



Fundació
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM
Malalties del cor



**ESTUDI CLÍNIC I EXPERIMENTAL DE LA RELACIÓ ENTRE
LA CMI A LA VANCOMICINA EN *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* SENSIBLES A LA METICIL·LINA (MSSA) I EL
PRONÒSTIC DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA
ESQUERRA PER MSSA**

Josep Maria Miró Meda

Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

1. Resum

Els resultats d'un estudi anterior (Cervera *et al.*, Clin Infect Dis, 2014) van mostrar que, en una col·lecció de 93 casos d'endocarditis esquerra per *Staphylococcus aureus* sensible a la meticil·lina (SASM), la presència d'una concentració mínima inhibidora (CMI) a la vancomicina d'1,5-2 mg/L s'associava a una mortalitat més alta tot i que els pacients havien estat tractats amb cloxacil·lina.

1.1. Objectius

Aquest projecte tenia quatre objectius:

1. Validar aquesta troballa en una cohort de pacients internacionals procedents d'una col·lecció de la Cohort Internacional d'Endocarditis (International Collaboration on Endocarditis, ICE).
2. Conèixer si, en aquests 93 casos aïllats de SASM, la CMI a la vancomicina es podia associar a un complex clonal o a un patró característic de gens de virulència o de producció de biofilm.
3. Descriure la història natural de l'endocarditis infecciosa en un model animal experimental per SASM amb una CMI a la vancomicina alta (1,5-2 mg/L) o baixa (<1,5 mg/L).
4. Conèixer l'eficàcia dels tractaments en monoteràpia de cloxacil·lina, ceftarolina i daptomicina, així com els tractaments combinats de daptomicina més cloxacil·lina o de ceftarolina a l'endocarditis experimental per SASM amb una CMI a la vancomicina alta (1,5-2 mg/L) o baixa (<1,5 mg/L).

1.2 Síntesi del disseny de l'estudi, procediments i mètodes

1.2.1. Estudi clínic

Subjectes de l'estudi. S'han estudiat 114 casos d'endocarditis infecciosa (EI) esquerra per SASM confirmats segons els criteris de Duke modificats i tractats amb nafcil·lina o cloxacil·lina, recollits de forma prospectiva en la Cohort Internacional d'Endocarditis (ICE-PCS) en el període 2000-2006 i seguits durant tot un any.

Variabls analitzades. Característiques clíniques basals i demogràfiques: edat, sexe, àrea geogràfica (continent), any de diagnòstic, índex de comorbiditats de Charlson. Característiques generals de l'EI: durada dels símptomes, tipus d'EI (nativa o protètica), focus, tipus d'adquisició (comunitària, nosocomial o nosohusial) i presència de complicacions. Característiques microbiològiques: CMI vancomicina, nombre d'hemocultius positius, altres cultius. Característiques ecocardiogràfiques: vàlvula afectada, presència de vegetacions, mida de les vegetacions, presència de complicacions perianulars, disfunció valvular. Tractament: tipus de tractament antibiòtic i durada, tractament quirúrgic. Resultats de l'episodi: mortalitat intrahospitalària, mortalitat al cap de sis mesos, recidives.

Anàlisi estadística. Les variables categòriques es van expressar com a percentatges i es van comparar mitjançant el test de Chi quadrat o el test exacte de Fisher. Les variables contínues es van expressar en mitjanes o medianes i es van comparar mitjançant la prova *t* de Student o el test de Mann-Whitney. La supervivència es va analitzar mitjançant el mètode de Kaplan-Meier.

1.2.2. Estudis experimentals

1.2.2.1. Estudi *in vitro* molecular

Els SASM objecte d'aquest estudi (les 93 soques de l'estudi clínic de Cervera *et al.*) pertanyen a la col·lecció de soques aïllades de manera consecutiva a l'Hospital Clínic de Barcelona (HCB) procedents de pacients diagnosticats d'endocarditis en el període 1995-2019. Tots els aïllats són sensibles a la vancomicina (EUCAST CME \leq 2 mg/L). Per conèixer si hi ha una associació entre un o més complexos clonals, formació de biofilm, diferents factors de virulència i el fenotip de CMI de la vancomicina baixa o alta, es va dur a terme el tipatge molecular de les soques (per tècnica Spa i tipatge de seqüència multilocus [MLST] per diferenciar complexos moleculars d'alta virulència) així com la determinació de la seva patogenicitat (adhesines, toxines, grup agr, que es van determinar amb un cribratge de gens mitjançant la tècnica de reacció múltiple en cadena de polimerasa [PCR]) i la capacitat de formació de biofilm.

