



Recomendaciones para la Realización de Estudios de Sinergia ceftazidima/avibactam con aztreonam en Cepas Multiresistentes, Especialmente Enterobacteriales Productores de Metalobetalactamasas.

N°01/2024.

Santiago, enero 2024.

Introducción:

Una de las mayores dificultades a las que se ven enfrentados los clínicos en la selección de antimicrobianos en la actualidad es la falta de disponibilidad en alternativas de tratamiento en aquellas infecciones causadas por cepas con multiresistencia. La aparición de ceftazidima/avibactam (Caz/Avi) como alternativa terapéutica ha logrado otorgar un breve alivio en estos casos.

Por otra parte, aztreonam sigue teniendo gran efectividad ante las metalobetalactamasas, pero la aparición de cepas resistentes ha limitado su uso, por lo tanto, ha surgido la necesidad de potenciar la actividad de éste y se ha logrado al realizar la sinergia con ceftazidima/avibactam, sobre todo en cepas con metalobetalactamasas, donde Caz/Avi actúa como indicador de la presencia de este mecanismo, por su alta resistencia.

Ante la necesidad de incorporar nuevas metodologías para visualizar este efecto de sinergia entre dos antimicrobianos, o la capacidad de potenciar la acción en uno de ellos, el laboratorio de Referencia del ISP realizó una verificación de las metodologías descritas.

En cepas Enterobacteriales con un perfil de alta resistencia, donde se ha demostrado el desempeño del método del estudio de sinergia in vitro, se avala la implementación en el laboratorio del estudio de sinergia para orientar un tratamiento adecuado, por lo que el ISP recomienda fortalecer el estudio in vitro y evaluar los resultados obtenidos en conjunto con el médico tratante.

El estudio de sinergia se recomienda en cepas de Enterobacteriales con sospecha de presencia de metalobetalactamasas, con resultado intermedio o resistente a aztreonam.

En este documento se detallan todas las metodologías descritas e implementadas por el laboratorio de Referencia ISP para la evaluación de sinergia entre estos 2 antimicrobianos.

Métodos descritos:

Se realizaron cuatro metodologías para evaluar sinergia entre ceftazidima-avibactam y aztreonam: Elución con discos, Tiras de gradientes paralelas, Tiras de gradientes cruzadas y sinergia con discos por método de Kirby-Bauer (desarrollo en laboratorio de Referencia ISP).

Para esto, se seleccionaron cepas de Enterobacteriales productoras de metalobetalactamasas correspondientes a cepas controles internacionales y cepas previamente confirmadas pertenecientes a la vigilancia nacional. El criterio de selección incluyó cepas que presentaran valores de susceptibilidad en el rango intermedio y/o resistente para aztreonam.

Materiales:

- Caldo Mueller-Hinton (marcas probadas en ISP: THERMO FISHER, OXOID/DIFCO).
- Tubos Khan.
- Discos de ceftazidima-avibactam 30/20 µg y/o discos de 4/10µg.
- Discos de aztreonam 30 µg.
- Cepas controles (control positivo y negativo de sinergia).

I. MÉTODO TIRAS DE GRADIENTE PARALELAS

Inóculo:

Suspensión 0,5 MacFarland de la cepa problema en solución salina según las recomendaciones para el patógeno a estudiar y diseminar según método de estudio de susceptibilidad.

Procedimiento:

Inocular la placa de medio Mueller-Hinton utilizado para estudio de susceptibilidad, dejar secar y colocar en ambiente estéril, las tiras de gradiente de ceftazidima/avibactam y de aztreonam en disposición frente a frente en la placa, a una distancia aproximada de 3 cm (medido de centro a centro de cada tira).

INCUBACIÓN:

35+/-2 °C en aire ambiente, 18 a 24 hrs según características de la cepa.

ESQUEMA DE TRABAJO:



Lectura e Interpretación

Se evalúa la capacidad de ambos antimicrobianos de potenciar su poder bactericida, demostrado por un efecto in vitro de sinergia. Se debe leer el valor de CIM de cada tira de gradiente de manera habitual:

CIM individual de la droga A.

CIM individual de la droga B.

En esta etapa y en algunas ocasiones se puede observar la presencia de un efecto directo inhibitorio entre ambas tiras. Este hallazgo es indicativo de sinergia entre ambos antimicrobianos y la prueba se interpreta como positiva (ver imagen 1). En este caso no es necesario pasar a la etapa siguiente de las tiras cruzadas.

