



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Puntos de corte de dalbavancina y recomendaciones para el estudio de su actividad in vitro

Rafael Cantón^{a,b,*}, María Díez-Aguilar^{a,b} y María Isabel Morosini^{a,b}

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Madrid, España

^bRed Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Dalbavancina
Lipoglucopeptidos
Punto de corte
Valor subrogado

La dalbavancina es un lipoglucopeptido semisintético aprobado para el tratamiento de infecciones agudas de piel y tejidos blandos causadas por microorganismos Gram positivos sensibles a este antimicrobiano. La FDA (Food and Drug Administration) y el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) han establecido puntos de corte para interpretar los resultados del antibiograma (expresados como CMI [concentración mínima inhibitoria]) con la pauta aprobada (1 g por vía intravenosa [i.v.] seguido de 0,5 g i.v. a los 8 días o 1,5 g i.v. en una sola dosis). El EUCAST ha fijado además puntos de corte PK/PD (farmacocinéticos/farmacodinámicos) –sensible, $\leq 0,25$ mg/l; resistente, $> 0,25$ mg/l–, y ha realizado recomendaciones para el estudio in vitro (adición de polisorbato-80 al medio) y valores subrogados a partir de la categoría sensible de vancomicina para interpretar la sensibilidad a dalbavancina en ausencia del estudio de este antimicrobiano.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Dalbavancin breakpoints and recommendations for in vitro study of its activity

ABSTRACT

Keywords:

Dalbavancin
Lipoglycopeptides
Breakpoints
Subrogate value

Dalbavancin is a semisynthetic lipoglycopeptide approved for the treatment of acute skin and soft tissue infections due to Gram-positive microorganisms susceptible to this antimicrobial agent. The FDA (Food and Drug Administration) and the EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) have established clinical breakpoints to interpret the results of the antibiogram (expressed as MIC [minimum inhibitory concentration]) with approved doses (1 g intravenously [IV] followed by 0.5 g IV at day 8 or 1.5 g IV in a single dose). The EUCAST has also determined PK/PD (pharmacokinetic/pharmacodynamic) breakpoints –susceptible, ≤ 0.25 mg/L; resistant, > 0.25 mg/L–, established recommendations for in vitro susceptibility testing (addition of polysorbate-80 to the growth media) and subrogate values based on the vancomycin-susceptible category to interpret dalbavancin susceptibility in the absence of in vitro study of this antimicrobial.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Desde hace algo más de una década, la definición de los puntos de corte se realiza esencialmente por 2 comités internacionales, el *Clinical Laboratory and Standard Institute* (CLSI), que opera desde Esta-

dos Unidos (<http://clsi.org/>) para numerosos países y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que trabaja en Europa (<http://www.eucast.org/>) y cuyos criterios han sido adoptados por varios países de fuera de Europa, entre los que figuran Turquía, Israel, Rusia, Marruecos, Australia, Sudáfrica o, más recientemente, Brasil.

Ambos comités están alineados en sus aspectos metodológicos bajo la misma norma ISO que define las categorías clínicas “sensible”, “intermedio” y “resistente”¹. Se considera “sensible” aquella

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rafael.canton@salud.madrid.org (R. Cantón).

situación en la que el uso de un antimicrobiano con las dosis, la vía de administración y los esquemas aprobados por las correspondientes agencias reguladoras —Food and Drug Administration (FDA: <http://www.fda.gov/>) o European Medicines Agency (EMA: <http://www.ema.europa.eu/ema/>)— tiene una elevada probabilidad de alcanzar un éxito terapéutico cuando se emplea el antimicrobiano en cuestión para una infección producida por el microorganismo clasificado como tal. La categoría clínica “resistente” se reserva a situaciones en las que la utilización del antimicrobiano en las condiciones aprobadas de uso no asegura el éxito terapéutico. Las bacterias sensibles se asocian con valores bajos de concentración mínima inhibitoria (CMI) y están por debajo del punto de corte de sensibilidad, mientras que las resistentes se asocian con valores de CMI elevados y están por encima del punto de corte de resistencia. Asimismo, la categoría “intermedia” indica la necesidad de aumentar la dosis del antimicrobiano o, en su caso, modificar el esquema o su forma de administración (reducción del tiempo entre dosis o perfusión extendida o continua en la vía intravenosa [i.v.]) para aumentar la probabilidad de éxito. La tabla 1 recoge de manera general los datos necesarios que requiere el EUCAST para el cálculo de los puntos de corte en la interpretación de las pruebas de sensibilidad y definición de las categorías clínicas.

El EUCAST también ha definido el valor del punto de corte epidemiológico (ECOFF, del inglés *epidemiological cut-off*) que discrimina las bacterias sin mecanismos de resistencia adquiridos (población salvaje) de aquellas que presentan, mediante mutación o transferencia de genes, mecanismos de resistencia que fenotípicamente se traducen en un aumento del valor de la CMI². Asimismo, el EUCAST publica puntos de corte PK/PD (farmacocinéticos/farmacodinámicos) que integran los datos de farmacocinética del antimicrobiano y de farmacodinamia (referido al valor de la CMI) a partir de modelos in vitro, en animales o derivados de su uso en humanos³. Estos últimos, adaptados a las dosis aprobadas, se deben emplear en ausencia de los puntos de corte convencionales que definen las categorías clínicas. También se utilizan cuando se modifica la dosis o la forma de administración del antimicrobiano.

En el presente trabajo se revisarán los puntos de corte definidos por el EUCAST y la FDA para dalbavancina y los datos y fundamentos que sustentan los valores establecidos. Por el momento, el CLSI no ha publicado puntos de corte para este antimicrobiano.

