

## Linea di indirizzo su: come testare le nuove molecole per Gram positivi MDR

### CEFALOSPORINE: CEFTAROLINA E CEFTOBIPROLO

#### Attività in vitro di ceftarolina

La ceftarolina è una nuova cefalosporina di quinta generazione con attività battericida nei confronti di patogeni Gram-positivi multi-resistenti (MDR), inclusi *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), VISA, h-VISA e VRSA, *S. aureus* linezolid e daptomicina-resistente (Zhanel G, et al. 2010). E' un antibiotico battericida e, a differenza delle altre cefalosporine, si lega a specifiche penicillin-binding-proteins (PBPs) modificate responsabili della meticillino-resistenza negli stafilococchi (PBP 2A), e della non-sensibilità alle penicilline negli pneumococchi (PBP 2X/2B).

E' disponibile solo per la somministrazione parenterale e viene somministrata come Ceftarolina-fosamil, che viene rapidamente convertita in ceftarolina dalle fosfatasi nel sangue. E' stata autorizzata per il trattamento della polmonite acquisita in comunità (CAP) e delle infezioni complicate della cute e dei tessuti molli (cSSTI) e, a differenza della maggior parte delle cefalosporine, mostra un'attività ad ampio spettro contro molti Gram-positivi e Gram-negativi acquisiti in comunità e patogeni respiratori come *S. pneumoniae* (compresi i ceppi MDR), *H. influenzae*, e *M. catarrhalis*, comprese le Enterobatteriaceae a spettro non esteso. Presenta una limitata attività contro la maggior parte dei bacilli Gram-negativi non fermentanti (i.e. *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*) e molte specie anaerobie. L'attività contro gli anaerobi Gram-positivi, inclusi *Peptostreptococcus spp.*, *Propionibacterium spp.* e *Clostridium spp.*, è simile a quella di amoxicillina-clavulanato e 4-8 volte superiore quella del ceftriaxone. Ha una minima attività contro *Bacteroides spp.* e *Prevotella spp.* (MIC<sub>90</sub> ≥32 µg/ml). Possiede attività simile a quella del ceftriaxone contro i Gram-negativi non produttori di β-lattamasi, anaerobi, e si è mostrata totalmente inefficace contro *C. difficile* (MIC<sub>50</sub>, 2 µg/ml; MIC<sub>90</sub>, 4 µg/ml) (Citron D et al. 2010). Tuttavia non esistono breakpoint di sensibilità approvati. La maggior parte degli stafilococchi meticillino-

sensibili (MSSA) sono inibiti da concentrazioni di ceftarolina in un range compreso tra 0.25 e 0.5 mg/L. (Duplessis C, et al. 2011). In MRSA, le MIC si spostano verso valori più alti, mediamente con MIC<sub>90</sub> di 1-2 mg/L, e occasionalmente di 4-8 mg/L. Da uno studio condotto su 891 isolati clinici di *S. pneumoniae*, raccolti da 22 centri negli Stati Uniti nel 2008, è emerso che, coerentemente con altre cefalosporine, il valore MIC<sub>90</sub> è più basso nei ceppi penicillino-sensibili (MIC<sub>90</sub> 0.015 µg/ml) rispetto ai penicillino-intermedi (0.06 µg/ml) e resistenti alla penicillina (0.12-0.25 µg/ml), con valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> variabili tra <0.008 e 0.5 µg/ml. Dati di letteratura riportano un'eccellente attività anche contro gli streptococchi beta-emolitici, inclusi *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (MIC<sub>90</sub> 0.008-0.016 µg/ml) streptococchi viridanti penicillino-sensibili o resistenti (MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> 0.03/0.5 µg/m).; *S. bovis* e *S. mitis* (MICs 0.016-8 µg/ml) (Fenoll A. et al. 2008).

In isolati clinici di *E. faecalis* ha mostrato valori di MIC<sub>90</sub> pari a 4 µg/ml (range tra 0.25 e 8 µg/ml) indipendentemente dalla sensibilità alla vancomicina, linezolid o ampicillina. Di contro ha mostrato una ridotta attività *in vitro* contro isolati di *E. faecium* vancomicina-sensibili o resistenti, con valori di MIC<sub>90</sub> di 16–64 µg/ml (Duplessis C, et al. 2011.)