Si no hay efecto en el espacio entre tiras, no se descarta la presencia de sinergia, por lo que se deben registrar los valores de CIM obtenidos y proceder al método de tiras de gradiente cruzadas.



Imagen 1. Efecto con sinergia positiva con tiras de gradientes paralelas.

II. MÉTODO DE TIRAS DE GRADIENTES CRUZADAS

Inóculo:

Suspensión 0,5 MacFarland de la cepa problema en solución salina según las recomendaciones para el patógeno a estudiar y diseminar según método de susceptibilidad.

Procedimiento:

Inocular placa de medio Mueller-Hinton utilizado para estudio de susceptibilidad, dejar secar y colocar las tiras de gradiente de ceftazidima/avibactam en disposición cruzada con la tira de aztreonam según el valor de CIM obtenido en el método de tiras paralelas.

Ejemplo:

CIM individual de la droga A (ceftazidima/avibactam): >256 µg/ml

CIM individual de la droga B (aztreonam): 128 µg/ml

Se debe realizar una disposición cruzada de las tiras de acuerdo al valor de CIM obtenido en el paso anterior. Primero depositar en la placa la tira de antimicrobiano que presentó la CIM más baja, ejemplo: CIM 128 (droga B) y luego a este nivel de CIM, cruzar en 90° la otra tira con CIM más alta, es decir se cruza a nivel de 256 (droga A).

Incubación:

35+/-2 °C en aire ambiente, 18 a 24 hrs según características de la cepa.

NOTA: Se recomienda colocar primero la tira de gradiente con el valor de CIM más bajo para mejor resultado.



Lectura e Interpretación

Se evalúa la capacidad de ambos antimicrobianos de potenciar su poder bactericida, demostrado por un efecto in vitro de sinergia.

Se debe leer el cuadrante donde se deforma la elipse de inhibición por la interacción de ambos antimicrobianos, realizar lectura en la zona indicada en el cuadrante (ver imagen 2).

Si los nuevos valores de CIM son dos o más diluciones más bajas que las obtenidas en la etapa anterior, se considera el test de sinergia como positivo. Para objetivar el fenómeno de sinergia, se debe realizar un cálculo con los resultados obtenidos.

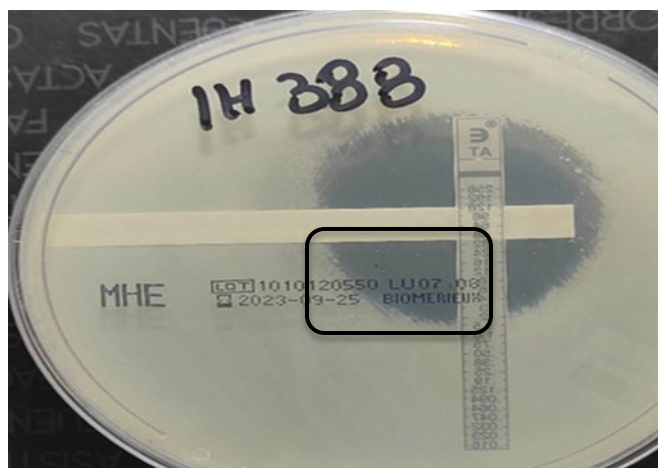


Imagen 2. Prueba de sinergia positiva con método de tiras cruzadas

Lectura de tiras cruzadas:

Lectura final droga A (ceftazidima/avibactam) al cruzar tiras: CIM 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Lectura final droga B (aztreonam) al cruzar tiras: CIM 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

CÁLCULO

CIM obtenida al cruzar las tiras droga A (8) / CIM inicial droga A (256) + CIM obtenida al cruzar las tiras droga B (2) / CIM inicial droga B (128) resultados $0.03 + 0.01 = 0.04$

INTERPRETACIÓN

SINERGIA $\leq 0,5$

NO SINERGIA $> 0,5$

Los valores obtenidos demuestran una disminución de la CIM inicial (etapa de tiras paralelas) de más de 2 diluciones, lo que se traduce en resultado positivo para sinergia.

III. MÉTODO DE SINERGIA CON DISCO POR KIRBY-BAUER (método cualitativo desarrollado por laboratorio de referencia ISP)

Inóculo:

Suspensión 0,5 MacFarland de la cepa problema en solución salina según las recomendaciones para el patógeno a estudiar y diseminar en placa Mueller-Hinton según método de susceptibilidad Kirby-Bauer, utilizando discos de aztreonam (30 μg) y ceftazidima/avibactam (4/10 μg o 30/20 μg).