Puntos de corte epidemiológicos

El punto de corte epidemiológico o ECOFF se define como la menor concentración a partir de la cual los microorganismos de una misma especie no poseen mecanismos de resistencia detectados fenotípicamente frente al antibiótico en estudio². Para dalbavancina, el EUCAST lo ha establecido en $\leq 0,125$ mg/l frente a *Staphylococcus*

aureus y *Streptococcus agalactiae* y en $\leq 0,032$ mg/l para *Streptococcus pyogenes* (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>). Esta población, denominada “población salvaje”, carece por tanto de mecanismos de resistencia adquiridos. En el caso particular de este antimicrobiano, el valor del ECOFF coincide con el punto de corte clínico fijado inicialmente tanto por la FDA⁴ como por el EUCAST⁵ para los microorganismos mencionados, así como para las especies del grupo *Streptococcus anginosus* (*S. anginosus*, *S. constellatus* y *S. intermedius*) (tabla 2). El CLSI no ha establecido por el momento puntos de corte para este antimicrobiano y la FDA ha elevado el punto de corte de sensibilidad a una dilución por encima del ECOFF, siendo por tanto 0,25 mg/l⁷.

Hasta la fecha no se han comunicado aislados resistentes a la dalbavancina, por lo que la FDA ha definido solamente la categoría clínica “sensible”^{4,7}. Sin embargo, en las distribuciones de los valores de CMI obtenidas con dalbavancina y recogidas por el EUCAST en su página web (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>) frente a algunas de las especies arriba mencionadas, se observa un número de aislados que se “apartan” del valor del ECOFF establecido y, por tanto, del punto de corte de sensibilidad. El mismo fenómeno ha sido recientemente descrito por Jones et al⁸ y se recoge en la figura 1. La trascendencia clínica y epidemiológica que podría tener esta “desviación”, así como su evolución en el futuro, no puede predecirse por el momento.

Desde el punto de vista del “mecanismo de resistencia” presente en este tipo de aislados, los cambios estructurales en la pared de la célula bacteriana que producen la pérdida de sensibilidad a la vancomicina en *Staphylococcus aureus* (poblaciones hVISA [*heteroresistant vancomycin-intermediate S. aureus*] y VISA [*vancomycin intermediate S. aureus*]) se traducen también en una disminución de la actividad de la dalbavancina. El engrosamiento de la pared y el aumento del número de sitios D-alanil-D-alanina en el peptidoglicano secuestran más cantidad de antibiótico, por lo que se requiere una concentración mayor de este para obtener el mismo efecto antimicrobiano⁹. Si bien dalbavancina es más potente que vancomicina, aparentemente esta mayor actividad intrínseca no sería suficiente para que no se vea afectado ligeramente el valor de la CMI. En la figura 1A esta explicación justificaría la desviación del único aislado estudiado con una

Tabla 2

Comparación de los puntos de corte de dalbavancina establecidos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y la Food and Drug Administration (FDA) y los puntos de corte epidemiológicos definidos por el EUCAST

Microorganismos y puntos de corte PK/PD	Puntos de corte (mg/l)		Punto de corte epidemiológico (ECOFF) $\leq$
	FDA ($\leq$ S/ $>$ R)	EUCAST ($\leq$ S/ $>$ R)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 0,25$ / $—^a$	$\leq 0,125$ / $> 0,125$	$\leq 0,125$
<i>Streptococcus</i> betahemolíticos	$\leq 0,25$ / $—^a$	$\leq 0,125$ / $> 0,125^c$	$\leq 0,125^d$ / $\leq 0,032^e$
<i>Streptococcus</i> del grupo viridans	$\leq 0,25$ / $—^a$	$\leq 0,125$ / $> 0,125^f$	—
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	EI	—
<i>Enterococcus</i> spp.	$\leq 0,25$ / $—^a$	EI	—
Puntos de corte PK/PD	—	$\leq 0,25$ / $> 0,25$	—

ECOFF: *epidemiological cut-off*; EI: evidencia insuficiente; PK/PD: farmacocinético/farmacodinámico; R: resistencia; S: sensibilidad.

^aNo se ha fijado punto de corte de resistencia al no existir cepas resistentes descritas a dalbavancina.

^b*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae*.

^cGrupos A, B, C y G.

^d*S. agalactiae*.

^e*S. pyogenes*.

^fSolo *Streptococcus anginosus*.

^gSolo para enterococos sensibles a la vancomicina.

Tabla 1

Datos necesarios para la definición de los puntos de corte de un antimicrobiano según el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

1. Indicación autorizada por la EMA
2. Dosis (incluida en la autorización de comercialización de la EMA)
3. Sensibilidad de los diferentes microorganismos diana frente al antimicrobiano
4. Valores de CMI y distribuciones para cada microorganismo diana con un análisis que permita calcular y reconocer la población salvaje y el cálculo de los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) para cada especie
5. Mecanismos de resistencia que afecten a los microorganismos diana
6. Farmacocinética (C_{max} , AUC, semivida, unión a proteínas, volumen de distribución, etc.)
7. Farmacodinamia y parámetros PK/PD: C_{max} /CMI, fAUC/CMI, T > CMI
8. Respuesta clínica (curación clínica y microbiológica) en relación con valores de CMI

AUC: área bajo la curva; C_{max} : concentración máxima; CMI: concentración mínima inhibitoria; ECOFF: *epidemiological cut-off*; EMA: European Medicines Agency; fAUC: área bajo la curva de la fracción libre de fármaco; PK/PD: farmacocinéticos/farmacodinámicos.

