

# Actividad *in vitro* de ceftazidima/avibactam contra aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y comparación de técnicas de susceptibilidad

## *In vitro* activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and comparison of susceptibility methods

Valeria Quiroz<sup>1,2\*</sup>, Lina María Rivas<sup>1,2\*</sup>, Katherine Soto<sup>1,2</sup>, Valentina Sanfurgo<sup>1,2</sup>, Yohanna Antolínez<sup>1,2</sup>, Rebecca Tenner<sup>1</sup>, Rafael Araos<sup>1,2</sup>, Lorena Díaz<sup>1,2,3</sup>, Patricia García<sup>2,4</sup> y José M. Munita<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genomics and Resistant Microbes (GeRM) laboratory, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo

<sup>2</sup>Multidisciplinary Initiative for Collaborative Research on Bacterial Resistance (MICROB-R) Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Molecular Genetics and Antimicrobial Resistance Unit, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

<sup>4</sup>Departamento de Laboratorios Clínicos, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

\*Ambos autores contribuyeron de igual forma a este trabajo y comparten la primera autoría.

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés en la publicación de esta investigación.

El desarrollo de esta investigación fue parcialmente financiado por la Asociación Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico FONDECYT 1211933 otorgado a José Manuel Munita.

Recibido: 22 de julio de 2024 / Aceptado: 28 de mayo de 2025

### Resumen

**Introducción:** *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos constituye un reto clínico debido a la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas. La resistencia a carbapenémicos puede darse con producción o ausencia de carbapenemasas; en ambos casos ceftazidima/avibactam es una alternativa terapéutica prometedora. **Objetivos:** Evaluar la actividad *in vitro* de ceftazidima/avibactam sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemasas y comparar diferentes técnicas de medición de su actividad antimicrobiana. **Métodos:** La actividad *in vitro* de ceftazidima/avibactam fue evaluada en 186 aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos provenientes de 11 hospitales de Chile; 59 productores de *bla*<sub>KPC</sub> y 127 no productores de carbapenemasas. Se realizó determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) por la técnica de microdilución en caldo y fue comparada con epsilometría y disco difusión. **Resultados:** 100% de los aislados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos fueron susceptibles a ceftazidima/avibactam con CIM entre 0,25 y 8 µg/mL. Quince aislados (12 de ellos no productores de carbapenemasas) mostraron CIM de 8 µg/mL. Se observó alta concordancia (> 96%) comparando la microdilución en caldo con la epsilometría y disco difusión. **Discusión:** ceftazidima/avibactam se mostró activo en aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos chilenos. Debido a que se observaron aislados con CIM cercana al punto de corte, se recomienda vigilar su actividad. El rendimiento de la epsilometría y la disco difusión mostró una concordancia aceptable frente a la microdilución en caldo, por lo que se sugieren como alternativas en la práctica clínica.

**Palabras clave:** ceftazidima/avibactam; *Klebsiella pneumoniae*; resistencia a carbapenémicos.

### Abstract

**Background:** Due to the limited availability of therapeutic options, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is a clinical challenge. Carbapenem resistance can occur with or without carbapenemase production; in both cases, ceftazidime/avibactam is a promising treatment alternative. **Objective:** To evaluate *in vitro* activity ceftazidime/avibactam in carbapenemases resistant *Klebsiella pneumoniae* and to compare different techniques to measure its antibacterial activity. **Methods:** The *in vitro* activity of ceftazidime/avibactam was evaluated in 186 clinical isolates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from 11 hospitals in Chile; 59 were *bla*<sub>KPC</sub>-producing and 127 were non-carbapenemase-producing. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution and compared with epsilometry and disk diffusion. **Results:** 100% of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were susceptible to ceftazidime/avibactam with MICs between 0.25 and 8 µg/mL. Fifteen isolates (12 non-carbapenemase-producing) showed a MIC of 8 µg/mL. High concordance (> 96%) was noted when broth microdilution was compared with epsilometry and disk diffusion. **Discussion:** Ceftazidime/avibactam was active in Chilean clinical isolates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. Given that isolates with MICs close to the cut-off point were observed, it is recommended that their activity be monitored. The findings of epsilometry and disk diffusion showed satisfactory agreement with broth microdilution; therefore, they are suggested as alternatives in clinical practice.

**Keywords:** ceftazidime/avibactam, *Klebsiella pneumoniae*, carbapenem resistance.

### Correspondencia a:

Valeria Quiroz Palma  
vcquiroz@uc.cl

José Manuel Munita  
josemunita@udd.cl

## Introducción

Las infecciones producidas por *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC) son consideradas una prioridad crítica a nivel mundial<sup>1</sup>. Entre estas, *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (*Kpn-RC*) acarrea una de las mayores cargas de morbimortalidad<sup>2,3</sup>. En Chile, *Kpn-RC* es la ERC más frecuentemente encontrada<sup>4</sup> y se ha documentado un aumento en su frecuencia durante el periodo post pandemia de COVID-19<sup>4,5,6</sup>.