1.2.2.2. Estudi *in vitro* de sensibilitat antibiòtica

Es va determinar la CMI i la concentració mínima bactericida (CMB) dels antibiòtics objecte de l'estudi (vancomicina, daptomicina, cloxacil·lina i ceftarolina) pel mètode

de microdilució en medi líquid seguint les recomanacions del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) i també la determinació de la CMI per Etest seguint les recomanacions del fabricant.

1.2.2.3. Estudi *in vitro* de sinergia

Com a fase prèvia al model experimental, es van seleccionar sis soques de SASM amb CMI baixa a la vancomicina i sis soques de SASM amb CMI alta a la vancomicina per valorar l'activitat *in vitro* de la daptomicina sola o en combinació amb cloxacil·lina o ceftarolina. L'estudi de sinergia es va dur a terme mitjançant corbes de letalitat amb els antibiòtics a concentracions d' $1/2 \times \text{CMI}$ i $1 \times \text{CMI}$. L'estudi es va fer seguint les recomanacions de la Societat Americana de Microbiologia. Segons els resultats obtinguts en els estudis *in vitro* de sinergia, es van seleccionar dues soques de SASM per als estudis *in vivo*: una amb una CMI baixa a la vancomicina –soca SASM-673 amb CMI a la vancomicina igual a 0,75 mg/L, complex clonal 30, agr III i producció de biofilm elevada–, i una altra amb una CMI alta a la vancomicina –soca SASM-236 amb una CMI a la vancomicina igual a 1,5 mg/L, complex clonal 45, agr I i producció de biofilm reduïda–.

1.2.2.4. Estudis *in vivo*

Els estudis *in vivo* de patogenicitat i d'eficàcia del tractament es van dur a terme en el model d'endocarditis aòrtica experimental (EE) en conill. Els antibiòtics es van administrar seguint un model de farmacocinètica humanitzada. Aquests estudis es van fer en conills de raça Nova Zelanda.

1.2.2.4.a. Història natural de l'EE per SASM

Després d'induir una endocarditis aòrtica experimental (vegeu la descripció en l'apartat 3.2), l'objectiu va ser observar i caracteritzar el curs de la infecció fins al tercer dia després de la inoculació, així com veure si es presentaven diferències segons la soca infectant. Per al monitoratge *in vivo* de la malaltia, es van fer estudis d'imatge per tomografia per emissió de positrons (PET) en els animals. Aquesta tècnica d'imatge metabòlica es basa en l'administració intravenosa d'un anàleg de glucosa marcat amb un emissor de positrons (^{18}F -FDG) que en la pràctica clínica ha demostrat la capacitat de detectar l'endocarditis i els focus d'infecció. En aquest model animal, el PET es va utilitzar per controlar de manera no invasiva la instauració

de la infecció en l'àmbit del cor, així com per rastrejar i localitzar els embolismes sèptics abans de la necròpsia. Es van fer quatre PET a cada animal en les etapes següents: basal (dia 1, abans de la inoculació del SASM), i 24, 48 i 72 hores després de la inoculació. Per fer aquests estudis, es van utilitzar els serveis de la unitat d'investigació Micro-PET CIM-CUN (Pamplona). Després de la mort de l'animal, es va dur a terme l'extracció i cultiu de les vegetacions adherides als vels de la vàlvula aòrtica, així com del cervell, la melsa i el ronyó. Les mostres obtingudes es van pesar, es van homogeneïtzar i es van cultivar quantitativament; els comptatges es van expressar en \log_{10} d'unitats formadores de colònies (UFC) per gram de teixit.

1.2.2.4.b. Avaluació de l'eficàcia de nous antibiòtics en l'EE per SASM en dues soques amb diferents perfils de virulència i sensibilitat a la vancomicina

Estudi farmacocinètic. Els tractaments antibiòtics del model d'eficàcia terapèutica es van administrar aplicant un model de farmacocinètica humanitzada. La farmacocinètica humanitzada es basa en l'administració per via endovenosa, amb bombes d'infusió controlades per ordinador, de dosis decreixents d'antibiòtic al conill. D'aquesta manera, en l'animal se simula el perfil de concentracions sèriques de l'antibiòtic en l'humà.