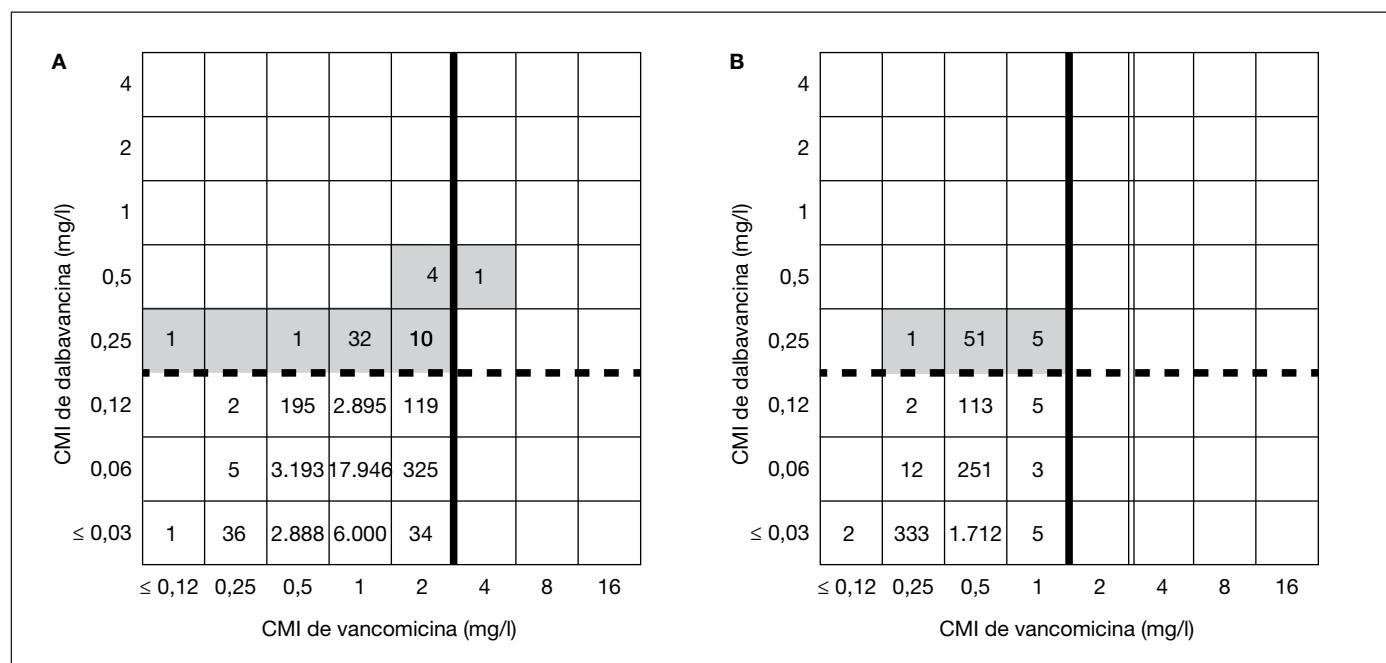


Figura 1. Comparación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de dalbavancina frente a *Staphylococcus aureus* (A) y *Streptococcus agalactiae* (B). A: *S. aureus* (n = 33.688 cepas). Línea horizontal discontinua: ≤ 0,125 mg/l, punto de corte clínico y punto de corte epidemiológico (ECOFF) (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) de dalbavancina. Línea vertical continua: punto de corte clínico de sensibilidad (EUCAST y Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]) y ECOFF (EUCAST) de vancomicina. B: *S. agalactiae* (n = 2.495 cepas). Línea horizontal discontinua: ≤ 0,125 mg/l, punto de corte clínico y ECOFF (EUCAST) de dalbavancina. Línea vertical continua: punto de corte clínico de sensibilidad (CLSI) y ECOFF (EUCAST). Doble línea ondulada: punto de corte de sensibilidad (EUCAST) de vancomicina. Adaptada de Jones et al⁸.

CMI de vancomicina de 4 mg/l, pero no con el resto de los aislados (n = 48; 0,1%) que presentan sensibilidad disminuida a la dalbavancina (rango de CMI entre 0,25 y 0,50 mg/l). Con respecto a *S. agalactiae* (fig. 1B) —este fenómeno no se ha observado en *S. pyogenes*— un 2,3% (n = 57) de las cepas estudiadas presenta un valor de CMI de dalbavancina por encima del punto de corte de sensibilidad del EUCAST, si bien ninguna de ellas tiene sensibilidad disminuida a la vancomicina. En ambos casos queda documentada la baja prevalencia de aislados con CMI de dalbavancina por encima del ECOFF.

Por otra parte, el punto de corte PK/PD de dalbavancina (establecido en 0,25 mg/l) tampoco “recuperaría” todas las cepas de *S. aureus* (fig. 2 A), pero sí lo haría con todas las de *S. agalactiae* (fig. 2B)⁸. Por el momento no existen datos clínicos que recojan cuál sería el éxito clínico en los pacientes tratados con dalbavancina que presenten aislados con valores de CMI por encima de los de la población salvaje o carentes de mecanismos de resistencia adquiridos.

Puntos de corte de dalbavancina

Para establecer los puntos de corte de un antimicrobiano y siguiendo el esquema del EUCAST (tabla 1) es necesario, además de definir el perfil de su actividad antimicrobiana (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>), conocer las indicaciones, la dosis y la vía utilizada, su farmacocinética y su relación con la farmacodinamia. La dalbavancina es un lipoglucopeptido semisintético aprobado por la FDA y la EMA para el tratamiento de las infecciones agudas de piel y tejidos blandos causadas por microorganismos Gram positivos sensibles a este antimicrobiano^{4,10}. Si se compara con la de otros antimicrobianos relacionados, su forma de administración es original, ya que se administra con una dosis de 1.000 mg i.v. el primer día, seguido de 500 mg i.v. a los 8 días o con 1.500 mg i.v. en una sola dosis¹¹. La infusión del antimicrobiano debe administrarse en 30 min. En los pacientes con creatinina < 30 ml/min la dosis debe reducirse a 750 mg, seguido de 375 mg i.v. a los 7 días^{12,13}. No es necesario el ajuste de dosis en pacientes sometidos a hemodiálisis.

