



Fundació
La Marató de TV3
21º SIMPOSIUM
Enfermedades del corazón



ESTUDIO CLÍNICO Y EXPERIMENTAL DE LA RELACIÓN ENTRE LA CMI A LA VANCOMICINA EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSIBLES A LA METICILINA (MSSA) Y EL PRONÓSTICO DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA IZQUIERDA POR MSSA

Josep Maria Miró Meda

Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

1. Resumen

Los resultados de un estudio anterior (Cervera *et al.*, Clin Infect Dis, 2014) mostraron que, en una serie de 93 casos de endocarditis izquierda por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM), la presencia de una concentración mínima inhibitoria (CMI) a la vancomicina de 1,5-2 mg/L se asociaba a una mayor mortalidad aunque los pacientes se hubieran tratado con cloxacilina.

1.1. Objetivos

Este proyecto tenía cuatro objetivos:

1. Validar este hallazgo en una cohorte de pacientes internacionales procedentes de la colección de la Cohorte Internacional de Endocarditis (International Collaboration on Endocarditis, ICE).
2. Conocer si, en estos 93 casos aislados de SASM, la CMI a la vancomicina se podía asociar a un determinado complejo clonal o a un patrón distintivo de genes de virulencia o producción de biofilm.
3. Describir la historia natural de la endocarditis infecciosa en un modelo animal experimental por SASM con una CMI a la vancomicina alta (1,5-2 mg/L) o baja (<1,5 mg/L).
4. Conocer la eficacia de los tratamientos en monoterapia de cloxacilina, ceftarolina y daptomicina, así como las terapias combinadas de daptomicina más cloxacilina o ceftarolina en la endocarditis experimental por SASM con una CMI a la vancomicina alta (1,5-2 mg/L) o baja (<1,5 mg/L).

1.2. Síntesis del diseño del estudio, procedimientos y métodos

1.2.1. Estudio clínico

Sujetos de estudio. Se han estudiado 114 casos de endocarditis infecciosa (EI) izquierda por SASM confirmados según los criterios de Duke modificados y tratados con nafcilina o cloxacilina, recogidos prospectivamente en la Cohorte Internacional de Endocarditis (ICE-PCS) en el período 2000-2006 y seguidos durante un año.

VARIABLES ANALIZADAS. Características clínicas basales y demográficas: edad, sexo, área geográfica (continente), año de diagnóstico, índice de comorbilidad de Charlson. Características generales de la EI: duración de los síntomas, tipo de EI (nativa o protésica), foco, tipo de adquisición (comunitaria, nosocomial o nosohusial), presencia de complicaciones. Características microbiológicas: CMI vancomicina, número de hemocultivos positivos, otros cultivos. Características ecocardiográficas: válvula afectada, presencia de vegetaciones, tamaño de las vegetaciones, presencia de complicaciones perianulares, disfunción valvular. Tratamiento: tipo de tratamiento antibiótico y duración, tratamiento quirúrgico. Resultados del episodio: mortalidad intrahospitalaria, mortalidad a los 6 meses, recidivas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Las variables categóricas se expresaron en porcentajes y se compararon mediante los test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher. Las variables continuas se expresaron en medias o medianas y se compararon mediante la prueba *t* de Student o el test de Mann-Whitney. La supervivencia se analizó mediante el método de Kaplan-Meier.

1.2.2. Estudios experimentales

1.2.2.1. Estudio *in vitro* molecular

Los SASM objeto de este estudio (las 93 cepas del estudio clínico de Cervera *et al.*) pertenecen a la colección de cepas aisladas de forma consecutiva en el Hospital Clínic de Barcelona (HCB) procedentes de pacientes con endocarditis durante el período 1995-2019. Todos los aislados son sensibles a la vancomicina (EUCAST CMI \leq 2 mg/L). Para determinar si existe una asociación entre uno o más complejos clonales, formación de biofilm, diferentes factores de virulencia y el fenotipo de CMI de la vancomicina baja o alta, se llevó a cabo el tipado molecular de las cepas (por técnica Spa y tipado de secuencia multilocus [MLST]) para diferenciar complejos moleculares de alta virulencia, así como la determinación de su patogenicidad (adhesinas, toxinas, grupo agr, que se determinaron con un cribado de genes mediante la técnica de reacción múltiple en cadena de polimerasa [PCR]) y la capacidad de formación de biofilm.

