et al. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(5):695–701.
- [9] Walsh CC, McIntosh MP, Peleg AY, et al. *In vitro* pharmacodynamics of fosfomycin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(11):3042–3050.
- [10] Memar Y, Adibkia M, Farajnia K, et al. *In-vitro* effect of imipenem, fosfomycin, colistin, and gentamicin combination against carbapenem-resistant and biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iran J Pharm Res.* 2021;20(2):286–296.
- [11] Avery LM, Sutherland CA, Nicolau DP. Prevalence of *in vitro* synergistic antibiotic interaction between fosfomycin and nonsusceptible antimicrobials in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2019;68(6):893–897.
- [12] Buisson Y, Bercion R, Mauclère P, et al. Preliminary study of the antagonistic effects between fosfomycin and beta-lactams on *Pseudomonas aeruginosa* observed on the antibiogram. *Pathol Biol (Paris).* 1988;36(5 Pt 2):671–674.
- [13] Reguera JA, Baquero F, Berenguer J, et al. Beta-lactam-fosfomycin antagonism involving modification of penicillin-binding protein 3 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(11):2093–2096.
- [14] Pruekprasert P, Tunyapanit W. *In vitro* activity of fosfomycin-gentamicin, fosfomycin-ceftazidime, fosfomycin-imipenem and ceftazidime-gentamicin combinations against ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005;36(5):1239–1242.
- [15] Cuba GT, Rocha-Santos G, Cayô R, et al. *In vitro* synergy of ceftolozane/tazobactam in combination with fosfomycin or aztreonam against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(7):1874–1878.
- [16] Kastoris AC, Rafailidis PI, Vouloumanou EK, et al. Synergy of fosfomycin with other antibiotics for gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;66(4):359–368.
- [17] Drusano GL, Neely MN, Yamada WM, et al. The combination of fosfomycin plus meropenem is synergistic for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a hollow-fiber infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(12):18. e01682
- [18] MacLeod DL, Velayudhan J, Kenney TF, et al. Fosfomycin enhances the active transport of tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1529–1538.
- [19] MacLeod DL, Barker LM, Sutherland JL, et al. Antibacterial activities of a fosfomycin/tobramycin combination: a novel inhaled antibiotic for bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):829–836.
- [20] Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, et al. Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomycin on drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy.* 2007;53(3):202–209.
- [21] Figueredo VM, Neu HC. Synergy of ciprofloxacin with fosfomycin *in vitro* against *Pseudomonas* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 1988;22(1):41–50.
- [22] Antonello RM, Principe L, Maraolo AE, et al. Fosfomycin as partner drug for systemic infection management. A systematic review of its synergistic properties from *in vitro* and *in vivo* studies. *Antibiotics.* 2020;9(8):500.

- [23] Monogue ML, Nicolau DP. Antibacterial activity of ceftolozane/tazobactam alone and in combination with other antimicrobial agents against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;1:942–952.
- [24] Jahan S, Davis H, Ashcraft DS, et al. Evaluation of the *in vitro* interaction of fosfomycin and meropenem against metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* using etest and time-kill assay. *J Investig Med.* 2021;69(2):371–376.
- [25] Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, et al. Evaluation of the synergy of Ceftazidime-Avibactam in combination with meropenem, amikacin, aztreonam, colistin, or fosfomycin against well-characterized multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(8):e00779–19.
- [26] Papp-Wallace KM, Zeiser ET, Becka SA, et al. Ceftazidime-Avibactam in combination with fosfomycin: a novel therapeutic strategy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 2019;220(4):666–676.
- [27] Olsson A, Wistrand-Yuen P, Nielsen EI, et al. Efficacy of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in automated time-lapse microscopy and static time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(6):e02111. 19.
- [28] Avery LM, Nicolau DP. Feasibility of routine synergy testing using antibiotic gradient diffusion strips in the clinical laboratory. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(8):2264–2265.
- [29] White RL, Burgess DS, Manduru M, et al. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(8):1914–1918.
- [30] Brennan-Krohn T, Kirby JE. Antimicrobial synergy testing by the inkjet printer-assisted automated checkerboard array and the manual time-kill method. *J Vis Exp.* 2019;14:e58636.
- [31] Giamarellos-Bourboulis EJ, Kentepozidis N, Antonopoulou A, et al. Postantibiotic effect of antimicrobial combinations on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(2):113–117.
- [32] Sardelic S, Bedenic B, Colinson-Dupuich C, et al. Infrequent finding of Metallo-Lactamase VIM-2 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2746–2749.
- [33] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100. 30th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- [34] López-Montesinos I, Horcajada JP. Oral and intravenous fosfomycin in complicated urinary tract infections. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32:37–44.
- [35] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, 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):268–281.
- [36] Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Nourijelyani K, et al. Detection of AmpC- β -lactamases producing isolates among carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from burn patient. *Iran J Microbiol.* 2014;6(5):306–310.
- [37] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, document M100. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- [38] van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690.
- [39] Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3139–3144.
- [40] Sachdeva R, Sharma B, Sharma R. Evaluation of different phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Lab Phys.* 2017;9(4):249–253.
- [41] Mazzariol A, Mammìna C, Koncan R, et al. A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(5):722–724.
- [42] Bosnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A, et al. VIM-2 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis.* 2010;42(3):193–197.
- [43] Bubonja-Sonje M, Matovina M, Skrobonja I, et al. Mechanisms of carbapenem resistance in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Croatian hospital. *Microb Drug Resist.* 2015;21(3):261–269.
- [44] Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(2):117–127.
- [45] Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4124–4128.
- [46] FDA. Ceptaz (ceftazidime for injection) [Internet]. England, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC 27709; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/050646s014lbl.pdf.
- [47] FDA. Gentamicin injection [Internet]. Fresenius Kabi USA, LCC. 2013. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/062366s033lbl.pdf.
- [48] FDA. Amikacin Sulfate [Internet]. Abbott laboratories, North Chicago, IL 60064, USA; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/64146AP.PDF.
- [49] FDA. Primaxin (imipenem and cilastatin) for injection, for intravenous use [Internet]. Merck&Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. USA. 2016. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050587s074lbl.pdf.