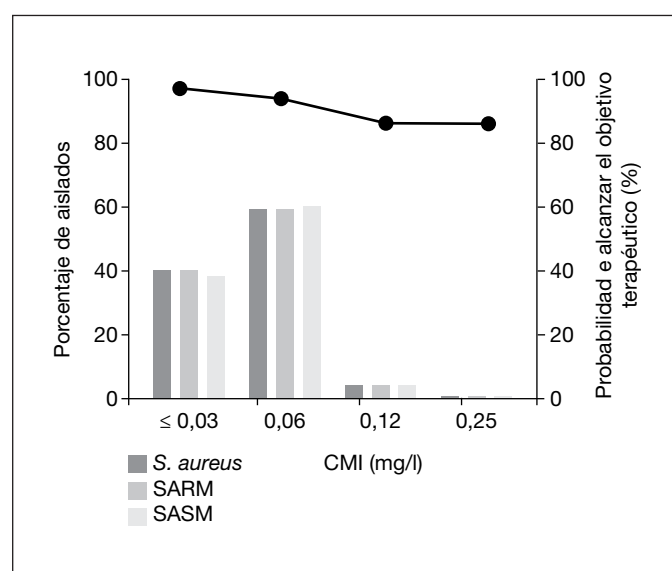


Figura 2. Representación gráfica de la simulación de Monte Carlo para definir los puntos de corte farmacocinéticos/farmacodinámicos de dalbavancina. La línea representa la probabilidad de alcanzar el objetivo terapéutico (área bajo la curva/concentración mínima inhibitoria [CMI] ≥ 21.267) para cada valor de CMI. SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina. Tomada de Salem et al²⁰. Estudio en que se utilizan los resultados de los ensayos clínicos en fase III de pacientes tratados con dalbavancina e infección de piel y tejidos blandos.

La farmacocinética de la dalbavancina se explica utilizando modelos tricompartmentales. En sujetos sanos y en estudios en fase II se ha demostrado que el área bajo la curva (AUC) en plasma de 0 a 24 h (AUC_{24h}) y la C_{max} (concentración máxima) se incrementan de forma proporcional al aumento de la dosis. Utilizado según la aprobación

de la FDA y la EMA se alcanzan concentraciones de fármaco en torno a 400 mg, manteniéndose de forma libre por encima de 1 mg/l incluso 14 días después de su administración^{15,16}. La unión a proteínas es elevada, ya que solo menos del 10% del antimicrobiano se mantiene de forma libre.

Desde el punto de vista PK/PD, se ha demostrado tanto en modelos animales (modelo de infección en ratón neutropénico en tejidos) como en humanos que el índice que mejor define su actividad es la razón entre el AUC de la fracción libre de fármaco (fAUC) y la CMI (fAUC_{24h}/CMI)¹⁷⁻²⁰. En el modelo de ratón este índice debe tener valores de 160 ± 67 para inhibir el crecimiento bacteriano (bacteriostasis) y de 213 ± 81 y 266 ± 88 para que se produzca una reducción del inóculo bacteriano de 1 o 2 logaritmos, respectivamente¹⁷. En los ensayos clínicos en fase III de infección de piel y tejidos blandos por *S. aureus*, el valor de AUC/CMI, considerando el fármaco total, que mejor predice la respuesta clínica de dalbavancina es ≥ 21.216 ¹⁹. Este valor debe ser ≥ 245 cuando solo se considera la fracción de fármaco libre. En este mismo ensayo, la curación clínica se alcanza para el 98,4 y el 100,0% de todos los pacientes evaluables incluidos en el ensayo y de aquellos con infección por *S. aureus* sensibles y resistentes a la meticilina, respectivamente. En la figura 2 se recoge la representación de la simulación de Monte Carlo en la que se incluye la frecuencia de aislados de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a la meticilina con diferentes valores de CMI de dalbavancina y la probabilidad de alcanzar el éxito terapéutico previamente fijado (AUC/CMI ≥ 21.216 referido a la concentración total de fármaco) en función de los valores de CMI. Esta probabilidad es del 100% para aislados con valores de CMI de dalbavancina $\leq 0,03$ mg/l, disminuye al 90% para aislados con valores de CMI de 0,12 mg/l y se mantiene para valores de CMI de 0,25 mg/l. Esta última concentración es el valor de CMI fijado por el EUCAST como punto de corte PK/PD de sensibilidad ($\leq 0,25$ mg/l) y de resistencia ($> 0,25$ mg/l) (tabla 2). La concentración de 0,25 mg/l ha sido fijada por la FDA como punto de corte de sensibilidad⁷ revisando el valor inicialmente establecido de 0,125 mg/l. El valor inicial estaría más ajustado a la dosificación de 1.000 mg en el día de inicio, seguido de 500 mg a los 8 días, mientras que en el segundo ($\leq 0,25$ mg/l) sería adecuado con la dosis única recientemente aprobada de 1.500 mg.

Con los nuevos criterios de evaluación de infecciones de piel y tejidos blandos ($\geq 20\%$ en la reducción de la lesión), los ensayos clínicos en fase III han corroborado la mejoría clínica precoz en aproximadamente el 90% de los pacientes que fueron tratados con dalbavancina e infectados por *S. aureus* sensibles o resistentes a la meticilina. Esta mejoría es discretamente superior para las infecciones en las que estuvieron implicados *S. agalactiae*, *S. anginosus* o *S. pyogenes*²¹⁻²³. En estos ensayos no se incluyó a pacientes con infección por *S. aureus* o estreptococos con valores de CMI de dalbavancina superiores a 0,25 y 0,6 mg/l, respectivamente.