1.2.2.2. Estudio *in vitro* de sensibilidad antibiótica

Se determinó la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antibióticos objeto del estudio (vancomicina, daptomicina y cloxacilina y ceftarolina) por el método

de microdilución en medio líquido siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y también la determinación de la CMI por Etest siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1.2.2.3. Estudio *in vitro* de sinergia

Como fase previa al modelo experimental, se seleccionaron seis cepas de SASM con CMI baja a la vancomicina y seis cepas de SASM con CMI alta a la vancomicina para valorar la actividad *in vitro* de la daptomicina sola o en combinación con cloxacilina o ceftarolina. El estudio de sinergia se llevó a cabo mediante curvas de letalidad con los antibióticos a concentraciones de 1/2xCMI y 1xCMI. Para su realización, se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Microbiología. A partir de los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* de sinergia se seleccionaron dos cepas de SASM para los estudios *in vivo*: una con una CMI baja a la vancomicina –cepa SASM-673 con CMI a la vancomicina igual a 0,75 mg/L, complejo clonal 30 y agr III y producción de biofilm elevada–, y otra con una CMI alta a la vancomicina –cepa SASM-236 con una CMI a la vancomicina igual a 1,5 mg/L, complejo clonal 45, agr I y producción de biofilm reducida–.

1.2.2.4. Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* de patogenicidad y de eficacia del tratamiento se llevaron a cabo en el modelo de endocarditis aórtica experimental (EE) en conejos. Los antibióticos se administraron siguiendo un modelo de farmacocinética humanizada. Estos estudios se efectuaron en conejos de raza Nueva Zelanda.

1.2.2.4.a. Historia natural de la EE por SASM

Tras inducir una endocarditis aórtica experimental (véase la descripción en el apartado 3.2), el objetivo fue observar y caracterizar el curso de la infección hasta el tercer día tras la inoculación y ver si se presentaban diferencias según la cepa infectante. Para la monitorización *in vivo* de la enfermedad, se realizaron estudios de imagen por tomografía por emisión de positrones (PET) en los animales. Esta técnica de imagen metabólica se basa en la administración intravenosa de un análogo de glucosa marcado con un emisor de positrones (18F-FDG) que en la práctica clínica ha demostrado su capacidad de detectar endocarditis y focos de infección. En este modelo animal, se utilizó para controlar de manera no invasiva la instauración de la infección a nivel del corazón así como para rastrear y localizar los embolismos sépticos antes de la

necropsia. Se realizaron cuatro PET a cada animal en las siguientes etapas: basal (día 1, antes de la inoculación de SASM), y 24, 48 y 72 horas tras la inoculación. Para la realización de estos estudios se utilizaron los servicios de la unidad de investigación Micro-PET CIMA-CUN (Pamplona). Tras la muerte del animal, se llevó a cabo la extracción y cultivo de las vegetaciones adheridas a los velos de la válvula aórtica, así como del cerebro, bazo y riñón. Las muestras obtenidas se pesaron, se homogenizaron y se cultivaron cuantitativamente, y los contajes se expresaron en \log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido.

1.2.2.4.b. Evaluación de la eficacia de nuevos antibióticos en la EE por SASM en dos cepas con diferentes perfiles de virulencia y sensibilidad a la vancomicina

Estudio farmacocinético. Los tratamientos antibióticos del modelo de eficacia terapéutica se administraron aplicando un modelo de farmacocinética humanizada. La farmacocinética humanizada se basa en la administración por vía endovenosa, con bombas de infusión controladas por ordenador, de dosis decrecientes de antibiótico al conejo. De esta manera se simula en el animal el perfil de concentraciones séricas del antibiótico en el humano.