- [50] Car H. In vitro synergy and postantibiotic effect of colistin combinations with meropenem and vancomycin against gram negative bacteria with multiple carbapenem resistance mechanisms. Vol. 198. Osijek, Croatia: Josip Juraj Strossmayer Univ Osijek; 2020.
- [51] Markou N, Markantonis SL, Dimitrakis E, et al. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: a prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin Ther.* 2008;30(1):143–151.
- [52] Moni M, Sudhir S, Dipu TS, et al. Clinical efficacy and pharmacokinetics of colistimethate sodium and colistin in critically ill patients in an indian hospital with high endemic rates of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections: a prospective observational study. *Int J Infect Dis.* 2020;100:497–506.
- [53] Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, et al. Evaluation of double-and triple-antibiotic combinations for VIM-and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1757–1762.
- [54] Silva F, Lourenço O, Queiroz JA, et al. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *J Antibiot (Tokyo).* 2011;64(4):321–325.
- [55] Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, et al. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(4):857–864.
- [56] Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DL, et al. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis.* 1981;3(1):28–37.
- [57] Craig WA. The postantibiotic effect. *Clin Microbiol Newsl.* 1991;13(16):121–124.
- [58] Munckhof WJ, Borlace G, Turnidge JD. Postantibiotic suppression of growth of erythromycin A-susceptible and-resistant gram-positive bacteria by the ketolides telithromycin (HMR 3647) and HMR 3004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1749–1753.
- [59] Bedenić B, Beader N, Godič-Torkar K, et al. Postantibiotic effect of colistin alone and combined with vancomycin or meropenem against *Acinetobacter spp.* with well defined resistance mechanisms. *J Chemother.* 2016;28(5):375–382.
- [60] Li RC, Tang MC. Post-antibiotic effect induced by an antibiotic combination: influence of altered susceptibility to individual components. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(4):583–586.
- [61] Ferrara A, Santos C, Dos Cimbros M, et al. Postantibiotic effect of meropenem in combination with gentamicin or sparfloxacin on gram-positive and gram-negative organisms. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4(8):431–435.
- [62] Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: a review. *Med Sci.* 2018;6:1.
- [63] Di X, Wang R, Liu B, et al. *In vitro* activity of fosfomycin in combination with colistin against clinical isolates of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot (Tokyo).* 2015;68(9):551–555.



Article

In Vitro Antibiofilm Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Other Antibiotics against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Mia Slade-Vitković ¹, Ivanka Batarilo ¹, Luka Bielen ^{2,3}, Gordana Maravić-Vlahoviček ⁴ and Branka Bedenić ^{5,6,*}

¹ Microbiology Department, Croatian Institute of Transfusion Medicine, 10000 Zagreb, Croatia; mia.slade@gmail.com (M.S.-V.); ivanka.batarilo@hztm.hr (I.B.)

² Department of Internal Medicine, Clinical Hospital Centre Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; luka.bielen@yahoo.com

³ Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; gordana.maravic@pharma.unizg.hr

⁵ Clinical Department for Clinical and Molecular Microbiology, Clinical Hospital Centre Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

⁶ Biomedical Research Center Šalata—BIMIS, School of Medicine, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

* Correspondence: branka.bedenic@mef.hr; Tel.: +385-0917531597

Abstract: Background: Due to its rapid resistance development and ability to form biofilms, treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections is becoming more complicated by the day. Drug combinations may help reduce both resistance and biofilm formation. Methods: Using the microtiter plate assay, we investigated the in vitro inhibition of biofilm formation and the disruption of preformed biofilms in multidrug-resistant and extensively drug-resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* in the presence of peak plasma levels of eight antipseudomonal antibiotics alone and in combination with fosfomycin: ceftazidime, piperacillin/tazobactam, cefepime, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin and colistin. Results: Combination therapy was significantly superior to monotherapy in its inhibition of biofilm formation. The highest inhibition rates were observed for combinations with colistin, cefepime and ceftazidime. Conclusion: Our results support fosfomycin combination therapy as an enhanced prophylactic option. Moreover, combinations with β -lactam antibiotics and colistin demonstrated a more potent inhibition effect on biofilm formation than protein synthesis inhibitors.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug-resistant; extensively drug-resistant; fosfomycin; antibiotic combinations; biofilm; inhibition of biofilm formation; biofilm disruption



Citation: Slade-Vitković, M.; Batarilo, I.; Bielen, L.; Maravić-Vlahoviček, G.; Bedenić, B. In Vitro Antibiofilm Activity of Fosfomycin Alone and in Combination with Other Antibiotics against Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 769. <https://doi.org/10.3390/ph17060769>

Academic Editor: Cheng-Wei Tom Chang

Received: 16 May 2024

Revised: 6 June 2024

Accepted: 8 June 2024

Published: 12 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa causes various infections, especially in individuals with impaired immune systems or underlying health conditions, such as respiratory tract infections; urinary tract infections; skin and soft tissue infections; wound, ear and eye infections; sepsis or bacteraemia. It is considered one of the most important hospital-acquired pathogens, and its treatment is becoming more difficult by the day as antibiotic resistance increases. Severe *P. aeruginosa* infections are linked to high mortality rates and therefore require empirical treatment combinations with different mechanisms of action [1]. *P. aeruginosa* is also known for its ability to form biofilms on human tissue, as well as on various surfaces, such as catheters and different prosthetic devices. Biofilms provide a safe harbour for bacteria, where they can withstand harsh conditions, escape the host's immune system and antibiotics and be the source of persistent and recurrent infections. Bacteria in biofilms exhibit different behaviour than their planktonic forms. Antibiotics inhibit bacterial growth or kill planktonic bacteria but are much less effective against sessile biofilm bacterial cells, so-called persisters [2].

One of the most important virulence factors of *P. aeruginosa* is biofilm formation [3]. Biofilm elimination is very difficult and requires high doses of antibiotics, often in combination, with very uncertain outcomes [4,5]. Nearly 80% of persistent bacterial infections are estimated to be linked to biofilms [6], and biofilm-related *P. aeruginosa* infections often lead to treatment failure [2].

Although antibiotics are more useful in preventing biofilm formation, some data also suggest a reduction in the biofilm matrix in the presence of antibiotics, proposing different mechanisms [7–9]. Aminoglycosides showed a preventive effect on the early adhesion of *P. aeruginosa* isolates. Several antibiotics, including ceftazidime, piperacillin/tazobactam and colistin, have shown some effect against bacterial adhesion, motility and biofilm formation [2]. Fosfomycin has recently reemerged as an interesting treatment option for antimicrobial-resistant infections, as no cross-resistance and low resistance rates are expected [10–12]. It has been shown to penetrate very well into mature biofilms formed by *P. aeruginosa* [13,14] and to enhance the penetration of other antibiotics [15,16], presumably due to its low molecular weight [13,14,17,18]. Fosfomycin has also been associated with biofilm reduction in uropathogenic *E. coli* [18].

Fosfomycin monotherapy is of concern because of rapid mutant selection; therefore, dual antimicrobial coverage is often advised [12,19,20]. Moreover, since monotherapy is usually unsuccessful in eradicating biofilms, combination therapy is an important treatment alternative, and it is necessary to investigate the possible anti-biofilm activities of antibiotics, alone or in combination [3–5,16,21]. Chronic *P. aeruginosa* infections in cystic fibrosis are very difficult to treat, but aggressive antibiotic therapy approaches have recently been proven successful in eradicating new *P. aeruginosa* colonisations [22]. Several antimicrobial combinations have been shown to be synergistic against *P. aeruginosa* biofilms [4,5]. However, studies on combination therapy with fosfomycin on *P. aeruginosa* biofilms are limited [21,23–28] and have mostly been carried out on a few isolates, using a small number of antibiotic combinations [16,25,27–29]. Fosfomycin synergy against *P. aeruginosa* biofilms has mainly been recorded in combination with aminoglycosides and quinolones [21,23–28]. Biofilm eradication has also been reported in combination with tobramycin [16]. Little is documented on the effects of combining fosfomycin with colistin and β -lactam antibiotics. Synergy has been observed in combination with high doses of imipenem, but this is of questionable clinical value due to the potential toxicity of the drug levels required for clinical effect [3]. Recently, synergy has also been documented in combination with colistin against *P. aeruginosa* biofilms at concentrations achievable through the inhalation of nebulised drugs [30]. However, to our knowledge, no reports covering combinations with the β -lactam antibiotics ceftazidime, cefepime or piperacillin/tazobactam against extensively drug-resistant (XDR) isolates have been published.