El mecanismo de resistencia más frecuente a carbapenémicos en *Kpn-RC* es la producción de  $\beta$ -lactamasas denominadas carbapenemasas. Las carbapenemasas que presentan un residuo de serina en su sitio activo se denominan serino-carbapenemasas y aquellas que contienen un átomo de  $Zn^{2+}$  en su dominio hidrolítico se conocen como metalo-carbapenemasas (MBL)<sup>7</sup>. La serino-enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), codificada por el gen *bla<sub>KPC</sub>*, es la carbapenemasa más frecuentemente aislada en *K. pneumoniae* en el mundo y también en Chile según reportes oficiales<sup>4</sup>. Aparte de la producción de carbapenemasas, existen otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos, los que incluyen alteraciones en la permeabilidad de la membrana, sobreexpresión de bombas de eflujo y la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro más reducido<sup>8-12</sup>. Si bien en Chile se ha observado un aumento en el número de aislados de *Kpn-RC* productoras de KPC (*Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>*) luego de la pandemia, las cepas de *Kpn-RC* no productoras de carbapenemasas (*Kpn-RC NPC*) siguen siendo muy frecuentes en el país<sup>6</sup>.

Las infecciones por *Kpn-RC* son difíciles de tratar dada la baja disponibilidad de alternativas terapéuticas efectivas. Una de las opciones disponibles en el país es ceftazidima/avibactam (CZA), la que fue aprobada por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) en 2015 y combina ceftazidima (CAZ), una cefalosporina de tercera generación, con avibactam (AVI), un inhibidor de serino- $\beta$ -lactamasas (incluyendo *bla<sub>KPC</sub>*) perteneciente a la familia de los DBO (del inglés *diazabicyclooctane*)<sup>13</sup>. Avibactam inactiva la acción enzimática través de la formación de un enlace covalente con el sitio activo de las serino enzimas, evitando así la hidrólisis de CAZ<sup>14,15</sup>. Cabe destacar que AVI no inhibe la acción de carbapenemasas del tipo MBL (como *bla<sub>NDM</sub>* o *bla<sub>VIM</sub>*), por lo que CZA no es una alternativa efectiva contra aislados productores de este tipo de enzimas. Distintos reportes sugieren que la actividad *in vitro* de CZA contra ERC es superior al 95%<sup>16,17</sup>. En particular, la actividad reportada *in vitro* de CZA contra *Kpn-RC* es ~99%, con una CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 0,5-1 y 2  $\mu$ g/mL, respectivamente<sup>18-20</sup>.

Si bien el uso de CZA fue oficialmente autorizado en Chile en 2019<sup>21</sup>, los datos de su actividad *in vitro* contra

aislados causando infecciones en el país son escasos. Esta información es particularmente relevante considerando el aumento de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* y la alta frecuencia de *Kpn-RC NPC*, grupo en el cual la información es particularmente escasa. En este contexto, evaluamos la actividad *in vitro* de CZA frente a una colección de aislados clínicos de *Kpn-RC* productores y no productores de carbapenemasas obtenidos de pacientes hospitalizados en 11 centros a lo largo de Chile. Considerando que la microdilución en caldo (MDC) es el método de referencia para evaluar susceptibilidad antimicrobiana, y con el objetivo de proponer otras opciones al momento de evaluar la susceptibilidad *in vitro* a CZA, también comparamos el desempeño de dos técnicas de difusión en agar (epsilometría y difusión por disco [DD]) para la determinación de la actividad *in vitro* de CZA.

## Métodos

### Colección de aislados bacterianos

Se incluyeron 186 aislados de *Kpn-RC* recuperados de 186 pacientes (solo se incluyó el primer aislado por paciente) hospitalizados en 11 centros de salud de Chile entre junio de 2018 y septiembre de 2023. Se consideraron los aislados disponibles de los centros con los que se mantiene una colaboración activa, todos con la aprobación de sus respectivos Comités de Ética. El origen de las muestras incluyó sangre (n = 94; 51%), orina (n = 41; 22%), tejido (n = 25, 13%), líquidos estériles (n = 12; 6,5%) y tracto respiratorio (n = 14; 7,5%). En cuanto al año de recolección, 55 (29,6%) aislados fueron obtenidos durante el año 2018, 21 (11,3%) el 2019, 42 (22,6%) durante 2020, 40 (21,5%) el año 2021, 24 (13%) en 2022 y finalmente 4 (2,2%) durante 2023. Todos los aislados fueron enviados a un laboratorio central donde se confirmó la identificación de género y especie por MALDI-TOF (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) y se determinó el perfil de susceptibilidad *in vitro* por el método de DD (OXOID™) de acuerdo con lo recomendado por el CLSI 2023<sup>22</sup>. Los aislados confirmados como *K. pneumoniae* fueron considerados como *Kpn-RC* si exhibían un perfil no susceptible frente a  $\geq 1$  de los tres carbapenémicos evaluados (ertapenem, imipenem y/o meropenem) según los resultados obtenidos centralmente.