Modelo experimental de endocarditis aórtica. Se indujo una endocarditis bacteriana experimental en la válvula aórtica de conejos blancos de raza Nueva Zelanda usando una modificación de la técnica descrita por Garrison y Freedman (Garrison, Freedman, *Yale J Biol Med*, 1970; 42: 394-410). 24 horas después de la colocación del catéter intracardiaco, se infecta al animal por la vena marginal de la oreja con 1 mL de solución salina que contiene 10^5 UFC/mLm que equivale a la DI_{90} (dosis que infecta al 90% de los animales). Al cabo de 16 horas, se obtiene una muestra de sangre para asegurar la presencia de endocarditis y se inicia el tratamiento. Los antibióticos se administran siguiendo el modelo de farmacocinética humanizada mediante bombas de infusión controladas por un ordenador durante dos días. Una vez finalizada la infusión, se dejan transcurrir seis semividas para asegurar que no hay niveles del antibiótico en sangre. Después, se sacrifican los animales y a continuación se les realiza la autopsia. Se abre la cavidad torácica, se extrae el corazón y se disecan asépticamente los velos de la válvula aórtica, así como del resto de órganos que se estudiarán (bazo y riñón). Todos los tejidos se pesan y se homogeneizan con 2 mL de solución salina. El homogeneizado se cultiva cuantitativamente en caldo de soja tripticasa y los resultados se expresan como \log_{10} UFC por gramo de vegetación (UFC/g veg).

Grupos de tratamiento. Se utilizaron dos cepas de SASM, una con una CMI para la vancomicina inferior a 1,5 mg/L y otra con una CMI a la vancomicina superior a 1,5 mg/L, que se identificaron en el estudio *in vitro* para representar respectivamente el fenotipo de CMI alto y bajo a vancomicina. Se analizaron los siguientes grupos de tratamiento para cada una de las dos cepas:

Cepa SASM con CMI baja a vancomicina (= 0,75 mg/L): grupo control (sin tratamiento); cloxacilina (2 g cada 4 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h) + cloxacilina (2 g cada 4 h); ceftarolina (600 mg cada 8 h).

Cepa SASM con CMI alta a vancomicina (= 1,5 mg/L): grupo control (sin tratamiento); cloxacilina (2 g cada 4 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h) + cloxacilina (2 g cada 4 h); ceftarolina (600 mg cada 8 h).

- Seguimiento de la resistencia a los antibióticos: para detectar la posible aparición de resistencias, en los aislados recuperados de las muestras se testó su CMI a la vancomicina, daptomicina y ceftarolina por Etest, y se estudió la eventual aparición de subpoblaciones resistentes mediante análisis poblacionales.

2. Resultados

1. Los resultados del estudio clínico se recogen en el artículo publicado en la revista *Clinical Microbiology and Infection* (Pericàs, 2017). En el estudio se concluye que en esta cohorte internacional de pacientes con endocarditis izquierda ocasionada por SASM y tratados con antibióticos betalactámicos, el fenotipo de la CMI a la vancomicina no se asoció a un peor pronóstico clínico (mayor mortalidad). Tampoco se encontraron diferencias en los patrones genéticos de virulencia, linajes clonales ni formación de biofilm entre las cepas con un fenotipo alto o bajo a la vancomicina.

2. Los resultados y discusión del segundo objetivo planteado en este estudio se recogen en el artículo publicado en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Pericàs, 2020). En el estudio, se muestra cómo no se pudo encontrar un patrón diferencial en los genes de virulencia, linajes clonales o diferencias en la capacidad de

formación de biofilm que explique el peor pronóstico de las endocarditis por SASM que se presentaron en el estudio previo de los pacientes (Cervera *et al.*, *Clin Infect Dis*, 2014) que tuvieron una endocarditis causada por cepas de SASM con una CMI alta a la vancomicina.

3. Los resultados del tercer objetivo del estudio se presentaron en el congreso de la SEIMC del año 2018, y obtuvieron el premio a la mejor comunicación oral –se otorgaron seis premios en esta categoría– (véase en el apartado de presentaciones a congresos del apartado “Bibliografía científica generada”; actualmente se está elaborando el manuscrito correspondiente).

Este estudio concluyó que, a pesar de que la mortalidad fue significativamente mayor en el grupo de animales infectados con la cepa de SASM de fenotipo alto de la CMI de la vancomicina, el fenotipo de la vancomicina (alto o bajo) no influyó en la concentración de las bacterias en las vegetaciones valvulares ni en la diseminación extracardíaca de la infección en el modelo de endocarditis experimental por SASM en el conejo.