Therefore, the aim of our research was to analyse the *in vitro* inhibition of biofilm formation, as well as the disruption of preformed biofilms, in clinical isolates of *P. aeruginosa* with various resistance traits, including multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) isolates, in the presence of peak plasma levels of eight routinely used antipseudomonal antibiotics alone or in combination with fosfomycin: β -lactam antibiotics, which inhibit peptidoglycan synthesis (ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, imipenem); fluoroquinolones, which block DNA synthesis (ciprofloxacin); aminoglycosides, which prevent protein synthesis (gentamicin, amikacin) and polypeptides (colistin), interfering with outer membrane and cytoplasmic membrane function.

2. Results

2.1. Antibiotic Susceptibility

For this study, 42% multidrug-resistant isolates ($n = 18$) and 58% extensively drug-resistant isolates ($n = 25$) were used. Resistance to fosfomycin was determined in 51% of the isolates ($n = 22$). The resistance rates to the other antibiotics were as follows: colistin 14% ($n = 6$), piperacillin/tazobactam 40% ($n = 17$), amikacin 47% ($n = 20$), cefepime 72% ($n = 31$), gentamicin 79% ($n = 34$), ceftazidime 86% ($n = 37$), ciprofloxacin 88% ($n = 38$), meropenem

91% ($n = 39$), imipenem 91% ($n = 39$). The MIC values of the antibiotics tested are listed in Table 1.

Table 1. MIC values and resistance phenotypes of *P. aeruginosa* isolates.

Isolate	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a										Category ^b
	FOM	CAZ	FEP	TZP	IMI	MEM	GM	AM	CIP	COL	
P1	128	64	32	128	128	>128	>128	8	32	1	XDR
P2	>256	>128	>128	>128	64	32	>128	128	64	2	XDR
P3	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	64	2	XDR
P4	128	128	32	32	128	>128	>128	128	32	1	XDR
P5	128	128	16	64	128	>128	1	2	2	1	XDR
P6	>256	64	32	64	128	>128	32	128	64	1	XDR
P7	256	64	32	128	128	>128	32	128	32	1	XDR
P8	64	32	16	64	128	>128	32	32	32	1	XDR
P9	128	64	32	32	32	>128	32	128	32	2	XDR
P11	8	>128	32	>128	>128	>128	>128	2	>128	1	MDR
P12	32	>128	32	32	128	>128	16	64	64	1	XDR
P14	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128	2	XDR
P15	128	>128	64	>128	>128	>128	>128	128	>128	2	XDR
P16	16	64	32	64	>128	>128	8	32	>128	2	XDR
P17	128	32	16	16	32	16	>128	16	2	2	MDR
P18	>128	16	16	32	>128	16	8	4	2	4	XDR
P19	32	>128	32	>128	>128	16	>128	4	16	2	MDR
P27	128	16	32	16	8	1	256	8	0.5	2	MDR
P28	128	64	4	8	4	4	4	8	0.25	2	MDR
P29	128	8	16	16	2	1	>128	128	>128	2	MDR
P30	64	32	32	16	16	16	>128	4	>128	2	MDR
P33	128	16	16	16	32	16	8	4	2	2	MDR
P35	64	128	64	32	>128	64	>128	128	128	2	XDR
P36	32	>128	32	16	4	64	2	16	32	2	MDR
P37	64	32	8	16	16	16	32	32	32	4	MDR
P38	64	>128	32	128	16	16	>128	32	32	2	XDR
P39	128	>128	32	16	16	16	32	64	64	2	MDR
P40	128	64	32	16	16	16	>128	64	64	2	MDR
P41	>128	64	16	16	8	16	64	32	64	2	MDR
P43	4	>128	>128	>128	16	16	>128	64	64	4	XDR
P44	4	>128	64	>128	64	16	>128	32	64	4	XDR
P45	64	64	16	32	16	16	8	8	0.5	2	MDR
P46	2	128	64	256	16	16	>128	64	64	4	XDR
P47	4	>128	>128	>128	128	32	>128	64	128	1	XDR
P48	2	>128	64	>128	64	8	>128	64	128	2	XDR
P49	64	16	16	32	32	8	4	8	0.5	1	MDR
P50	4	>128	>128	>128	64	16	>128	64	64	2	XDR
P51	4	>128	>128	256	64	32	>128	128	64	4	XDR
P52	16	>128	64	>128	32	16	>128	32	64	2	XDR
P53	>128	64	32	16	32	16	>128	16	2	2	MDR
P54	>128	16	8	8	16	16	4	16	0.125	2	MDR
P56	>128	>256	>256	64	0.5	1	>256	64	64	2	MDR
P57	>128	>256	128	64	128	64	>256	128	64	2	XDR

^a MIC (minimal inhibitory concentration) was determined using microdilution method, with the exception of fosfomycin, for which agar dilution method was used. MIC of FOM ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ was considered susceptible, MIC of FOM > 64 $\mu\text{g/mL}$ was considered resistant. ^b MDR (multidrug-resistant): non-susceptible to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories; XDR (extensively drug-resistant): non-susceptible to ≥ 1 agent in all but ≤ 2 categories. Abbreviations: fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), meropenem (MEM), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP) and colistin (COL).

2.2. Detection of Biofilm Formation

All tested clinical isolates were biofilm producers according to the microtiter plate assay. Of the 43 isolates, 32.6% ($n = 14$) were strong biofilm producers (SBPs), 41.9%

($n = 18$) were moderate biofilm producers (MBPs) and 25.6% ($n = 11$) were weak biofilm producers (WBPs).

2.3. Inhibition of Biofilm Formation

For the inhibition of biofilm formation (IBF) test, 24 isolates were used, of which 13 were strong and 11 were moderate biofilm producers. Each isolate was exposed to peak plasma concentrations of the antibiotics alone and in combination.

Exposure to fosfomycin resulted in varying degrees of inhibition in 70.8% ($n = 17$) of the isolates and ranged from 2.09% to 90.43%. A higher OD₆₂₀ value after exposure to fosfomycin was observed in 29.2% of the isolates ($n = 7$) compared to the OD₆₂₀ values of the unexposed isolates; see Figure 1. These seven isolates were all resistant to fosfomycin (MIC ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$). Five of these seven isolates were MBPs when not exposed to fosfomycin but were converted into SBPs upon exposure. The overall mean IBF value obtained was 14.88%; see Table 2. There was no statistically significant difference between the OD₆₂₀ values with and without exposure to fosfomycin ($p = 0.069$).