Model experimental d'endocarditis aòrtica. Es va induir una endocarditis bacteriana experimental a la vàlvula aòrtica de conills blancs de raça Nova Zelanda fent servir una modificació de la tècnica descrita per Garrison i Freedman (Garrison i Freedman, Yale J Biol Med, 1970; 42: 394-410). Al cap de 24 hores d'haver col·locat el catèter intracardíac, l'animal s'infecta per la vena marginal de l'orella amb 1 mL de solució salina que conté 10^5 UFC/ml, que equival a la DI_{90} (dosi que infecta el 90% dels animals). Al cap de 16 hores, s'obté una mostra de sang per assegurar la presència d'endocarditis i s'inicia el tractament. Els antibiòtics s'administren seguint el model de farmacocinètica humanitzada mitjançant bombes d'infusió controlades per un ordinador durant dos dies. Un cop finalitzada la infusió, es deixen transcórrer sis semivides per assegurar que no hi ha nivells de l'antibiòtic en sang. Després, se sacrifiquen els animals i tot seguit se'ls fa l'autòpsia. S'obre la cavitat toràcica, s'extreu el cor i es dissequen asèpticament els vels de la vàlvula aòrtica així com de la resta d'òrgans que s'estudiaran (melsa i ronyó). Tots els teixits es pesen i s'homogeneïtzen amb 2 mL de solució salina. L'homogeneïtzat es cultiva

quantitativament en brou de soja tripticasa i els resultats s'expressen com \log_{10} UFC per gram de vegetació (UFC/g veg).

Grups de tractament. Es van utilitzar dues soques de SASM, una amb una CMI per a la vancomicina inferior a 1,5 mg/L i una altra amb una CMI a la vancomicina superior a 1,5 mg/L, que es van identificar en l'estudi *in vitro* per representar respectivament el fenotip de CMI alt i baix a vancomicina. Es van analitzar els següents grups de tractament per a cadascuna de les soques:

Soca SASM amb CMI baixa a la vancomicina (= 0,75 mg/L): grup control (sense tractament); cloxacil·lina (2 g cada 4 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h) + cloxacil·lina (2 g cada 4 h); ceftarolina (600 mg cada 8 h).

Soca SASM amb CMI alta a la vancomicina (= 1,5 mg/L): grup control (sense tractament); cloxacil·lina (2 g cada 4 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h); daptomicina (10 mg/kg cada 24 h) + cloxacil·lina (2 g cada 4 h); ceftarolina (600 mg cada 8 h).

- Seguiment de la resistència als antibiòtics: per detectar la possible aparició de resistències, en els aïllats recuperats a les mostres es va testar la seva CMI a la vancomicina, daptomicina i ceftarolina per Etest, i mitjançant anàlisis poblacionals es va estudiar l'aparició eventual de subpoblacions resistents.

2. Resultats

1. Els resultats de l'estudi clínic es recullen en l'article publicat a la revista *Clinical Microbiology and Infection* (Pericàs, 2017). En l'estudi es conclou que, en aquesta cohort internacional de pacients amb endocarditis esquerra ocasionada per SASM i tractats amb antibiòtics betalactàmics, el fenotip de la CMI a la vancomicina no es va associar a un pitjor pronòstic clínic (més mortalitat). Tampoc es van trobar diferències en els patrons genètics de virulència, llinatges clonals ni formació de biofilm entre les soques amb un fenotip alt o baix a la vancomicina.

2. Els resultats i la discussió del segon objectiu plantejat en aquest estudi es recullen en l'article publicat a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Pericàs, 2020). En aquest estudi es mostra com no es va poder trobar un patró diferencial en les soques respecte als gens de virulència, llinatges clonals o diferències en la capacitat de formació de biofilm que expliqui el pitjor pronòstic de les endocarditis per SASM que es van presentar en l'estudi previ dels pacients (Cervera *et al.*, *Clin Infect Dis*, 2014) que van patir una endocarditis ocasionada per soques de SASM amb una CMI alta a la vancomicina.

3. Els resultats del tercer objectiu de l'estudi es van presentar al congrés de la SEIMC de l'any 2018, i van obtenir el premi a la millor comunicació oral –es van atorgar sis premis en aquesta categoria– (vegeu la citació a l'apartat de presentacions a congressos de l'apartat "Bibliografia científica generada"; actualment s'està elaborant el manuscrit corresponent).