4. Respecto al cuarto objetivo de evaluar la eficacia de la cloxacilina, la ceftarolina y la daptomicina en monoterapia o las combinaciones de daptomicina con cloxacilina o ceftarolina en el modelo de endocarditis experimental por SASM con fenotipo de CMI alto y bajo de vancomicina, a medida que se han ido obteniendo los resultados de este estudio se han ido presentando en diferentes congresos nacionales (SEICAV 2018 [2]) e internacionales (ECCMID 2019 [3], ISCVID 2019 [4]), en forma de póster en el primer caso y como comunicaciones orales en el segundo (véase en el apartado de presentaciones a congresos del apartado “Bibliografía científica generada”; actualmente se está elaborando el manuscrito correspondiente).

Los resultados de este estudio muestran que no se presentaron diferencias en cuanto a la eficacia de los distintos tratamientos antibióticos entre las dos cepas seleccionadas (cada una representante de los fenotipos alto y bajo a la vancomicina), así que los grupos se evaluaron juntos. Nuestro estudio concluyó que en el modelo experimental de endocarditis por SASM, ceftarolina en las dos dosis estudiadas mostraba una actividad superior a la cloxacilina, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. También se observó que cuando la daptomicina se administró en

monoterapia a dosis de 6 o 10 mg/kg al día, en 4/20 (20%) y en 1/19 (5%) de los aislados recuperados se había desarrollado resistencia a la daptomicina tanto en las vegetaciones valvulares como en los abscesos renales y esplénicos. La daptomicina en monoterapia fue menos activa que los betalactámicos en las metástasis extracardíacas (bazo y riñón). La adición de cloxacilina o ceftarolina mejoró de forma significativa su actividad. Las combinaciones de daptomicina más cloxacilina o ceftarolina mostraron una actividad sinérgica y bactericida, y presentaron una mejor actividad que cloxacilina o ceftarolina en monoterapia ($p < 0,05$ en ambos casos) en la tasa de esterilización de las vegetaciones y previnieron en todos los casos la aparición de cepas resistentes a la daptomicina.

Así pues, estos resultados justifican el uso de la combinación de daptomicina con cloxacilina o ceftarolina en el tratamiento de la endocarditis por SASM independientemente del fenotipo de la vancomicina.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Este estudio ha demostrado lo siguiente:

1. La CMI de la vancomicina no es un factor pronóstico en la endocarditis infecciosa por SASM.
2. No se ha demostrado una relación entre la CMI de la vancomicina y algún factor de virulencia o patogenicidad.
3. Se ha mostrado que existe una relación entre la CMI de la vancomicina elevada y una mayor mortalidad en el modelo experimental de la historia natural de la endocarditis infecciosa por SASM.
4. Las combinaciones de daptomicina y cloxacilina o ceftarolina fueron superiores a las monoterapias respectivas y evitaron la aparición de resistencias a la daptomicina. La daptomicina sería el tratamiento de elección y siempre debe administrarse en dosis altas y combinada con antibióticos betalactámicos para evitar la aparición de resistencias.

Es por todo ello que los resultados de este proyecto de La Marató ayudarán a mejorar el tratamiento antibiótico de la endocarditis por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM) y tendrán impacto en el diseño de ensayos clínicos y en las guías de práctica clínica.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones

Pericàs JM, Messina JA, García-de-la-Mària C, Park L, Sharma-Kuinkel BK, Marco F, Wray D, Kanafani Z, Carugati M, Durante-Mangoni E, Tattevin P, Chu VH, Moreno A, Fowler Jr VG, Miró JM, International Collaboration on Endocarditis Microbiology Investigators.

Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the outcome of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus left-sided infective endocarditis treated with antistaphylococcal b-lactaman antibiotics: a prospective cohort study by the International Collaboration on Endocarditis.

Clin Microbiol Infect. 2017; 23: 544-549.

Gudiol F, Aguado JM, Almirante B, Bouza E, Cercenado E, Domínguez MÁ, Gasch O, Lora-Tamayo J, Miró JM, Palomar M, Pascual A, Pericàs JM, Pujol M, Rodríguez-Baño J, Shaw E, Soriano A, Vallés J.

Diagnosis and treatment of bacteremia and endocarditis due to Staphylococcus aureus. A clinical guideline from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC).

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015 pii: S0213-005X (15)00125-1.

Gudiol F, Aguado JM, Almirante B, Bouza E, Cercenado E, Domínguez MÁ, Gasch O, Lora-Tamayo J, Miró JM, Palomar M, Pascual A, Pericàs JM, Pujol M, Rodríguez-Baño J, Shaw E, Soriano A, Vallés J.