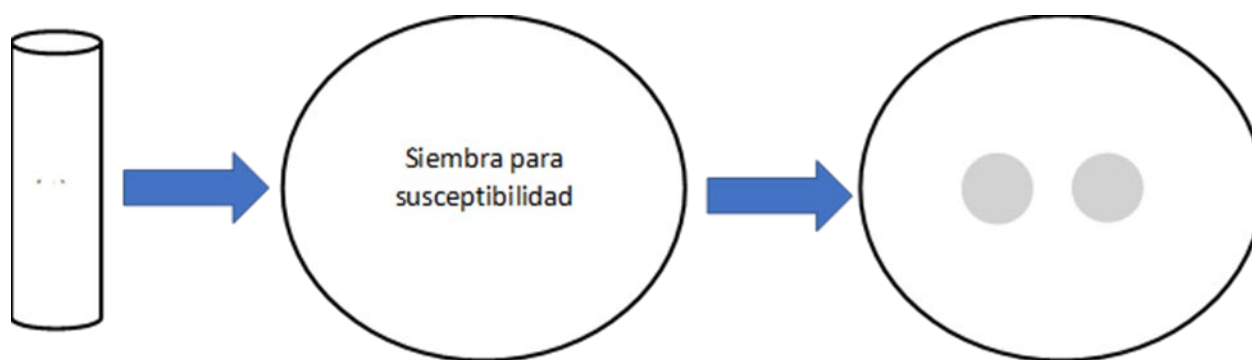
Depositar en la placa el disco de ceftazidima/avibactam (cepa resistente por metalobetalactamasa) más disco de aztreonam (cepa resistente y/o intermedio) a una distancia de centro a centro de 1,5 cm.

Incubación:

35 \pm 2 °C en aire ambiente, 18 a 24 hrs según características de la cepa.

Procedimiento:

Placas con medio Mueller-Hinton utilizado para estudio de susceptibilidad.



Lectura e Interpretación

Al colocar disco de ceftazidima/avibactam (cepa resistente) más un disco de aztreonam (cepa resistente y/o intermedio) a una distancia de 1,5 cm, se puede observar un efecto in vitro de sinergia, de fácil visualización, el cual ha sido confirmado y validado por el ISP por correlación con todas las metodologías descritas (doble tira, tiras cruzadas, elución de discos ceftazidima/avibactam, aztreonam).

NOTA: Se recomienda colocar discos separados a 2,5 cm de distancia entre ceftazidima/avibactam y aztreonam en cepas con resultado intermedio para aztreonam (18-20mm).

Lectura e interpretación

La lectura se realiza a ojo desnudo, con luz reflejada. Se debe observar una deformación en el halo de inhibición por la interacción de ambos discos (Imagen 3 y 4).

En algunos casos, el uso de discos permite observar la presencia de heteroresistencia (subpoblación resistente), evento que puede no ser detectado por equipos automatizados e incluso tiras de gradiente (imagen 5).

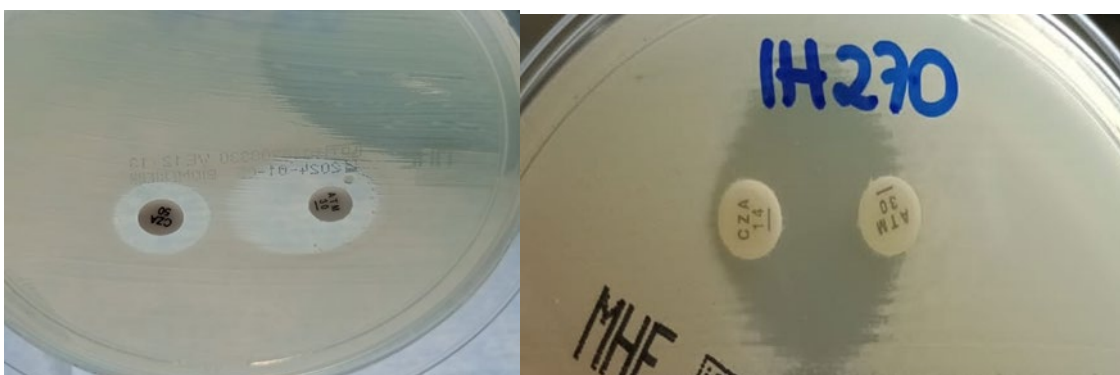


Imagen 3 y 4. En cepas con disco de aztreonam resistente (6 mm) colocar a 1,5 cm de distancia de ceftazidima/avibactam con pinzas. Test de sinergia positivo por la metodología de sinergia con discos por Kirby-Bauer.