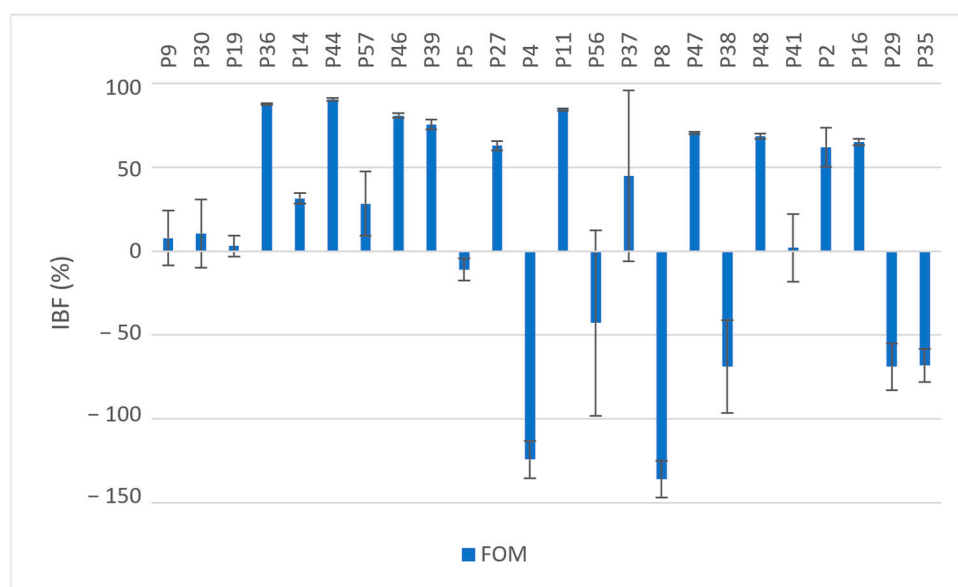


Figure 1. Inhibition of biofilm formation (IBF, %) in MDR and XDR isolates (P9–P35) by fosfomycin (Fom); values expressed as means with SD.

Table 2. Average IBF rates of antibiotics alone and in combination, expressed as means and SD.

Atb	Average IBF				
	Single Use %	SD	Combination %	SD	<i>p</i>
FOM	14.9	±67.75			
CAZ	56.5	±29.96	81.0	±8.39	<0.001
FEP	77.1	±18.35	81.8	±7.35	<0.001
TZP	36.8	±41.78	78.8	±13.19	<0.001
IMI	15.2	±58.14	74.1	±21.16	<0.001
GM	−20.8	±59.99	39.9	±68.82	<0.001
CIP	−24.2	±61.78	52.8	±47.19	<0.001
COL	75.6	±20.73	82.3	±6.41	<0.001
AM	−18.3	±91.26	68.1	±39.66	<0.001

Abbreviations: inhibition of biofilm formation (IBF), atb (antibiotic), fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), standard deviation (SD), *p*-value (*p*).

The average obtained IBF values of the antibiotics alone and in combination are listed in Table 2. The effect of single and combined antibiotic treatments on IBF is shown

graphically in Figure 2. While large differences were observed among the inhibition properties of individual antibiotics, a more uniform inhibition pattern was observed when these antibiotics were used in combination with fosfomycin. The highest inhibition rates were observed with colistin alone and in combination, a result that was somewhat expected because of its low resistance rates (14%), and with cefepime alone and in combination, despite high resistance rates to both cefepime (72%) and fosfomycin (51%).



Figure 2. Effect of single and combined antibiotic treatments on biofilm development of MDR and XDR isolates (P9–P35); inhibition of biofilm formation (IBF) percentage values expressed as means with standard deviations (SDs) obtained with the crystal violet assay. Abbreviations: fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP) and colistin (COL).

Although the highest values of IBF were recorded with combinations with colistin, with a mean inhibition percentage of 82.3%, no statistical significance was found compared to the use of colistin alone ($p = 0.47$). The use of colistin alone (75.6%) and in combination (82.3%) was superior to the use of fosfomycin (14.9%) alone in terms of the IBF. Nevertheless, comparison of the biofilm production categories showed the superiority of combination therapy, with all the isolates belonging to the NBP category because of the colistin–fosfomycin combination; see Figure 3. High IBF levels were also observed with

cefepime alone and in combination. However, combination therapy was superior to the use of single antibiotics in terms of category change, as combination therapy resulted in a higher percentage of NBPs; see Figure 3. All the other antibiotic combinations, with ceftazidime, piperacillin/tazobactam, imipenem, gentamicin, ciprofloxacin and amikacin, resulted in significant IBF levels compared to single use ($p < 0.05$). In addition, all antibiotic combinations led to a higher proportion of NBPs; see Figure 3.

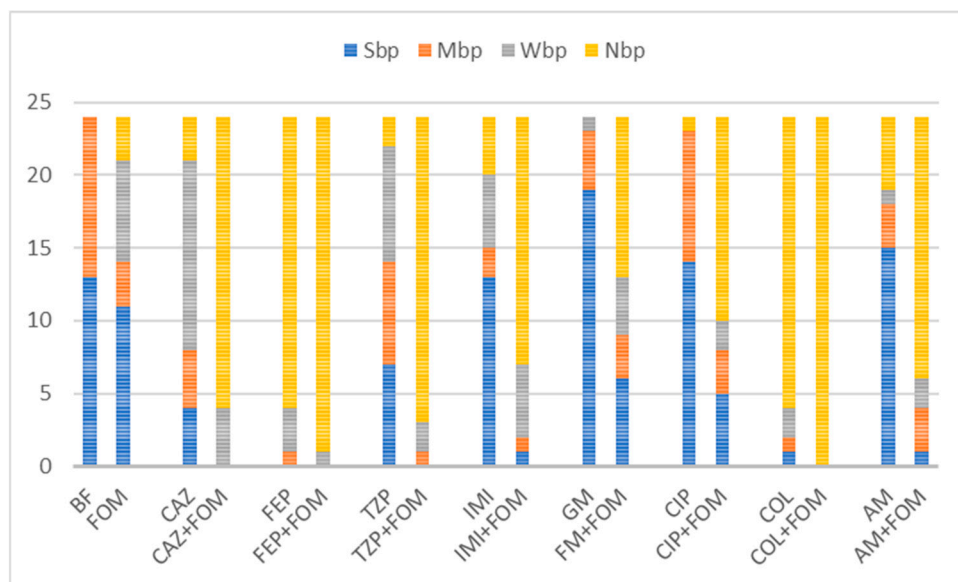


Figure 3. Distribution of biofilm production categories among 24 isolates unexposed and exposed to single or combined antibiotics. Abbreviations: fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), non-biofilm producer (NBP), weak biofilm producer (WBP), moderate biofilm producer (MBP), strong biofilm producer (SBP) and biofilm formation of unexposed isolates (BF). Combinations with fosfomycin yielded downgrades in category with a larger fraction of non-biofilm producers among tested isolates. Out of 13 strong and 11 moderate biofilm producers, exposure to antibiotic combinations with fosfomycin resulted in inhibition of biofilm formation in all combinations with colistin ($n = 24$, 100%), 95.8% ($n = 23$) with cefepime, 87.5% ($n = 21$) with piperacillin/tazobactam, 83.3% ($n = 20$) with ceftazidime, 75% ($n = 18$) with amikacin, 70.8% ($n = 17$) with imipenem, 58.3% with ciprofloxacin ($n = 14$) and 45.8% ($n = 11$) with gentamicin.