La detección de genes de  $\beta$ -lactamasas *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*, y de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*, se realizó mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC) múltiple. Dado la esperable resistencia a CZA en cepas productoras de MBL, todos los aislados positivos para *bla<sub>VIM</sub>* o *bla<sub>NDM</sub>* se excluyeron del estudio. La colección de aislados incluidos en los análisis se clasificaron en *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* y *Kpn-RC NPC*.

### Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a CZA

La susceptibilidad *in vitro* de todos los aislados a CZA se determinó por MDC según las recomendaciones del documento M07 del CLSI<sup>23</sup>. Se prepararon placas con caldo Mueller Hinton (MH) II catión ajustado (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con concentraciones dobles seriadas de ceftazidima entre 0,06 y 64 µg/mL (código C3809, droga pura, Sigma) y manteniendo una concentración fija de avibactam (droga pura, Pfizer) de 4 µg/mL en todos los pocillos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue leída luego de 16-20 horas de incubación a 37°C.

De los 186 aislados de *Kpn*-RC evaluados frente a CZA con MDC, 96 fueron también utilizados para evaluar el rendimiento de la epsilometría y de la DD. La susceptibilidad a CZA por la técnica de epsilometría empleando tiras Etest® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) y la DD (OXOID™, discos de CZA 50 µg/mL) se realizó sobre placas de agar MH catión ajustado (BD) siguiendo las recomendaciones de CLSI y del fabricante<sup>22</sup>. La lectura de los resultados de ambas técnicas se realizó luego de 16-20 horas de incubación a 37°C. El resultado de CIM obtenido por epsilometría se leyó siguiendo un patrón de diluciones dobles, por lo que los resultados fueron aproximados a la siguiente concentración más alta cuando fue necesario.

Todas las técnicas fueron realizadas en duplicado y en paralelo, utilizando el mismo inóculo bacteriano. Para aquellos aislados en los que se observó diferencia en la CIM de 1 dilución, se realizó una tercera réplica, dejando como resultado el valor modal. Todos los experimentos incluyeron las cepas control *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC-BAA 1705 y *E. coli* ATCC 25922. La categorización de susceptibilidad a CZA fue realizada utilizando los puntos de corte del M100 del CLSI 2023<sup>22</sup>.

### Análisis estadístico

La comparación de técnicas se realizó en base a lo establecido por la norma ISO 20776-2:2021<sup>24</sup> y se incluyó la variable de error mayor según las indicaciones M23 del CLSI<sup>25</sup>. Para evaluar el rendimiento de la técnica de epsilometría respecto a la MDC se calculó concordancia esencial y sesgos, mientras que para la DD se calculó sensibilidad, especificidad y error mayor.

**Concordancia esencial (CE):** razón entre los valores de CIM que coinciden por el método evaluado (epsilometría) considerando 1 doble dilución respecto de los obtenidos por el método de referencia (MDC). El método se consideró válido con CE 90%.

**Sesgo:** medida de la exactitud entre los resultados del método evaluado (epsilometría) respecto de la referencia (MDC). A partir de lo establecido por la norma y para facilitar la comprensión de los resultados, definimos

como sesgo superior (o inferior) a la razón obtenida por el número de aislados con una CIM<sub>epsilometría</sub> mayor (o menor) que la obtenida por los mismos según MDC respecto del total de aislados incluidos en ese rango. Se consideró como aceptable para el método evaluado (epsilometría) un ΔSesgo entre -30 y 30%, el que fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Sesgo superior} = \frac{\text{n}^\circ \text{aislados con CIM}_{\text{epsilometría}} > \text{CIM}_{\text{MDC}}}{\text{n}^\circ \text{total aislados incluidos en el rango}}$$

$$\text{Sesgo inferior} = \frac{\text{n}^\circ \text{aislados con CIM}_{\text{epsilometría}} < \text{CIM}_{\text{MDC}}}{\text{n}^\circ \text{total aislados incluidos en el rango}}$$

$$\Delta \text{Sesgo} = \text{sesgo superior} - \text{sesgo inferior}$$

**Sensibilidad (S):** concordancia entre la interpretación del método evaluado (DD) y el método de referencia (MDC) en aquellos aislados categorizados como resistentes por MDC.