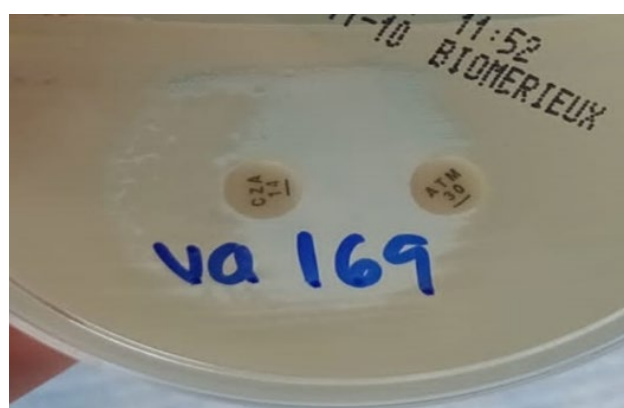


Imagen 5. Se observa heteroresistencia. Test de sinergia positivo.

IV. MÉTODO DE ELUCIÓN CON CAZ/AVIBACTAM + AZTREONAM (CLSI 2024)

Materiales Requeridos:

Medio caldo Mueller-Hinton utilizado para estudio de susceptibilidad.

Disco aztreonam 30 µg.

Disco ceftazidima/avibactam 30/20 µg.

Inóculo:

0,5 MacFarland de la cepa en solución salina.

Procedimiento:

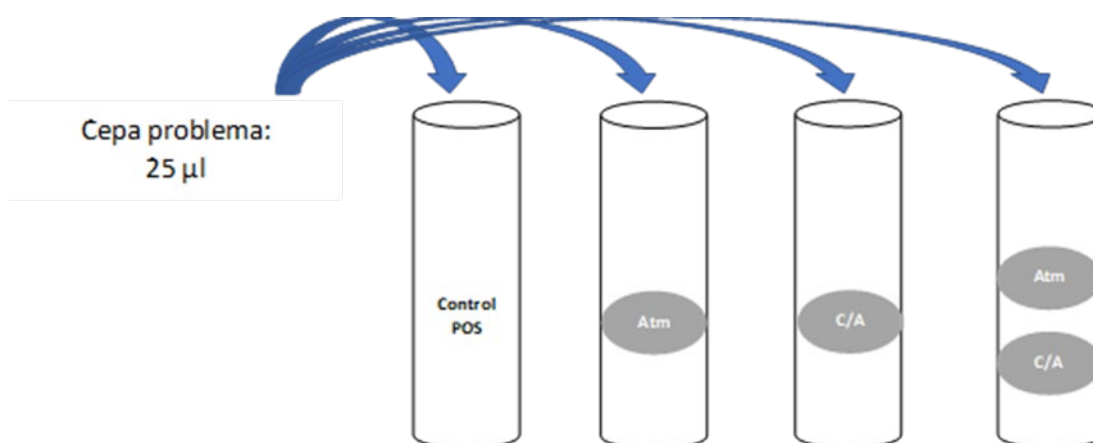
Alicuotar 4 a 5 ml de Caldo Mueller-Hinton en 4 tubos Khan y preparar de la siguiente manera:

Tubo 1 con un disco de aztreonam.

Tubo 2 con un disco de Caz/Avi.

Tubo 3 con un disco de Aztreonam + un disco de Caz/Avi.

Tubo 4: control crecimiento sin discos.



Agregar discos a cada tubo según esquema anterior e incubar media hora y no más de 1 hora a temperatura ambiente para la predifusión, luego agregar 25 µl de la cepa estandarizada 0,5 MacFarland, mezclar o agitar en vórtex suavemente.

Realizar control de pureza del tubo MacFarland original.

Incubación:

35+/-2 °C en aire ambiente, 18 a 24 hrs según características de la cepa.

Lectura e interpretación:

Tubo 1: Crecimiento-no susceptible (cepa resistente)

Tubo 2: Crecimiento-no susceptible (cepa resistente)

Tubo 3: No crecimiento- susceptible al antimicrobiano evaluado (sinergia+).