Los puntos de corte finalmente definidos por el EUCAST en comparación con los de la FDA se recogen en la tabla 2. A diferencia de la FDA, el EUCAST no ha establecido puntos de corte para enterococos. Los ensayos clínicos no han mostrado suficientes evidencias de su implicación en las infecciones de piel y tejidos blandos. Aunque la dalbavancina tiene buena actividad in vitro frente a enterococos, no existen datos adecuados de correlación entre el valor de CMI y la eficacia clínica que permitan corroborar los puntos de corte PK/PD con estos microorganismos.

Asimismo, se debe subrayar que no existen puntos de corte con valores de halos de inhibición derivados del estudio de sensibilidad por difusión con discos ya que este método no se recomienda con la dalbavancina al no demostrarse una buena correlación entre los halos de inhibición y los valores de referencia de CMI obtenidos por la técnica de microdilución. Aunque el método de estudio de sensibilidad mediante tiras de gradiente ha sido validado en varias ocasiones, en algunos casos se ha observado una ligera tendencia al aumento de los valores de CMI^{24,25}. Esta circunstancia debe tenerse en cuenta si se

observan valores por encima del punto de corte de sensibilidad, recomendándose la repetición del estudio de sensibilidad por el método ISO de referencia de microdilución antes de interpretar los resultados.

Aspectos técnicos en la determinación de la sensibilidad in vitro a la dalbavancina

A la hora de determinar la sensibilidad in vitro a los antimicrobianos es importante que los resultados sean reproducibles y que a partir de estos pueda realizarse una correlación con la actividad observada in vivo. Para ello es importante controlar todos los parámetros que puedan influir en la actividad del antimicrobiano en estudio.

El método de referencia para determinar la sensibilidad a dalbavancina es la dilución en caldo siguiendo la metodología establecida en la norma ISO y seguida tanto por el CLSI como por el EUCAST¹. Debido a sus características químicas, cuando se trabaja con este antibiótico los aspectos críticos son su solubilidad y sus propiedades de adherencia a los materiales en los que se realizan las pruebas de sensibilidad (en general el plástico de los tubos o los paneles de microdilución). Debido a que la dalbavancina no es soluble en agua, se requiere el solvente orgánico dimetilsulfóxido (DMSO) para su disolución. La solubilidad de dalbavancina en agua es dependiente del pH (20 mg/l a pH neutro), por lo que para alcanzar concentraciones más altas se emplea DMSO para disolverlo.

También es necesaria la adición de polisorbato-80 (P-80) a la disolución antibiótica. Este compuesto es un surfactante no iónico que evita la adherencia del antibiótico al plástico para que su actividad no se vea comprometida. La adición de este surfactante también es necesaria para otros lipoglucopeptidos como oritavancina y telavancina, pero no para antibióticos con estructura polipeptídica cíclica como la colistina.

Las disoluciones de stock de dalbavancina se deben preparar en DMSO, a concentraciones que no superen los 1.600 mg/l. Las diluciones intermedias también se deben realizar con DMSO a una concentración $\times 100$ respecto a la concentración final del panel de microdilución. La dilución final (1:100) se debe realizar con caldo Muller-Hinton con concentración ajustada de iones y con P-80, que se añadirá al panel (50 μ l). Esta concentración se diluirá a la mitad tras la adición del inóculo (50 μ l). Es importante que la concentración final de DMSO en el pocillo no supere el 1% y que el P-80 se añada a la solución antibiótica en el último paso de la preparación, con lo que se alcanzará una concentración final en el pocillo de 0,002%⁶.

Para el control de calidad y para validar este procedimiento se deben incluir rutinariamente cepas de referencia ATCC, cuyas CMI son conocidas y están publicadas por el CLSI y por el EUCAST^{6,26}. Los datos de referencia aceptados para estos aislados se recogen en la tabla 3.

A la hora de realizar la lectura de la CMI, se deben considerar aquellos crecimientos aceptados como válidos en la técnica estándar de microdilución. Para la mayoría de los microorganismos (estafilococos, enterococos y estreptococos) se debe tener en cuenta el crecimiento que se observa como un botón (> 2 mm) en el fondo del pocillo y no tanto como turbidez en el pocillo. La lectura de la CMI para

Tabla 3

Rango de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de dalbavancina frente a cepas de referencia ATCC que deben utilizarse en el control de calidad del estudio de sensibilidad de este antimicrobiano

Microorganismo	Rangos de CMI (mg/l) aceptados
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,030-0,125
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212*	0,030-0,125
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	0,008-0,030

*El European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing no ha definido puntos de corte para enterococo y no ofrece rango de CMI para esta cepa.

este antibiótico es clara, ya que no presenta el efecto conocido como *trailing* y, al igual que para la mayoría de los antibióticos y microorganismos, debe realizarse a las 16-20 h²⁷.

Se ha demostrado una menor actividad (valores más altos de CMI) de dalbavancina en estudios con procedimientos en los que no se utiliza P-80 en las pruebas de sensibilidad²⁸. En estos trabajos realizados con paneles de plástico y de cristal, solo el 9% de las determinaciones para la cepa ATCC 29213 de *S. aureus* se mantuvo en el rango adecuado (ninguna cuando se utilizó plástico) cuando no se agregó P-80, frente al 100% cuando se añadió P-80 (fig. 3). Sin P-80, los valores de CMI de los aislados clínicos fueron de 4 a 8 veces superiores en enterococos y estafilococos y se observó un menor efecto en los estreptococos. De hecho, aunque se recomienda la adición de P-80 a la hora de determinar la sensibilidad de todos los microorganismos Gram positivos, cuando se emplean medios de cultivo con sangre de caballo lisada no sería necesario añadir P-80 ya que la sangre tiene acción surfactante per se. En estreptococos se han observado los mismos resultados de sensibilidad (± 1 dilución) con y sin P-80.