### **Attività in vitro di ceftobiprololo**

Ceftobiprololo è una cefalosporina di quinta generazione, somministrabile per via parentale per il trattamento delle SSTI a dose raccomandata di 500 mg ogni 8 ore per 7-14 giorni. Mostra attività contro un'ampia gamma di organismi Gram-positivi, incluso MRSA, e Gram-negativi, con attività *in vitro* paragonabile a quella di cefepime e ceftazidime. Come per ceftarolina, l'attività contro MRSA dipende dalla sua affinità e interazione con la PBP2a, che viene acilata formando rapidamente un complesso acil-enzima più stabile rispetto ad altre cefalosporine, con tassi di inibizione pari al 100%. Esibisce anche forte affinità per le PBP di diverse altre specie: PBP2x (*S.pneumoniae* MDR); PBP2 e PBP3 (*E. coli*); PBP1ab, PBP2, PBP3 e PBP4 (*P. aeruginosa*). Non ha attività contro *E. faecium*, a causa di una mancanza di affinità contro PBP5. Mostra attività antibatterica *in vitro* con valori di MIC<sub>90</sub> <2 µg/mL verso MRSA ed *E. faecalis*, <0.25/0.5 µg/mL verso *S. pneumoniae* penicillino-sensibile o resistente. Viene inattivata da una serie di β-lattamasi, incluse AmpC, CTX-M-15 ESBL, e la carbapenemasi KPC-2, ma non da TEM-1 e SHV-1, con conseguente ampia gamma di valori di MIC per le Enterobacteriaceae.

### **Interpretazione dei test di sensibilità**

Ceftarolina e ceftobiprololo sono stati approvati per l'uso nei confronti di *S. aureus*, non per altri *Staphylococcus spp.*; i breakpoint di MIC e di diametro separano la popolazione degli MRSA.

| Antibiotico    | Microrganismo                        | Breakpoint MIC (mg/L) |      |     | Contenuto dischetti (µg) | Breakpoint aloni di inibizione (mm) |     |       |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------|------|-----|--------------------------|-------------------------------------|-----|-------|
|                |                                      | S ≤                   | R >  | ATU |                          | S ≥                                 | R < | ATU   |
| Ceftarolina    | <i>S. aureus</i> (polmonite)         | 1                     | 1    | 1   | 5                        | 20                                  | 20  | 19-20 |
|                | <i>S. aureus</i> (altre indicazioni) | 1                     | 2    | 1   | 5                        | 20                                  | 17  | 19-20 |
|                | Enterobacterales                     | 0.5                   | 0.5  |     | 5                        | 23                                  | 23  | 22-23 |
| Ceftobiprololo | <i>S. aureus</i>                     | 2                     | 2    | 2   | 5                        | 17                                  | 17  | 16-17 |
|                | Enterobacterales                     | 0.25                  | 0.25 |     | 5                        | 23                                  | 23  |       |
|                | <i>Pseudomonas</i>                   | IE                    | IE   |     |                          | IE                                  | IE  |       |

Tab 1 – Breakpoint EUCAST 2022 per ceftarolina e ceftobiprololo

## LIPOPEPTIDI CICLICI: DAPTOMICINA

### Attività in vitro

La daptomicina è il primo antibiotico appartenente alla classe dei lipopeptidi ciclici naturali, dotato di rapida attività battericida nei confronti di un'ampia gamma di batteri Gram-positivi, inclusi MRSA e VRE, ad eccezione di *S. pneumoniae*. Viene impiegata per il trattamento delle infezioni complicate della cute e dei tessuti molli, infezioni del torrente circolatorio ed endocarditi del cuore destro.

Sebbene i ceppi resistenti siano rari, tra gli stafilococchi con ridotta sensibilità ai glicopeptidi (GISA) sono stati riscontrati valori di MIC fino a 8 mg/L.

### Esecuzione e interpretazione dei test di sensibilità

Per stafilococchi e streptococchi (escluso *S. pneumoniae*), i breakpoint di MIC stabiliti dall'EUCAST sono: S ≤1mg/l e R >1mg/l.