Tubo 4 (control): Presencia de turbidez por desarrollo bacteriano.

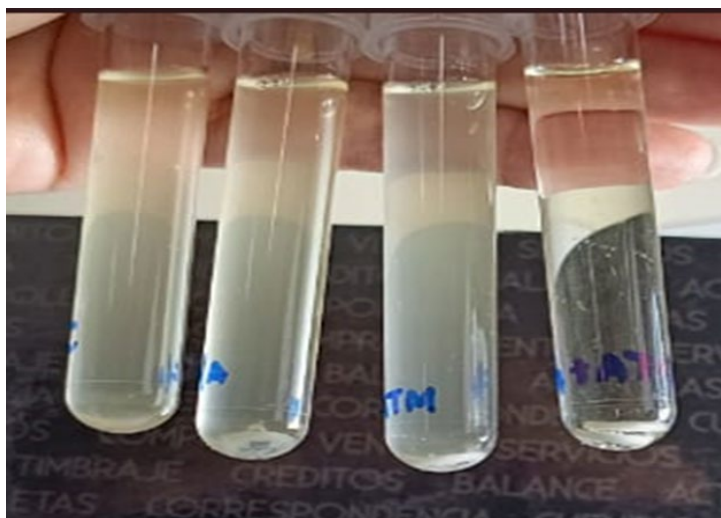


Imagen 6. Elución CAZ-AVI/ ATM

V. MÉTODO DE ELUCIÓN CON CAZ/AVIBACTAM + AZTREONAM (modificación método del CLSI)

Materiales Requeridos:

Caldo utilizado Mueller-Hinton (OXOID o DIFCO o Thermo Fisher) utilizado para estudio de susceptibilidad.

Disco aztreonam 30 μ g

Disco ceftazidima/avibactam 30/20 μ g y disco ceftazidima/avibactam 10/4 μ g.

Inóculo:

0,5 McFarland de la cepa en solución salina.

Procedimiento:

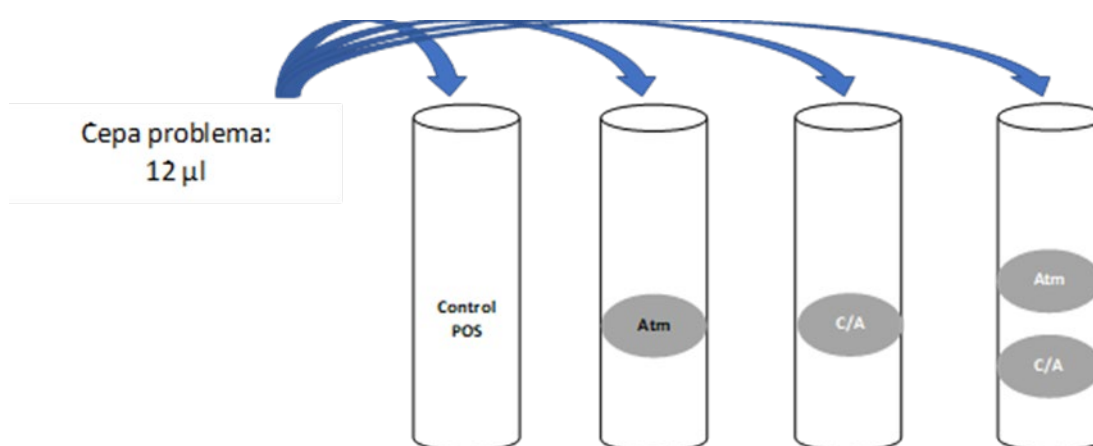
Alicuotar 2 ml de Caldo Mueller-Hinton en 4 tubos Khan y preparar de la siguiente manera:

Tubo 1 con un disco de aztreonam.

Tubo 2 con un disco de Caz/Avi.

Tubo 3 con un disco de Aztreonam + un disco de Caz/Avi.

Tubo 4: control crecimiento sin discos.



Agregar discos a cada tubo según esquema anterior e incubar media hora y no más de 1 hora a temperatura ambiente para la predifusión, luego agregar 12 μ l de la cepa estandarizada 0,5 MacFarland, mezclar o agitar en vórtex suavemente.

Realizar control de pureza del tubo MacFarland original.

Incubación:

35+/-2 °C en aire ambiente, 18 a 24 hrs según características de la cepa.