Executive summary of the diagnosis and treatment of bacteremia and endocarditis due to Staphylococcus aureus. A clinical guideline from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC).

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. Apr 30. pii: S0213-005X(15)00124-X. doi: 10.1016/j.eimc.2015.03.014.

Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP, Del Zotti F, Dulgheru R, El Khoury G, Erba PA, Iung B, Miró JM, Mulder BJ, Plonska-Gosciniak E, Price S, Roos-Hesselink J *et al.*

2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM).

Eur Heart J. 2015; 36: 3075-3128.

Pericàs JM, Cervera C, García-de-la-Mària C, Sharma-Kuinkel BK, Gonzales R, Moreno A, Almela M, Falces C, Quintana E, Fuster D, Marco F, Bayer AS, Fowler VG, Miró JM; Hospital Clinic Endocarditis Study Group. *Relationship between Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration with Virulence Genes Expression and Clonal Complexes of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) Strains Isolated from Left-sided Endocarditis.*

Antimicrob Agents Chemother. 2020; Jan 6. pii: AAC.01579-19. doi: 10.1128/AAC.01579-19.

García-de-la-Mària C, Gasch O, Castañeda X, García-González J, Soy D, Cañas M, Ambrosioni J, Almela M, Pericàs JM, Téllez A, Falces C, Hernández-Meneses M, Sandoval E, Quintana E, Vidal B, Tolosana JM, Fuster D, Llopis J, Moreno A, Marco F, Miró JM.

Cloxacillin or fosfomicin plus daptomycin combinations are more active than cloxacillin plus gentamicin against methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in a rabbit model of experimental endocarditis. Manuscrito en revisión en la revista Journal of Antimicrobial and Chemotherapy (manuscript ID: JAC-2019-2165).

Presentaciones en congresos

García-de-la-Mària C, Collantes M, Fuster D, Pericàs JM, García-González J, Almela M, Hernández-Meneses M, Ambrosioni J, Sandoval E, Vidal B, Tolosana JM, Quintana E, Falces C, Llopis J, Marco F, Bayer AS, Fowler V, Moreno A, Peñuelas I, Miró JM.

La CMI a la vancomicina no influye en la historia natural de la endocarditis experimental (EE) por Staphylococcus aureus sensible a meticilina (SASM).

XXII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Bilbao, 24-26 de mayo, 2018.

Tipo de presentación: comunicación oral (PO#0161). Esta comunicación oral obtuvo un premio a la mejor comunicación.

García-de-la-Mària C, García-González J, Villamonte M, Almela M, Ambrosioni J, Quintana E, Hernández-Meneses M, Falces C, Téllez A, Pericàs JM, Vidal B, Llopis J, Moreno A, Miró JM, Grupo de Estudio de la Endocarditis del Hospital Clínic.

Eficacia de daptomicina y cloxacilina en el tratamiento de la endocarditis experimental por Staphylococcus aureus sensible a la meticilina.

VII Congreso de la Sociedad Española de Infecciones Cardiovasculares (SEICAV).
Sevilla, 16-17 de noviembre, 2018.

Tipo de presentación: póster (P-32).

García-de-la-Mària C, García-González J, Villamonte M, Almela M, Ambrosioni J, Quintana E, Hernández-Meneses M, Falces C, Téllez A, Pericàs JM, Vidal B, Llopis J, Moreno A, Miró JM, Hospital Clinic Endocarditis Study Group

Efficacy of daptomycin plus cloxacillin, cloxacillin and ceftaroline in the treatment of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) Experimental Endocarditis.

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID).

Ámsterdam, Holanda, 13-16 de abril, 2019.

Tipo de presentación: presentación oral.

García-de-la-Mària C, García-González J, Almela M, Ambrosioni J, Cañas MA, Quintana E, Hernández-Meneses M, Falces C, Téllez A, Pericàs JM, Vidal B, Fuster D, Llopis J,¹ Moreno A, Miró JM, Hospital Clinic Endocarditis Study Group.

Efficacy of daptomycin plus cloxacillin or ceftaroline in the treatment of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) Experimental Endocarditis.

XV International Society for Cardiovascular Infectious Diseases Symposium (ISCVID).

Lausana, Suiza, 2-4 de junio, 2019.

Tipo de presentación: presentación oral.