Por otra parte, no se han observado diferencias entre añadir el P-80 en el inóculo o en las diluciones del medio con el antibiótico, aunque se recomienda incorporarlo a las diluciones del medio porque es más sencillo desde el punto de vista del desarrollo de la técnica. A diferencia de otros antimicrobianos, tampoco se han demostrado diferencias en los valores de sensibilidad entre la utilización de paneles de poliestireno o de polipropileno²⁸. Para determinar la concentración final óptima de P-80 que hay que añadir en el panel se estudió un rango que abarcaba desde 0,000002 a 2% y se observó una mayor actividad a 0,002%, que es la concentración final estipulada que debe haber en el pocillo del panel.

A la hora de determinar la sensibilidad a dalbavancina, el método de dilución en agar no está recomendado, ya que se han demostrado discrepancias entre los resultados obtenidos con este método en comparación con los del método ISO de referencia, con una tendencia a dar valores de CMI más elevados en el primer caso^{24,29}.

Como se ha indicado con anterioridad, la técnica de difusión con discos para este antimicrobiano tampoco es una opción factible debido a su difusión limitada en el agar como consecuencia de su alto peso molecular²⁹. Sin embargo, se ha observado concordancia entre los resultados obtenidos por las tiras en gradiente, en concreto con Etest y la microdilución de referencia²⁴. Esta concordancia se demos-

tró en un estudio en el que se compararon ambos métodos frente a una colección de microorganismos Gram positivos (estafilococos, estreptococos, enterococos). También se observó que a la hora de determinar la sensibilidad con Etest no parece ser necesaria la adición de P-80 al agar, ya que en el diseño del Etest se utiliza un sistema que favorece la dispersión de la dalbavancina sin necesidad de la utilización de un surfactante. Por tanto, las tiras en gradiente de Etest podrían ser una alternativa sencilla a la hora de determinar la sensibilidad a dalbavancina. También se ha validado la utilización de paneles de microdilución liofilizados (SensititreTM)³¹.

Estudio subrogado de sensibilidad a dalbavancina

Hasta la incorporación de un nuevo antimicrobiano en los métodos comerciales para la determinación automática de la sensibilidad y su aprobación en el caso de la FDA en los Estados Unidos se suelen utilizar “marcadores subrogados”, que son antibióticos de la misma clase de los que sí existe un método automático de determinación de CMI con el fin de inferir el valor de su sensibilidad en función de la obtenida con el antibiótico estudiado. Esta opción es particularmente útil si el nuevo antimicrobiano tiene mayor actividad que el antibiótico marcador frente a los microorganismos estudiados y se ha utilizado previamente con los carbapenems y las fluoroquinolonas^{32,33}. En el caso de dalbavancina, se ha validado la utilización de vancomicina como marcador subrogado para extrapolar la sensibilidad a dalbavancina.

El primer estudio que se realizó sobre este aspecto fue en 2006³⁰, donde se clasificó la vancomicina y la teicoplanina como buenos marcadores subrogados para determinar la actividad de dalbavancina. Recientemente se han analizado nuevamente estos marcadores con los nuevos puntos de corte establecidos para dalbavancina (sensibilidad $\leq 0,12$ mg/l para *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. anginosus*) por la FDA y que han sido corroborados por el EUCAST^{4,5}. Para *S. aureus*, el uso de vancomicina como marcador subrogado tuvo un 99% de probabilidad de resultados concordantes y se observó una relación lineal entre las CMI de estos 2 compuestos.

Aunque la dalbavancina no está indicada para el tratamiento de infecciones causadas por estafilococos coagulasa negativos, también se estudió la vancomicina como marcador subrogado en estas especies y se describieron falsas sensibilidades, sobre todo con *Staphylo-*

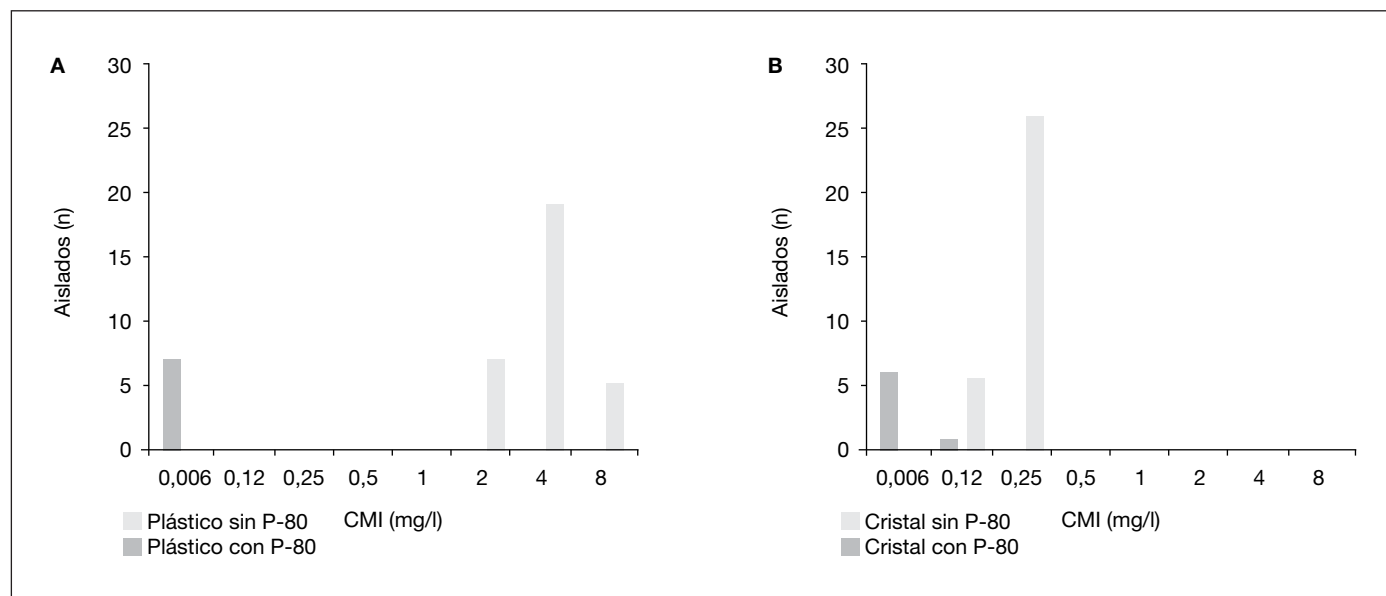


Figura 3. Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de dalbavancina obtenidos para la cepa ATCC 29213 de *Staphylococcus aureus* en paneles de plástico con y sin adición de polisorbato-80 (P-80) (A) y paneles de cristal con y sin adición de P-80 (B). Adaptado de Rennie et al²⁸.