Lectura e interpretación:

Tubo 1: Crecimiento-no susceptible (cepa resistente)

Tubo 2: Crecimiento-no susceptible (cepa resistente)

Tubo 3: No crecimiento- susceptible al antimicrobiano evaluado (sinergia+).

Tubo 4 (control): Presencia de turbidez por desarrollo bacteriano.

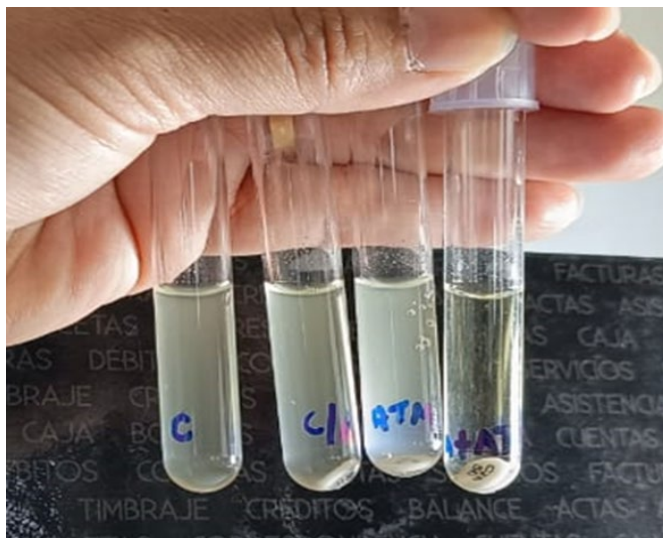


Imagen 7 Elución CAZ-AVI/ ATM

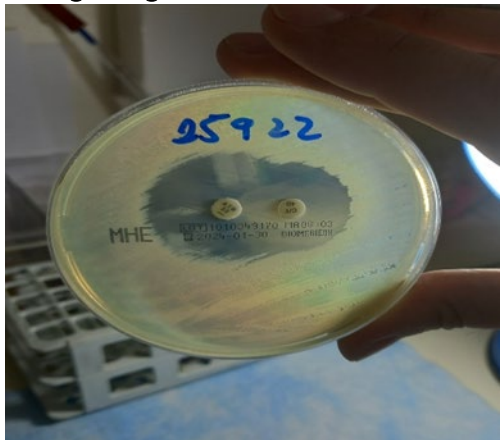
VI. CEPAS UTILIZADAS POR LABORATORIO DE REFERENCIA PARA CONTROL DE SINERGIA

Cepa control	Características de susceptibilidad	Interpretación método de sinergia
ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i> (1)	ATM: susceptible C/A: susceptible ATM+C/A: susceptible	NEGATIVO
ATCC 700603 <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE+ (2)	ATM: resistente C/A: susceptible ATM+C/A: susceptible	NEGATIVO
ATCC BAA 1705 <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC+ (3)	ATM: resistente C/A: susceptible ATM+C/A: susceptible	NEGATIVO
ATCC BAA 2146 <i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM+ (4)	ATM: resistente C/A: resistente ATM+C/A: susceptible	POSITIVO
AR BANK CDC #347 <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC3+ (5)	ATM: resistente C/A: resistente ATM+C/A: susceptible	POSITIVO
AR BANK CDC #348 <i>Escherichia coli</i> (6)	ATM: resistente C/A: resistente ATM+C/A: resistente	NEGATIVO

RESULTADOS:

En caso de implementar alguna metodología en su laboratorio se sugiere como control positivo de sinergia alguna cepa previamente confirmada por ISP.

Sinergia negativa



(1) ATCC 25922 *Escherichia coli*

Sinergia negativa



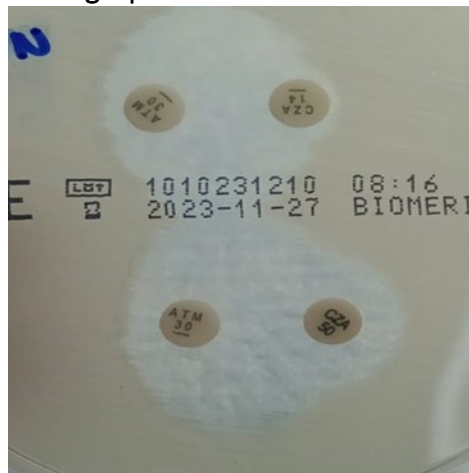
(2) ATCC 700603 *Klebsiella pneumoniae* BLEE+