L'attività *in vitro* di daptomicina dipende dalla presenza di una concentrazione di ioni calcio (Ca<sup>2+</sup>) pari ai livelli fisiologici. Per la valutazione della sensibilità *in vitro*, il metodo raccomandato di riferimento è quello della microdiluizione in brodo (BMD) in presenza di concentrazioni standard di ioni calcio (Ca<sup>2+</sup>) pari a 50 µg/ml (1.25

mmol/l) nel terreno di coltura. E' anche possibile la valutazione mediante gradient-test, con strisce già contenenti le concentrazioni standard di ioni calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). I sistemi automatizzati e semi-automatizzati sono in fase di validazione. Non sono raccomandati altri test di sensibilità.

I valori di MIC di eventuali isolati resistenti devono essere controllati mediante ripetizione del test, se confermati l'isolato deve essere inviato ad un laboratorio di riferimento.

EUCAST non ha ancora stabilito, per carenza di evidenze, i breakpoint della daptomicina per gli enterococchi ma ne ha comunque proposto l'uso ad alte dosi (10-12 mg/kg/die) per il trattamento di infezioni gravi, soprattutto se sostenute da VRE.

### **LIPOGLICOPEPTIDI: DALBAVANCINA, ORITAVANCINA E TELAVANCINA**

Sebbene la vancomicina rimanga l'agente di prima linea per la gestione delle infezioni complicate da MRSA, la recente introduzione, nella pratica clinica, di lipoglicopeptidi semisintetici (dalbavancina, oritavancina e telavancina) ha aggiunto nuove possibilità per la gestione delle infezioni da Gram-positivi. I valori di minima concentrazione inibente (MIC) per i lipoglicopeptidi devono essere determinati in presenza di polisorbato-80 (P-80) (0.002% nel terreno per i metodi di diluizione in brodo). I metodi di diluizione in agar non sono stati validati dalle linee guida internazionali. Mentre, per quanto concerne i sistemi commerciali, le linee guida dell'EUCAST suggeriscono di seguire le istruzioni della ditta produttrice.

I lipoglicopeptidi sono da 4 a 8 volte più potenti della vancomicina. Gli isolati di *S. aureus* con valori di sensibilità alla vancomicina, possono essere riportati sensibili alla dalbavancina e ad oritavancin (Klinker and Borgert 2015); inoltre isolati di MRSA sensibili alla vancomicina possono essere riportati sensibili a telavancina.

#### ***Attività in vitro di dalbavancina***

Il breakpoint EUCAST di sensibilità per *Staphylococcus* spp. (Tab. 1), streptococchi  $\beta$ -emolitici dei gruppi A, B, C e G, e *S. anginosus* è pari a  $\leq 0.125$  mg/L, con la nota che isolati di *S. aureus* sensibili alla vancomicina possono essere segnalati come sensibili alla dalbavancina.

Ha dimostrato una potente attività *in vitro* verso isolati di *S. aureus* (MRSA compreso). L'attività *in vitro* è stata dimostrata anche verso isolati di *S. aureus* con valori di ridotta sensibilità alla vancomicina (VISA; 0.5–2 mg/L) ed etero-resistenti (hVISA), ed altri isolati MDR-MRSA, compresi quelli con ridotta sensibilità alla daptomicina (Bongiorno D, et al. 2020).

E' stata indicata solo per le infezioni sostenute da isolati di *E. faecalis* sensibili alla vancomicina, sebbene mostri una buona attività antibatterica *in vitro* anche contro isolati di *E. faecium* sensibili alla vancomicina. Per quanto concerne gli isolati vancomicino-resistenti (VRE), può essere considerata parzialmente attiva: non esercita alcuna attività nei confronti di isolati con fenotipo VanA (alti livelli di resistenza a vancomicina e teicoplanina), e solo parzialmente contro isolati VanB (resistenza solo a vancomicina). Questa caratteristica ne limita l'uso nelle infezioni sostenute da isolati di VRE.

E' ampiamente attiva contro gli streptococchi. I ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla penicillina e al ceftriaxone vengono inibiti a concentrazioni molto basse di dalbavancina tra 0.016 e 0.03 mg/L; gli streptococchi del gruppo viridans e gli streptococchi  $\beta$ -emolitici con valori di MIC <0.12 mg/L.