High average IBF values were also found for combinations with the β -lactam antibiotics ceftazidime (81%), piperacillin/tazobactam (78.8%) and imipenem (74.1%). The IBF of combinations with ceftazidime, piperacillin/tazobactam and imipenem was significantly higher compared to that with single use of antibiotics (56.5%, 36.8% and 15.2%, respectively), Table 2. Moreover, all the antibiotic combinations resulted in higher proportions of NBPs; see Figure 3. The use of imipenem alone resulted in the IBF in 58.3% of the isolates ($n = 14$), with a mean of 15.2%. The measured OD_{620} values of 10 isolates were higher when imipenem alone was used compared to the measured OD_{620} biofilm values of the unexposed controls, resulting in negative IBF values. Of these isolates, 70% ($n = 7$) had a MIC_{IMI} value of ≥ 64 and were thus exposed to subMIC concentrations of imipenem. A similar effect was observed when gentamicin, amikacin and ciprofloxacin were used alone. A total of 93.8% of isolates (15/16) with negative IBF values were exposed to subMIC concentrations of gentamicin, 100% of isolates (14/14) with negative IBF values were exposed to subMIC concentrations of colistin and 66.7% isolates (8/12) with negative IBF values were exposed to subMIC concentrations of amikacin. While the mean values of the IBF of gentamicin (−20.8%), amikacin (−18.3%) and ciprofloxacin (−24.2%) were low, combination therapy with fosfomycin resulted in significantly higher IBF values (39.9%,

68.1% and 52.8%, respectively). Additionally, these antibiotic combinations also led to a higher proportion of NBPs as well; see Figure 3.

2.4. Disruption of Preformed Biofilms

The disruption of biofilms was investigated in 24 h old biofilms from eight strong biofilm producers. The preformed biofilms were exposed to antibiotics for 6 h and 24 h. Neither a statistically significant reduction in biofilms nor a change in OD₆₂₀ value was observed, regardless of the duration of antibiotic exposure; see Tables 3 and 4. Nevertheless, a category change from strong to moderate biofilm producers was observed in some isolates after 6 h of antibiotic exposure. This effect was observed when the P14 biofilms were exposed to fosfomycin alone, ceftazidime and ciprofloxacin in combination and cefepime, imipenem, gentamicin, colistin and amikacin alone and in combination. The same effect was also noted after the P46 biofilms were exposed to imipenem alone and in combination and after the P36 biofilms were exposed to amikacin in combination. Similarly, 24 h of antibiotic exposure resulted in equal category downgrading, from strong to moderate, when the P36 biofilms were exposed to amikacin, colistin and ciprofloxacin in combination and piperacillin/tazobactam alone.

Table 3. Average calculated OD₆₂₀ values of 24 h old biofilms after 6 h of exposure to single and combined antibiotics and biofilm disruption rates, expressed as means with standard deviation.

	OD _{atb}	OD _{comb}	BD %	SD	BD _{comb} %	SD
CAZ	0.607594	0.521313	4.75	±14.80	18.81	±9.72
FEP	0.491531	0.495109	21.00	±12.42	22.35	±12.15
TZP	0.648563	0.552984	−4.64	±12.71	13.24	±13.23
IMI	0.490469	0.467781	23.20	±9.57	27.59	±12.48
GM	0.55825	0.539375	11.93	±9.69	14.85	±15.81
CIP	0.644125	0.572797	−4.15	±10.95	10.26	±14.79
COL	0.465239	0.495609	26.72	±17.43	23.94	±12.14
AM	0.580547	0.526031	10.77	±10.17	19.48	±13.24
FOM	0.562453		11.51	±11.28		

Abbreviations: optical density (OD), biofilm disruption (BD), standard deviation (SD), atb (antibiotic), fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL).

Table 4. Average calculated OD₆₂₀ values of 24 h old biofilms after 24 h of exposure to single and combined antibiotics and biofilm disruption rates, expressed as means with standard deviation.

	OD _{atb}	OD _{comb}	BD %	SD	BD _{comb} %	SD
CAZ	0.625203	0.670141	8.49	±16.87	2.71	±19.91
FEP	0.593656	0.651391	11.91	±12.37	2.77	±12.91
TZP	0.561375	0.648823	16.70	±11.89	3.95	±10.97
IMI	0.590844	0.568	10.82	±11.63	14.02	±13.31
GM	0.586094	0.640443	13.68	±6.44	4.01	±9.45
CIP	0.601026	0.597516	10.70	±8.51	9.94	±17.19
COL	0.625568	0.62611	8.24	±8.52	7.54	±12.06
AM	0.636359	0.572573	6.61	±13.19	15.38	±11.91
FOM	0.678063		−3.81	±23.85		

Abbreviations: optical density (OD), biofilm disruption (BD), standard deviation (SD), atb (antibiotic), fosfomycin (FOM), ceftazidime (CAZ), piperacillin/tazobactam (TZP), cefepime (FEP), imipenem (IMI), gentamicin (GM), amikacin (AM), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL).

3. Discussion

Our results showed neither an inhibitory nor a destructive effect of fosfomycin alone on MDR and XDR *P. aeruginosa* biofilms. Wang et al. showed a similar result, with no anti-biofilm effects on fosfomycin-susceptible *P. aeruginosa* isolates, despite the high antibiotic concentrations used (up to 1.024 µg/mL) [21]. Fosfomycin inhibits cell wall synthesis and works best against rapidly growing bacteria, which could partly explain these results.

Weak β -lactam antibiofilm activity was anticipated due to the slow growth of biofilm bacteria, which hinders β -lactam activity targeting the peptidoglycan synthesis of actively growing and dividing bacteria [31]. Nevertheless, high IBF values were achieved in our study in combination with β -lactam antibiotics. This is the first report, to the best of our knowledge, of fosfomycin combinations with the β -lactam antibiotics ceftazidime, cefepime and piperacillin/tazobactam against *P. aeruginosa* biofilm. Here, we have shown, for the first time, that β -lactam antibiotics have a more potent IBF effect in comparison to protein synthesis inhibitors and quinolones, even when not combined with fosfomycin. Moreover, we observed that the IBF effect was most pronounced in combinations with β -lactam antibiotics (ceftazidime, cefepime) and polypeptides (colistin) despite high resistance rates to ceftazidime, cefepime and fosfomycin. This could indicate an interaction between the synthesis of peptidoglycan, the disruption of the cytoplasmic membrane and biofilm formation. Nevertheless, the IBF of all antibiotic combinations was superior to with single use of antibiotics. Additionally, the share of NBPs was higher.

Both aminoglycosides and quinolones are frequently used to treat infections caused by *P. aeruginosa*. The synergy of fosfomycin/aminoglycoside and fosfomycin/quinolone combinations against its biofilm has already been documented to some extent, using different biofilm models, antibiotic representatives of these groups and different isolate numbers, sometimes only one, on isolates that are predominantly sensitive to the tested agents [21,23–28]. Anderson et al. reported the eradication of *P. aeruginosa* biofilms using fosfomycin and tobramycin in combination [16]. The suggested synergy mechanism of quinolones and aminoglycosides with fosfomycin against planktonic cells of *P. aeruginosa* is that fosfomycin amends *P. aeruginosa* membrane permeability, leading to increased fluoroquinolone/aminoglycoside uptake. Although fosfomycin, ciprofloxacin and gentamicin were found to penetrate well into biofilms of *P. aeruginosa*, the lowest IBF rates were recorded for combinations with aminoglycosides and ciprofloxacin [21]. Nevertheless, combinations with both aminoglycosides and quinolones resulted in significantly higher levels of IBF. To further clarify the synergistic mechanism of these antibiotic combinations against biofilms, additional studies will be required.