Aquest estudi va concloure que, tot i que la mortalitat va ser significativament més alta en el grup d'animals infectats amb la soca de SASM de fenotip alt de la CMI de la vancomicina, el fenotip de la vancomicina (alt o baix) no va influir en la concentració de bacteris en les vegetacions valvulars ni en la disseminació extracardíaca de la infecció en el model d'endocarditis experimental per SASM en el conill.

4. Respecte al quart objectiu, d'avaluar l'eficàcia de la cloxacil·lina, la ceftarolina i la daptomicina en monoteràpia o de les combinacions de daptomicina amb cloxacil·lina o ceftarolina en el model d'endocarditis experimental per SASM amb fenotip de CMI alt i baix de vancomicina, a mesura que s'han anat obtenint els resultats d'aquest estudi s'han anat presentant en diferents congressos nacionals (SEICAV 2018 [2]) i internacionals (ECCMID 2019 [3], ISCVID 2019 [4]) en forma de pòster i després en dues comunicacions orals respectivament (vegeu l'apartat de presentacions a congressos de l'apartat "Bibliografia científica generada"; actualment s'està elaborant el manuscrit corresponent).

Els resultats d'aquest estudi mostren que no es van presentar diferències quant a l'eficàcia dels diferents tractaments antibiòtics entre les dues soques seleccionades (cadascuna representant dels fenotips alt i baix a la vancomicina), així que els grups

es van avaluar junts. El nostre estudi va concloure que en el model experimental d'endocarditis per SASM, la ceftarolina en les dues dosis estudiades mostrava una activitat superior a la cloxacil·lina, tot i que les diferències no van ser estadísticament significatives. També es va observar que quan la daptomicina es va administrar en monoteràpia en dosis de 6 o 10 mg/kg al dia, en 4/20 (20%) i en 1/19 (5%) dels aïllats recuperats s'havia desenvolupat resistència a la daptomicina tant en les vegetacions valvulars com en els abscessos renals i esplènics. La daptomicina en monoteràpia va ser menys activa que els betalactàmics en les metàstasis extracardíaques (melsa i ronyó). L'addició de cloxacil·lina o ceftarolina va millorar de manera significativa la seva activitat. Les combinacions de daptomicina més cloxacil·lina o ceftarolina van mostrar una activitat sinèrgica i bactericida, i van presentar una millor activitat que la cloxacil·lina o la ceftarolina en monoteràpia ($p < 0,05$ en tots dos casos) en la taxa d'esterilització de les vegetacions i va prevenir en tots els casos l'aparició de soques resistents a la daptomicina.

Així doncs, aquests resultats justifiquen l'ús de la combinació de daptomicina amb cloxacil·lina o ceftarolina en el tractament de l'endocarditis per SASM independentment del fenotip de la vancomicina.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Aquest estudi ha demostrat el següent:

1. La CMI de la vancomicina no és un factor pronòstic en l'endocarditis infecciosa per SASM.
2. No s'ha demostrat una relació entre la CMI de la vancomicina i algun factor de virulència o patogenicitat.
3. S'ha mostrat que hi ha una relació entre la CMI de la vancomicina elevada i una mortalitat més gran en el model de la història natural de l'endocarditis infecciosa experimental per SASM.

4. Les combinacions de daptomicina i cloxacil·lina o ceftarolina van ser superiors a les monoteràpies respectives i van evitar l'aparició de resistències a la daptomicina. La daptomicina seria el tractament d'elecció i sempre s'ha d'administrar en dosis altes i combinada amb antibiòtics betalactàmics per evitar l'aparició de resistències.

És per tot això que els resultats d'aquest projecte de La Marató ajudaran a millorar el tractament antibiòtic de l'endocarditis per *Staphylococcus aureus* sensible a la meticil·lina (SASM) i tindran impacte en el disseny d'assajos clínics i en les guies de pràctica clínica.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions

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. Manuscrit en revisió a la revista Journal of Antimicrobial and Chemotherapy (manuscript ID: JAC-2019-2165).

Presentacions en congressos

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 maig, 2018.

Tipus de presentació: comunicació oral (PO#0161). Aquesta comunicació oral va obtenir un premi a la millor comunicació.

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 novembre, 2018.

Tipus de presentació: pòster (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).

Amsterdam, Holanda, 13-16 d'abril, 2019.

Tipus de presentació: presentació 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, Suïssa, 2-4 de juny, 2019.

Tipus de presentació: presentació oral.