Il metodo di riferimento suggerito da tutte le linee guida internazionali è il metodo della microdiluizione in brodo (BMD) secondo lo standard ISO 20776-1, sebbene il gradient-test per dalbavancina, comparato con la metodica di riferimento mediante BMD, sia stato convalidato come procedura accurata (Fritsche TR, et al. 2006).

### **Attività in vitro di oritavancina**

Oritavancina, lipoglicopeptide semisintetico, è stato approvato dalla FDA per le infezioni batteriche acute della cute e delle strutture cutanee causate da *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus* ed *E. faecalis*. I breakpoints di sensibilità attualmente approvati dall'EUCAST sono  $\leq 0.125$  mg/L per *S. aureus* e  $\leq 0.25$  mg/L per *Streptococcus* A, B, C, G e Streptococchi viridanti.

Esistono sistemi commerciali dedicati al saggio di questa molecola sviluppati per eseguire la BMD come raccomandato dagli standard internazionali (CLSI; EUCAST) con elevate percentuali di sensibilità e specificità.

### **Attività in vitro di telavancina**

La telavancina, al pari di dalbavancina ed oritavancina, è attiva nei confronti di batteri Gram-positivi, ma esplica una potente attività *in vitro* soprattutto verso isolati di *S. aureus* (MSSA e MRSA) e stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS). La sua attività antibatterica *in vitro* è 16-32 volte maggiore rispetto a vancomicina verso MRSA. I breakpoints di MIC dell'EUCAST sono disponibili solo per *S. aureus*; in particolare, sono stati revisionati a  $\leq 0.125\text{mg/L}$  per MRSA.

Così come per gli altri antibiotici lipoglicopetidici l'EUCAST non ha rilasciato i breakpoint ufficiali per Gram-positivi diversi da *Staphylococcus*; tuttavia telavancina mantiene un'attività eccellente nei confronti degli enterococchi, anche resistenti alla vancomicina (VRE) con fenotipo VanB, *Streptococcus* spp. (indipendentemente dalla sensibilità alla penicillina), *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus* e *Clostridium* spp. (R.E. Mendes, et al. 2015).

| Antibiotico | Microrganismo              | Breakpoint MIC |       |
|-------------|----------------------------|----------------|-------|
|             |                            | S $\leq$       | R >   |
| Dalbavancin | <i>Staphylococcus</i> spp. | 0.125          | 0.125 |
| Oritavancin | <i>S. aureus</i>           | 0.125          | 0.125 |
| Telavancin  | MRSA                       | 0.125          | 0.125 |

Tab 2 – Breakpoint EUCAST 2022 per i glicolipopeptidi in *Staphylococcus* spp.

## OXAZOLIDINONI: LINEZOLID E TEDIZOLID

Gli oxazolidinoni agiscono quali inibitori della sintesi proteica e sono attivi verso *S. aureus* (incluso MRSA) streptococchi resistenti alla penicillina e VRE. Il linezolid, primo oxazolidinone reso clinicamente disponibile e approvato nel 2000 per uso clinico dalla FDA, è ampiamente impiegato per le infezioni da batteri gram-positivi ed è considerato un farmaco efficace per le infezioni gravi della pelle e dei tessuti molli, e post-chirurgiche e nel trattamento di infezioni polmonari in particolare sostenute da batteri MDR.

I test di sensibilità per gli oxazolidinoni sono di difficile interpretazione per la frequente presenza di margini irregolari degli aloni di inibizione o minuscoli fondelli di crescita nei test mediante BMD. Il diametro dell'alone di inibizione va fissato dove i margini dei bordi diventano netti e quello della MIC, nei test in BMD, alla

concentrazione di antibiotico corrispondente al pozzetto dove non si osserva una uniforme crescita batterica.