We also observed a vast difference between the inhibitory properties of certain antibiotics, including fosfomycin, aminoglycosides, imipenem and ciprofloxacin, against different isolates, with higher OD₆₂₀ values after exposure to antibiotics. One explanation for this effect could be the biofilm induction potential following exposure to subMIC concentrations of some antibiotics such as aminoglycosides, β -lactams and fluoroquinolones in *P. aeruginosa* isolates [2,22,32].

While a downgrading of the biofilm category was observed for some isolates, no statistically significant effect on biofilm disruption was observed with either the sole or combined use of antibiotics, suggesting the weak disruption potential of antibiotics for mature biofilms. One limitation of antibiotic usage against biofilms is the fact that when the treatments are initiated, the biofilm is already formed, suggesting the importance of biofilm prevention. Furthermore, antibiotics are more likely to be effective when used in the initial biofilm formation stages, while the bacterial cells are more metabolically active and thus more accessible for antibiotic therapy. Unfortunately, low antibiotic activity was exerted on already formed biofilms. However, a category downgrade indicates antibiofilm activity with potential that needs further investigation. Effects of combination therapy have largely been observed in the prevention of biofilm formation, rather than the disruption of biofilms. The use of a static or closed in vitro biofilm model provides insights into biofilm physiology but is insufficient in controlling environmental factors like nutrient flux and the capacity to wash out metabolic products, as well as host factors [16,23,33]. Dynamic or open systems provide conditions that better mimic those in vivo. Further studies using more clinical isolates and different biofilm models would provide additional insight into the impact of combination therapy in terms of biofilm prevention and disruption. Furthermore, a complete checkerboard analysis would provide a more comprehensive evaluation of antibiotic combination effects.

In conclusion, our results prove that the in vitro anti-biofilm effect of antibiotic combinations with fosfomycin, particularly in terms of the IBF, is considerably superior to the single use of antibiotics when using clinically achievable concentrations, even in situations where both antibiotics are not effective when used alone. Furthermore, according to these results, the IBF potential of combinations with β -lactam antibiotics and colistin is larger than that of combinations with protein synthesis inhibitors. The results obtained in this study could prove to be clinically valuable, particularly regarding biofilm prophylaxis of not only susceptible but also antibiotic-resistant isolates.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Isolates

We collected forty-three clinical isolates of *P. aeruginosa* from various clinical specimens. Forty-one isolates were collected from six hospitals in Croatia: General Hospital Bjelovar, General Hospital Slavonski Brod, General Hospital Pula, University Hospital Centre Split, University Hospital Centre Osijek and University Hospital Centre Zagreb. Vitek 2 or MALDI-TOF MS was used to identify the isolates. Two of the isolates were kindly provided by G. M. Rossolini (Department of Microbiology and Virology, Careggi University Hospital, 50135 Florence, Italy). Antibiotic susceptibility was determined in previous studies carried out by Slade-Vitković et al. [34], and the isolates were categorized as multidrug-resistant (MDR) and/or extensively drug-resistant (XDR) according to Magiorakos et al. [35]. To define resistance, the fosfomycin MIC breakpoint value was set at >64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [36]. Thirteen strong and eleven moderate biofilm producers were used to evaluate the anti-biofilm properties of fosfomycin alone and when combined with antipseudomonal antibiotics. All the isolates were MDR or XDR.

4.2. Quantitative Absorbance-Based Biofilm Measurement

4.2.1. The Microtiter Plate Assay

For quantitative detection of the biofilms, the microtiter plate assay was employed [37]. Isolates were grown overnight on blood agar plates, and three to four colonies of each isolate were suspended in 5 mL of TSB (Tryptic Soy Broth). The cultures were incubated for 18 h at 36 °C. The tubes were shaken and diluted in 1:100 TSB. Then, 200 μL of the diluted culture was pipetted into 96-well plates and incubated at 36 °C for a further 24 h. After the incubation period, the medium was removed, and sterile distilled water was used to carefully wash the wells three times. The plates were air-dried at 56 °C for 60 min. To stain the biofilm, 250 μL of crystal violet solution was pipetted into each well. The dye was removed after 15 min, and the wells were cautiously washed using sterile distilled water. To dissolve the attached dye, 95% ethanol was added to each well, and the content was transferred into a flat-bottomed 96-well plate. Optical density was determined twice for each well using a microtiter plate reader at 620 nm. Sterile TSB was used as a negative control. Each experiment was performed in quadruplicate. The average OD_{620} values were determined for the tested isolates and for negative controls. To define the cut-off value (OD_c), the following formula was used: $\text{OD}_c = \text{averageOD}_{\text{negative control}} + (3 \times \text{SD}_{\text{negative control}})$.

The isolates were categorized as follows: $4 \times \text{OD}_c < \text{OD}$ = strong biofilm producer, $2 \times \text{OD}_c < \text{OD} \leq 4 \times \text{OD}_c$ = moderate biofilm producer, $\text{OD}_c < \text{OD} \leq 2 \times \text{OD}_c$ = weak biofilm producer, $\text{OD} \leq \text{OD}_c$ = non-biofilm producer [37].

4.2.2. Inhibition of the Formation of and Eradication/Disruption of *P. aeruginosa* Biofilms

Inhibition of the formation of and eradication/disruption of the *P. aeruginosa* biofilms were evaluated using the crystal violet assay [37–41]. The cultures were exposed to eight antipseudomonal antibiotics alone and in combination. Peak plasma concentrations of non-protein bound drugs according to the literature were used: fosfomycin (395 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [42], ceftazidime (170 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [43], piperacillin/tazobactam (210/24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cefepime (131 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [42], imipenem (55 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [44], gentamicin (9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [45], amikacin (38 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [42,46], ciprofloxacin (2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [42] and colistin (2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [47–49].

Biofilm formation inhibition was evaluated for 13 strong biofilm producers (P4, P5, P9, P11, P14, P19, P27, P30, P36, P39, P44, P46 and P57) and 11 moderate biofilm producers (P2, P8, P16, P29, P35, P37, P38, P41, P47, P48 and P56). Colonies were grown overnight on Columbia agar plates. Each isolate was suspended and diluted in TSB, as described above. Antibiotics, alone or in combination, were added to each diluted culture at the desired concentration. A total of 200 µL of each culture was transferred into the 96-well plates, and the plates were incubated for 24 h at 36 °C.