coccus haemolyticus. Por su parte, el 99,9% de los enterococos sensibles a la vancomicina presentaron una CMI $\leq 0,25$ mg/l frente a dalbavancina y el 98,4-100,0% una CMI $\leq 0,12$ mg/l. Para *S. pyogenes*, *S. agalactiae* y *S. anginosus* se obtuvieron concordancias del 100,0, del 94,4 y del 100,0% respectivamente. Se llegó a la conclusión de que los resultados de sensibilidad a vancomicina pueden usarse con una alta confianza como marcadores subrogados para predecir la actividad de dalbavancina cuando la CMI es $\leq 0,12$ mg/l. En microorganismos con CMI $> 0,12$ mg/l no se ha podido llegar a ninguna conclusión por el bajo número de cepas existentes por encima de este valor.

En este sentido, el EUCAST incluye en sus tablas una nota que indica que los aislados sensibles a la vancomicina pueden también considerarse sensibles a la dalbavancina sin indicar esta reciprocidad para las cepas resistentes a la vancomicina⁵. Es importante destacar que la dalbavancina no es activa frente a los aislados de *S. aureus* con resistencia a la vancomicina mediada por el gen *vanA*. Estas cepas son por el momento muy infrecuentes y se han encontrado mayoritariamente en los Estados Unidos³⁴. En relación con los aislados VISA y hVISA, la actividad de la dalbavancina se ve ligeramente afectada ya que aumenta de 2 a 3 diluciones el valor de la CMI₅₀ con respecto al que presentan los aislados de *S. aureus* sin estas características³⁵. Aunque —tal y como se ha demostrado recientemente en ensayos en ratones³⁶— este último fenotipo podría no tener repercusión clínica in vivo, el EUCAST ha preferido excluir las cepas VISA de las inferencias de los valores subrogados e indica exclusivamente que las cepas sensibles a la vancomicina pueden considerarse sensibles a la dalbavancina sin pronunciarse en cuanto a las resistentes a la vancomicina. Por ello, ante una cepa de *S. aureus* con valores de CMI de 4 y 8 mg/l debe estudiarse la CMI de dalbavancina con el método de referencia ISO de microdilución. Esta misma consideración debería extenderse también a las cepas que presentan una CMI a la vancomicina ≥ 2 mg/l en las que se haya demostrado un fenotipo de heterorresistencia (hVISA). En el caso de los estreptococos beta-hemolíticos de los grupos A, B, C y G y en *Streptococcus* del grupo *viridans* (para los que el EUCAST ha fijado puntos de corte) también se considera la sensibilidad a la vancomicina como un valor subrogado de la sensibilidad a la dalbavancina.

Conclusiones

Ante la disponibilidad de un nuevo antimicrobiano se requiere siempre la estandarización de las pruebas de sensibilidad con el objetivo de obtener valores normalizados de su actividad antimicrobiana referida a valores de CMI. Este paso es imprescindible para conocer el perfil de sensibilidad de los nuevos antimicrobianos, establecer las correlaciones entre la farmacocinética y la farmacodinamia e interpretar los resultados de los ensayos clínicos. Con todo ello, los comités del antibiograma (EUCAST y CLSI) y las agencias reguladoras (EMA y FDA) establecen los puntos de corte que posteriormente se utilizan para interpretar las pruebas de sensibilidad. En el caso de la dalbavancina se ha seguido este proceso y se dispone de puntos de corte para los microorganismos implicados (tabla 2) en las infecciones para las que se ha aprobado su uso. Los puntos de corte definidos se ajustan a criterios microbiológicos y de PK/PD y a las correlaciones clínicas derivadas de los ensayos clínicos. Estos puntos de corte podrían revisarse en un futuro si se modifican las dosis o el esquema de administración del antimicrobiano o se amplían sus indicaciones clínicas.

Conflicto de intereses

R.C. pertenece a los comités de EUCAST y de COESANT (Comité Español del Antibiograma) y ha asistido a reuniones científicas patrocinadas por Angelini.