Sinergia positiva

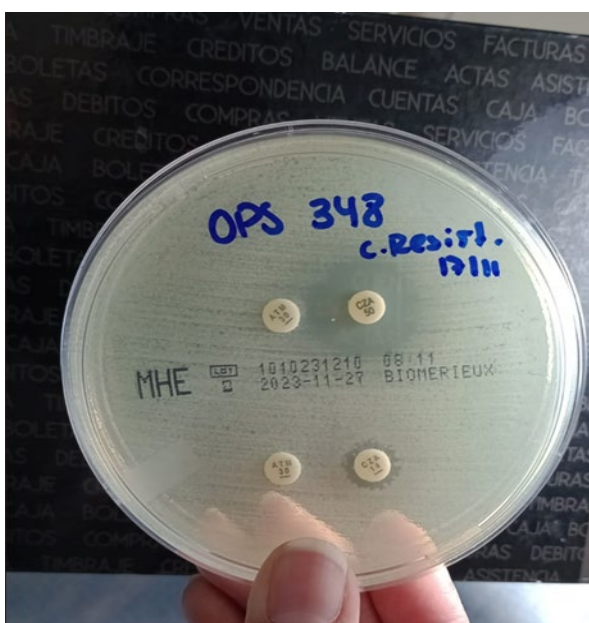


(3) ATCC BAA1705 *Klebsiella pneumoniae* KPC+

Sinergia positiva



(4 y 5) AR BANK #347 *Klebsiella pneumoniae*



(6) AR BANK #348 *Escherichia coli* control de resistencia (ejemplo con las 2 concentraciones conocidas de ceftazidima/avibactam).

RECOMENDACIONES DE CEPAS CONTROL PARA LOS LABORATORIOS LOCALES:

Control Negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922

Control Positivo: Alguna cepa confirmada previamente por ISP.

BIBLIOGRAFÍA

- Khan, A., Erickson, S. G., Pettaway, C., Arias, C. A., Miller, W. R., & Bhatti, M. M. (2021). Evaluation of susceptibility testing methods for aztreonam and ceftazidime-avibactam combination therapy on extensively drug-resistant gram-negative organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(11), 10-1128.
- Sooka, A., & Keddy, K. H. Evaluation of In Vitro Synergy Testing of South African Invasive *Salmonella Typhi* Isolates Using the Liofilchem® MTS Application System.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology*, 895.
- Canut Blasco, A., Collazos Blanco, A., Díez Aguilar, M., Morosini Reilly, M. I., Rodríguez-Gascón, A., & Seral-García, C. (2020). Métodos Microbiológicos para la Determinación In Vitro de la Actividad de Combinaciones de Antimicrobianos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC): Madrid, Spain.
- Red ReLAVRA, OPS. ANLIS, Instituto Carlos Malbrán, Argentina, <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/03/Predifusion-rapida-ATM-AVI.pdf>
- Canut Blasco A, Collazos Blanco A, Díez Aguilar M, Morosini Reilly MI, Rodríguez-Gascón A, Seral García C. Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos. 2020. 70. María Isabel Morosini Reilly (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.
- Muñoz Angulo, N., Arsanios Martín, D., & Cubides Díaz, D. A. (2021). Nicho terapéutico de ceftazidima-avibactam frente a bacterias gramnegativas resistentes a carbapenémicos en Colombia. *Universitas Medica*, 62(2).
- Nastro, M., Álvarez, C., Potente, N., Cervino, I., Vay, C., Famiglietti, Á., & Rodríguez, C. H. (2023). Caracterización de aislamientos de enterobacterias doble productores de carbapenemasas en un hospital universitario. *Actualizaciones en Sida e Infectología*. 31(113).
- López-Viñau López, T. (2022). Impacto de un programa de optimización de antimicrobianos en la incidencia de bacilos gramnegativos resistentes a carbapenémicos: estudio de series temporales interrumpidas. Universidad de Córdoba, UCOPress.
- Comunicación directa de Germán Esparza, CLSI M100 34th edition 2024, (Actualización en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana 2023)

AGRADECIMIENTOS

Sr. Alejandro Cordero.

Dra. Paola Pida.l

Laboratorio de Referencia IAAS, ISP.

ReLAVRA, OPS.

GAIHN-AR Project, CDC.