For the biofilm disruption assay, eight isolates with the highest OD₆₂₀ values determined in the biofilm microtiter detection assay were used (P9, P14, P19, P30, P36, P44, P46 and P57). Biofilms were allowed to form for 24 h, as described above. After 24 h, the medium containing unattached bacteria was discarded, and sterile distilled water was used to gently wash the plate. The desired antibiotic concentrations, alone or in combination with fosfomycin, were prepared in sterile TSB and added to the microtiter plate wells, and the plates were incubated for 6 h and 24 h at 36 °C.

After the incubation period, the medium was removed from the plates used for both tests (inhibition and disruption assays), and the plates were carefully washed with sterile distilled water and allowed to dry. The biofilms were stained with crystal violet for 15 min, the unbound dye was removed, the wells were washed and the adhering dye was dissolved with ethanol. The biofilms were quantified in a spectrophotometer at 620 nm. Each measurement was performed in duplicate. TSB was used as a blank. Each experiment was performed in quadruplicate, with mean values and standard deviations calculated [38–41].

4.2.3. Quantification of Biofilm Inhibition

Inhibition of biofilm formation (IBF) and biofilm disruption (BD) were calculated from the mean absorbance at 620 nm for each sample after antibiotic exposure according to the following formula: $\text{Biofilm}_{\text{inhibition/disruption}} (\%) = \{(\text{OD}_{\text{untreated control}} - \text{OD}_{\text{treated sample}}) / \text{OD}_{\text{untreated control}}\} \times 100$.

The results were expressed as percentages [29,50–52]. Means and standard deviations (SDs) for each sample were calculated and expressed with error bars, Figures 1 and 2. To evaluate the biofilm inhibition potential of each antibiotic, the average biofilm inhibition rates of the antibiotics alone and in combination were determined and expressed as means and SDs.

To further evaluate the inhibition potential of the antibiotics and antibiotic combinations, the category changes in 13 strong and 11 moderate biofilm-producing isolates were assessed.

4.3. Statistical Analysis

All the experiments were performed in quadruplicate for each strain. Data were expressed as means with standard deviations. To determine significant differences between groups, the Friedman and Wilcoxon Signed Rank non-parametric tests were used. SPSS software (<https://www.ibm.com/spss>, accessed on 7 June 2024) was used for the statistical analysis. The data met the test assumptions of the tests. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Author Contributions: Conceptualization: M.S.-V. and B.B.; methodology, M.S.-V.; formal analysis: M.S.-V.; investigation: M.S.-V.; resources: M.S.-V., I.B., L.B. and B.B.; data curation: M.S.-V.; writing—original draft preparation: M.S.-V.; writing—review and editing: B.B., I.B., L.B. and G.M.-V.; supervision: I.B., B.B. and G.M.-V.; funding acquisition, I.B., L.B., B.B. and M.S.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Croatian Institute for transfusion medicine.

Institutional Review Board Statement: Ethical committee permission was obtained from the University Hospital Center Zagreb Ethical Committee, class 8.1-19/242-2, number 02/21 AG, as well as from the Faculty of Pharmacy & Biochemistry Ethical Committee, class:643-02/22-03/01, number: 251-62-03-22-49.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in the study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Zakhour, J.; Sharara, S.L.; Hindy, J.R.; Haddad, S.F.; Kanj, S.S. Antimicrobial Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Severe Sepsis. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1432. [[CrossRef](#)]
2. Olivares, E.; Badel-Berchoux, S.; Provot, C.; Prévost, G.; Bernardi, T.; Jehl, F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yousef Memar, M.; Adibkia, K.; Farajnia, S.; Kafil, H.S.; Khalili, Y.; Azargun, R.; Ghotaslou, R. In-vitro Effect of Imipenem, Fosfomycin, Colistin, and Gentamicin Combination against Carbapenem-resistant and Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients. *Iran. J. Pharm. Res.* **2021**, *20*, 286–296.
4. Černohorská, L.; Votava, M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol.* **2008**, *53*, 57–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ghorbani, H.; Memar, M.Y.; Sefidan, F.Y.; Yekani, M.; Ghotaslou, R. In vitro synergy of antibiotic combinations against planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *GMS Hyg. Infect. Control* **2017**, *12*, Doc17. [[PubMed](#)]
6. Costa, G.A.; Rossatto, F.C.P.; Medeiros, A.W.; Paula, A.; Correa, F.; Brandelli, A.; Frazzon, A.P.G.; Motta, A.D.S.D. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rojo-Moliner, E.; Macià, M.D.; Rubio, R.; Moyà, B.; Cabot, G.; López-Causapé, C.; Oliver, A. Sequential Treatment of Biofilms with Aztreonam and Tobramycin Is a Novel Strategy for Combating *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Respiratory Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 2912–2922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ciofu, O.; Rojo-Moliner, E.; Macià, M.D.; Oliver, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *Apmis* **2017**, *125*, 304–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Penesyan, A.; Paulsen, I.T.; Gillings, M.R.; Kjelleberg, S.; Manefield, M.J. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2109. [[CrossRef](#)]
10. Raz, R.; Raz, P.R. Fosfomycin: An old—New antibiotic. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 4–7. [[CrossRef](#)]
11. Silver, L.L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7*, a025262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Walsh, C.C.; Landersdorfer, C.B.; McIntosh, M.P.; Peleg, A.Y.; Hirsch, E.B.; Kirkpatrick, C.M.; Bergen, P.J. Clinically relevant concentrations of fosfomycin combined with polymyxin, B; tobramycin or ciprofloxacin enhance bacterial killing of *Pseudomonas aeruginosa*, but do not suppress the emergence of fosfomycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2218–2229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Díez-Aguilar, M.; Cantón, R. New microbiological aspects of fosfomycin. *Rev. Española Quimioter.* **2019**, *32*, 8–18.
14. Roussos, N.; Karageorgopoulos, D.E.; Samonis, G.; Falagas, M.E. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *34*, 506–515. [[PubMed](#)]
15. Michalopoulos, A.S.; Falagas, M.E. Colistin: Recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann. Intensive Care* **2011**, *1*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Anderson, G.G.; Kenney, T.F.; MacLeod, D.L.; Henig, N.R.; O’Toole, G.A. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomycin/tobramycin antibiotic combination. *Pathog. Dis.* **2013**, *67*, 39–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Chai, D.; Liu, X.; Wang, R.; Bai, Y.; Cai, Y. Efficacy of Linezolid and Fosfomycin in Catheter-Related Biofilm Infection Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 6413982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. González, M.J.; Da Cunda, P.; Notejane, M.; Zunino, P.; Scavone, P.; Robino, L. Fosfomycin tromethamine activity on biofilm and intracellular bacterial communities produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Pathog. Dis.* **2019**, *77*, ftz022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. 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.* **2015**, *70*, 3042–3050. [[CrossRef](#)]
20. Samonis, G.; Maraki, S.; Karageorgopoulos, D.E.; Vouloumanou, E.K.; Falagas, M.E. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 695–701. [[CrossRef](#)]
21. Wang, L.; Di Luca, M.; Tkhalishvili, T.; Trampuz, A.; Gonzalez Moreno, M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2522. [[CrossRef](#)]
22. Tré-Hardy, M.; Nagant, C.; El Manssouri, N.; Vanderbist, F.; Traore, H.; Vaneechoutte, M.; Dehay, J.P. Efficacy of the Combination of Tobramycin and a Macrolide in an In Vitro *Pseudomonas aeruginosa* Mature Biofilm Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4409–4415. [[CrossRef](#)]