### **Attività in vitro di Tedizolid**

Gli isolati sensibili al linezolid possono essere riportati sensibili al tedizolid. Isolati di *Staphylococcus* spp. resistenti al linezolid per la presenza del gene *cfr* (cloramfenicol-florfenicol resistance) non hanno mostrato resistenza a tedizolid in assenza di mutazioni cromosomiche. Ceppi resistenti al linezolid per la presenza di mutazioni nei geni che codificano l'rRNA 23S o le proteine ribosomiali (L3 e L4), sono generalmente resistenti a tedizolid.

| Microrganismo                | Breakpoint MIC |     | Contenuto dischetti (mg/L) | Breakpoint aloni di inibizione (mm) |     |     |
|------------------------------|----------------|-----|----------------------------|-------------------------------------|-----|-----|
|                              | S ≤            | R > |                            | S ≥                                 | R < | ATU |
| <i>Staphylococcus</i> spp.   | 0.51           | 0.5 | 2                          | 20                                  | 20  | 19  |
| <i>Enterococcus</i> spp.     | IE             | IE  |                            | IE                                  | IE  |     |
| <i>Streptococcus</i> A,B,C,G | 0.52           | 0.5 | 2                          | 18A                                 | 18A |     |
| <i>S. pneumoniae</i>         | 0.5            | 0.5 | 2                          | 18                                  | 18  |     |
| <i>S. anginosus</i> group    | 0.5            | 0.5 | 2                          | 18                                  | 18  |     |

Tab 1 – Breakpoint EUCAST 2022 per tedizolid

## **BIBLIOGRAFIA**

- Bongiorno D, Lazzaro LM, Stefani S, Campanile F. In Vitro Activity of Dalbavancin against Refractory Multidrug-Resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antibiotics* (Basel). 2020 Dec 3;9(12):865. doi: 10.3390/antibiotics9120865. PMID: 33287376; PMCID: PMC7761838.Fritsche TR, et al., *J. Clin. Microbiol*, 2006
- Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV, Goldstein EJ. In vitro activity of ceftaroline against 623 diverse strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Apr;54(4):1627-32. doi: 10.1128/AAC.01788-09. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100877; PMCID: PMC2849373
- Duplessis C, Crum-Cianflone NF. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Clin Med Rev Ther*. 2011 Feb 10;3:a2466. doi: 10.4137/CMRT.S1637. PMID: 21785568; PMCID: PMC3140339.
- Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, Giménez MJ, Granizo JJ, Biek D, Tarragó D. In vitro activity of ceftaroline against *Streptococcus pneumoniae* isolates exhibiting resistance to penicillin, amoxicillin, and cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Nov;52(11):4209-10. doi: 10.1128/AAC.00712-08. Epub 2008 Aug 25. PMID: 18725443; PMCID: PMC2573151.

- Klinker KP, Borgert SJ. Beyond Vancomycin: The Tail of the Lipoglycopeptides. Clin Ther. 2015 Dec 1;37(12):2619-36. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.11.007. Epub 2015 Dec 3. PMID: 26658277.
- Mendes RE, Farrell DJ, Sader HS, Streit JM, Jones RN. Update of the telavancin activity in vitro tested against a worldwide collection of Gram-positive clinical isolates (2013), when applying the revised susceptibility testing method. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Apr;81(4):275-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.12.011. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25618421.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. <http://www.eucast.org>.
- Turnidge J, Kahlmeter G, Cantón R, MacGowan A, Giske CG; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Daptomycin in the treatment of enterococcal bloodstream infections and endocarditis: a EUCAST position paper. Clin Microbiol Infect. 2020 Aug;26(8):1039-1043. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.027. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32353412.
- Zhanel GG, Calic D, Schweizer F, Zelenitsky S, Adam H, Lagacé-Wiens PR, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Karlowsky JA. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. Drugs. 2010 May 7;70(7):859-86. doi: 10.2165/11534440-000000000-00000.

Questo documento è stato elaborato da **Floriana Campanile e Floriana Gona** e condiviso dai componenti del **CoSA** (Francesco Luzzaro, Gioconda Brigante, Nicoletta Corbo, Tommaso Giani, Roberta Migliavacca, Mario Sarti, Claudio Scarparo, Teresa Spanu) e del **GLACSA** (Mario Sarti, Fabio Arena, Giulia De Angelis, Floriana Campanile, Floriana Gona, Luigi Principe, Claudia Venturelli, Chiara Vismara)