M.I.M. y M.D.A. declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- International Organization for Standards. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility testing devices. Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing anaerobic bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1. Geneva: International Organization for Standards; 2006.
- Kahlmeter G. The 2014 Garrod Lecture: EUCAST—are we heading towards international agreement? J Antimicrob Chemother. 2015;70:2427-39.
- Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. Clin Microbiol Infect. 2012;18:E37-45.
- Dalvance™. Package Insert. Chicago: Durata Therapeutics Intl; 2014. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021883s0001bl.pdf
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement. M100-S26. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Disponible en: <http://www.eucast.org>
- Dalvance™. Package Insert. Chicago: Allergan; 2016. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/021883s0031bl.pdf
- Jones RN, Farrell DJ, Flamm RK, Sader HS, Dunne MW, Mendes RE. Surrogate analysis of vancomycin to predict susceptible categorization of dalbavancin. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;82:73-7.
- Smith JR, Roberts KD, Rybak MJ. Dalbavancin: A Novel lipoglycopeptide antibiotic with extended activity against Gram-positive Infections. Infect Dis Ther. 2015;4:245-58.
- Xydalba. Summary of Product Characteristics. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002840/human_med_001848.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- Seltzer E, Dorr MB, Goldstein BP, Perry M, Dowell JA, Henkel T; Dalbavancin Skin and Soft-Tissue Infection Study Group. Once-weekly dalbavancin versus standard-of-care antimicrobial regimens for treatment of skin and soft-tissue infections. Clin Infect Dis. 2003;37:1298-303.
- Buckwalter M, Dowell JA. Population pharmacokinetic analysis of dalbavancin, a novel lipoglycopeptide. J Clin Pharmacol. 2005;45:1279-87.
- Marbury T, Dowell JA, Seltzer E, Buckwalter M. Pharmacokinetics of dalbavancin in patients with renal or hepatic impairment. J Clin Pharmacol. 2009;49:465-76.
- Leighton A, Gottlieb AB, Dorr MB, Jabs D, Mosconi G, VanSaders C, et al. Tolerability, pharmacokinetics, and serum bactericidal activity of intravenous dalbavancin in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:940-5.
- Dorr MB, Jabs D, Cavaleri M, Dowell J, Mosconi G, Malabarba A, et al. Human pharmacokinetics and rationale for once-weekly dosing of dalbavancin, a semi-synthetic glycopeptide. J Antimicrob Chemother. 2005; 55 Suppl 2:ii25-30.
- Anderson VR, Keating GM. Dalbavancin. Drugs. 2008;68:639-48.
- Andes D, Craig WA. In vivo pharmacodynamic activity of the glycopeptide dalbavancin. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:1633-42.
- Dowell JA, Goldstein BP, Buckwalter M, Stogniew M, Damle B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of dalbavancin, a novel glycopeptide antibiotic. J Clin Pharmacol. 2008;48:1063-8.
- Bhavani SM, Hammel JP, Rubino CM, Dunne M, Ambrose PG. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic (PK-PD) Analyses for the efficacy of dalbavancin using phase 3 data from patients with acute bacterial skin and skin structure infections. Abstr. No. A-1186. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sept 7, 2014, Washington, D.C.
- Salem AH, Zhanel GG, Ibrahim SA, Noreddin AM. Monte Carlo simulation analysis of cefotaxime, dalbavancin, daptomycin, tigecycline, linezolid and vancomycin pharmacodynamics against intensive care unit-isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2014;41:437-43.
- Jauregui LE, Babazadeh S, Seltzer E, Goldberg L, Krievins D, Frederick M, et al. Randomized, double-blind comparison of once-weekly dalbavancin versus twice-daily linezolid therapy for the treatment of complicated skin and skin structure infections. Clin Infect Dis. 2005;41:1407-15.
- Boucher HW, Wilcox M, Talbot GH, Puttagunta S, Das AF, Dunne MW. Once-weekly dalbavancin versus daily conventional therapy for skin infection. N Engl J Med. 2014;370:2169-79.
- Dunne MW, Puttagunta S, Giordano P, Krievins D, Zelasky M, Baldassarre J. A randomized clinical trial of single-dose versus weekly dalbavancin for treatment of acute bacterial skin and skin structure infection. Clin Infect Dis. 2016;62:545-51.
- Fritsche TR, Rennie RP, Goldstein BP, Jones RN. Comparison of dalbavancin MIC values determined by Etest (AB BIODISK) and reference dilution methods using gram-positive organisms. J Clin Microbiol. 2006;44:2988-90.
- Biedenbach DJ, Ross JE, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. Activity of dalbavancin tested against *Staphylococcus* spp. and beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from 52 geographically diverse medical centers in the United States. J Clin Microbiol. 2007;45:998-1004.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.1, 2016. Disponible en: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/
- Koeth LM, DiFranco-Fisher JM, McCurdy S. A reference broth microdilution method for dalbavancin in vitro susceptibility testing of bacteria that grow aerobically. J Vis Exp. 2015. doi: 10.3791/53028.

28. Rennie RP, Koeth L, Jones RN, Fritsche TR, Knapp CC, Killian SB, et al. Factors influencing broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for dalbavancin, a new glycopeptide agent. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3151-4.
29. Mushtaq S, Warner M, Johnson AP, Livermore DM. Activity of dalbavancin against staphylococci and streptococci, assessed by BSAC and NCCLS agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:617-20.
30. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR, Hogan PA, Sheehan DJ. Selection of a surrogate agent (vancomycin or teicoplanin) for initial susceptibility testing of dalbavancin: results from an international antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2622-5.
31. Jones RN, Anderegg TR, Biedenbach DJ. Validation of commercial dry-form broth microdilution panels for susceptibility testing of AZD2563, a new long-acting oxazolidinone. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9:543-6.
32. Jones RN, Sader HS, Fritsche TR, Janecek MJ. Selection of a surrogate beta-lactam testing agent for initial susceptibility testing of doripenem, a new carbapenem. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59:467-72.
33. Sader HS, Koeth LM, Poupard JA, Jones RN. Interpretive categorical accuracy of fluoroquinolone reference broth microdilution MIC results when testing *Streptococcus pneumoniae*: selection of a surrogate testing agent. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62:460-3.
34. Moravvej Z, Estaji F, Askari E, Solhjoui K, Naderi Nasab M, Saadat S. Update on the global number of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:370-1.
35. Citron DM, Tyrrell KL, Goldstein EJ. Comparative in vitro activities of dalbavancin and seven comparator agents against 41 *Staphylococcus* species cultured from osteomyelitis infections and 18 VISA and hVISA strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79:438-40.
36. Lepak A, Marchillo K, VanHecker J, Andes D. Impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus* on the dalbavancin in vivo pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:7833-6.