23. Díez-Aguilar, M.; Morosini, M.I.; Köksal, E.; Oliver, A.; Ekkelenkamp, M.; Cantón, R. Use of Calgary and Microfluidic BioFlux Systems To Test the Activity of Fosfomycin and Tobramycin Alone and in Combination against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01650-17. [CrossRef]
24. Cai, Y.; Fan, Y.; Wang, R.; An, M.M.; Liang, B.B. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 563–566. [CrossRef]
25. Mikuniya, T.; Kato, Y.; Kariyama, R.; Monden, K.; Hikida, M.; Kumon, H. Synergistic effect of fosfomycin and fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Acta Med. Okayama* **2005**, *59*, 209–216.
26. Mikuniya, T.; Kato, Y.; Ida, T.; Maebashi, K.; Monden, K.; Kariyama, R.; Kumon, H. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J. Infect. Chemother.* **2007**, *13*, 285–290. [CrossRef]
27. Monden, K.; Ando, E.; Iida, M.; Kumon, H. Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *J. Infect. Chemother.* **2002**, *8*, 218–226. [CrossRef]
28. Kumon, H.; Ono, N.; Iida, M.; Nickel, J.C. Combination Effect of Fosfomycin and Ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* Growing in a Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1038–1044. [CrossRef]
29. Su, T.; He, J.; Li, N.; Liu, S.; Xu, S.; Gu, L. A Rational Designed PslG with Normal Biofilm Hydrolysis and Enhanced Resistance to Trypsin-Like Protease Digestion. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 760. [CrossRef]
30. Boncompagni, S.R.; Micieli, M.; Di Maggio, T.; Aiezza, N.; Antonelli, A.; Giani, T.; Rossolini, G.M. Activity of fosfomycin/colistin combinations against planktonic and biofilm Gram-negative pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 2199–2208. [CrossRef]
31. Agyeman, A.A.; López-Causapé, C.; Rogers, K.E.; Lucas, D.D.; Cortés-Lara, S.; Gomis-Font, M.A.; Landersdorfer, C.B. Ceftolozane/tazobactam plus tobramycin against free-floating and biofilm bacteria of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strains: Resistance mechanisms and synergistic activity. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2023**, *62*, 106887. [CrossRef]
32. Habash, M.B.; Park, A.J.; Vis, E.C.; Harris, R.J.; Khursigara, C.M. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5818–5830. [CrossRef]
33. Lebeaux, D.; Chauhan, A.; Rendueles, O.; Beloin, C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* **2013**, *2*, 288–356. [CrossRef]
34. Slade-Vitković, M.; Bedenić, B.; Bielen, L.; Batarilo, I.; Kibel, S.; Maravić-Vlahoviček, G. In vitro killing of multidrug/ extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by fosfomycin alone or in combination with antipseudomonal antibiotics. *J. Chemother.* **2023**, *35*, 219–230. [CrossRef]
35. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Monnet, D.L. 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*, 268–281. [CrossRef]
36. López-Montesinos, I.; Horcajada, J.P. Oral and intravenous fosfomycin in complicated urinary tract infections. *Rev. Esp. Quimioter.* **2019**, *32* (Suppl. S1), 37–44.
37. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis* **2007**, *115*, 891–899. [CrossRef]
38. Liu, Y.; Wu, L.; Han, J.; Dong, P.; Luo, X.; Zhang, Y.; Zhu, L. Inhibition of Biofilm Formation and Related Gene Expression of *Listeria monocytogenes* in Response to Four Natural Antimicrobial Compounds and Sodium Hypochlorite. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 617473. [CrossRef]
39. Warraich, A.A.; Mohammed, A.R.; Perrie, Y.; Hussain, M.; Gibson, H.; Rahman, A. Evaluation of anti-biofilm activity of acidic amino acids and synergy with ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9021. [CrossRef]
40. Bernal-Mercado, A.; Vazquez-Armenta, F.; Tapia-Rodriguez, M.; Islas-Osuna, M.; Mata-Haro, V.; Gonzalez-Aguilar, G.; Ayala-Zavala, J.F. Comparison of single and combined use of catechin, protocatechuic, and vanillic acids as antioxidant and antibacterial agents against uropathogenic *Escherichia coli* at planktonic and biofilm levels. *Molecules* **2018**, *23*, 2813. [CrossRef]
41. Wickremasinghe, H.; Yu, H.H.; Azad, M.A.K.; Zhao, J.; Bergen, P.J.; Velkov, T.; Li, J. Clinically relevant concentrations of polymyxin B and meropenem synergistically kill multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and minimize biofilm formation. *Antibiotics* **2021**, *10*, 405. [CrossRef]
42. Monogue, M.L.; Nicolau, D.P. Antibacterial activity of ceftolozane/tazobactam alone and in combination with other antimicrobial agents against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 942–952. [CrossRef]
43. FDA. Ceptaz (Ceftazidime for Injection) [Internet]; England, GlaxoSmithKline: Research Triangle Park, NC, USA, 2021. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2002/050646s014lbl.pdf (accessed on 20 December 2021).
44. FDA. Primaxin (Imipenem and Cilastatin) for Injection, for Intravenous Use; Merck&Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA, 2016. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/050587s074lbl.pdf (accessed on 20 December 2021).
45. FDA. Fresenius Kabi USA, LCC. Gentamicin Injection. 2013. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/062366s033lbl.pdf (accessed on 20 December 2021).
46. FDA. Amikacin Sulfate [Internet]; Abbott Laboratories: North Chicago, IL, USA, 2021. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/64146AP.PDF (accessed on 20 December 2021).

47. Car, H. In Vitro Synergy and Postantibiotic Effect of Colistin Combinations with Meropenem and Vancomycin against Gram Negative Bacteria with Multiple Carbapenem Resistance Mechanisms. Ph.D. Thesis, The Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia, 2020.
48. Markou, N.; Markantonis, S.L.; Dimitrakis, E.; Panidis, D.; Boutzouka, E.; Karatzas, S.; Baltopoulos, G. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: A prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin. Ther.* **2008**, *30*, 143–151. [[CrossRef](#)]
49. Moni, M.; Sudhir, S.; Dipu, T.S.; Mohamed, Z.; Prabhu, B.P.; Edathadathil, F.; Menon, V.P. Clinical efficacy and pharmacokinetics of colistimethate sodium and colistin in critically ill patients in an Indian hospital with high endemic rates of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: A prospective observational study. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *100*, 497–506. [[CrossRef](#)]
50. Das, M.C.; Sandhu, P.; Gupta, P.; Rudrapaul, P.; De, U.C.; Tribedi, P.; Bhattacharjee, S. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23347. [[CrossRef](#)]
51. Abu El-Wafa, W.M.; Ahmed, R.H.; Ramadan, M.A.H. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 1079–1092. [[CrossRef](#)]
52. Shinde, S.; Lee, L.H.; Chu, T. Inhibition of Biofilm Formation by the Synergistic Action of EGCG-S and Antibiotics. *Antibiotics* **2021**, *10*, 102. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.