$$S (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{aislados resistentes a CZA según DD y MDC}}{\text{n}^\circ \text{total de aislados resistentes por MDC}} \times 100$$

**Especificidad (E):** concordancia entre la interpretación del método evaluado (DD) y el método de referencia (MDC) en aquellos aislados categorizados como susceptibles por MDC.

$$E (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{aislados susceptibles a CZA según DD y MDC}}{\text{n}^\circ \text{total de aislados susceptibles por MDC}} \times 100$$

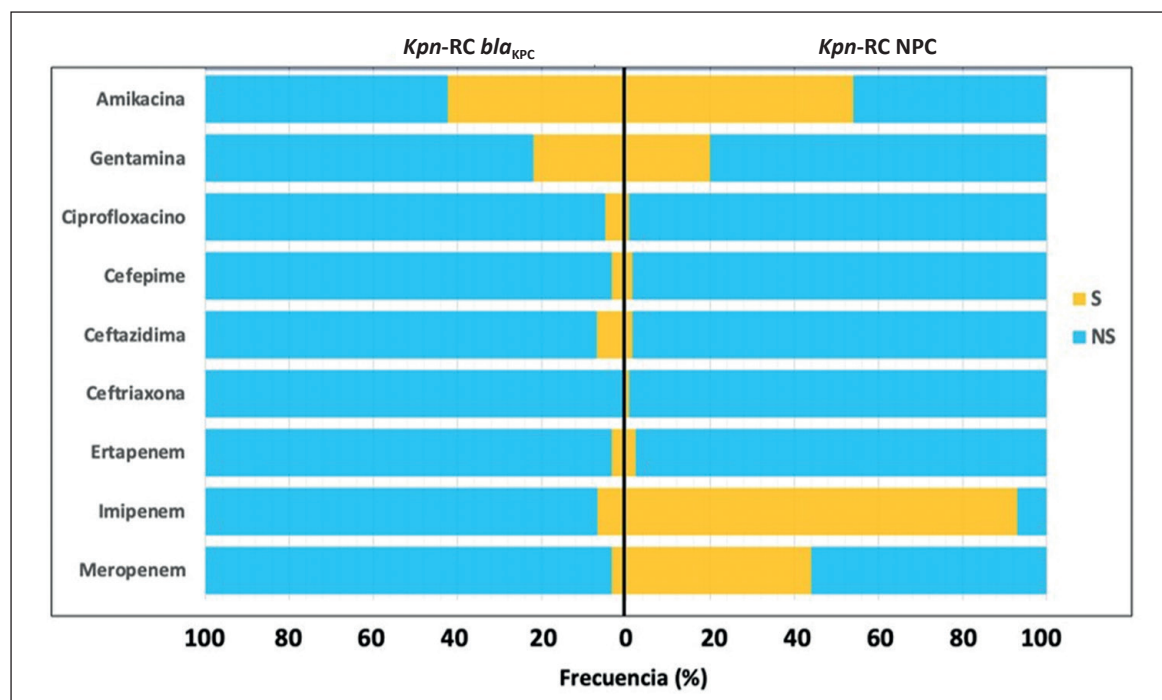
**Error mayor (EM):** proporción de aislados categorizados como resistentes por el método evaluado (DD) pero definidos como susceptibles por el método de referencia (MDC).

$$EM (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{aislados resistentes según DD}}{\text{n}^\circ \text{total de aislados susceptibles por MDC}} \times 100$$

## Resultados

### Perfil de susceptibilidad y detección molecular de β-lactamasas

Del total de 186 aislados, 127 (68%) fueron clasificados como *Kpn*-RC NPC y 59 (32%) correspondieron a *Kpn*-RC *bla*<sub>KPC</sub>. En cuanto al perfil de susceptibilidad *in vitro*, más de 97% de los aislados exhibieron resistencia a ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y ciprofloxacina para ambos grupos. La resistencia a aminoglucósidos fue de 80% (n = 148) para gentamicina y 49% (n = 92) para amikacina (Figura 1).



**Figura 1.** Perfil de susceptibilidad de aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Distribución de la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión de 59 aislados clínicos de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* (lado izquierdo) y 127 aislados clínicos de *Kpn-RC NPC* (lado derecho) según puntos de corte CLSI M100 2023. Susceptible (S), no susceptible (NS).

En relación a los carbapenémicos, 97% (n = 181) del total de aislados fueron resistentes a ertapenem, independiente de la presencia de *bla<sub>KPC</sub>*. Los aislados de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* presentaron alta frecuencia de resistencia a imipenem y meropenem (93 y 97%, respectivamente). En contraste, las cepas *Kpn-RC NPC* mostraron una resistencia a imipenem y meropenem de 7 y 56%, respectivamente (Figura 1), ambas significativamente más bajas que el grupo de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* (p < 0,0001, prueba de Fisher's).

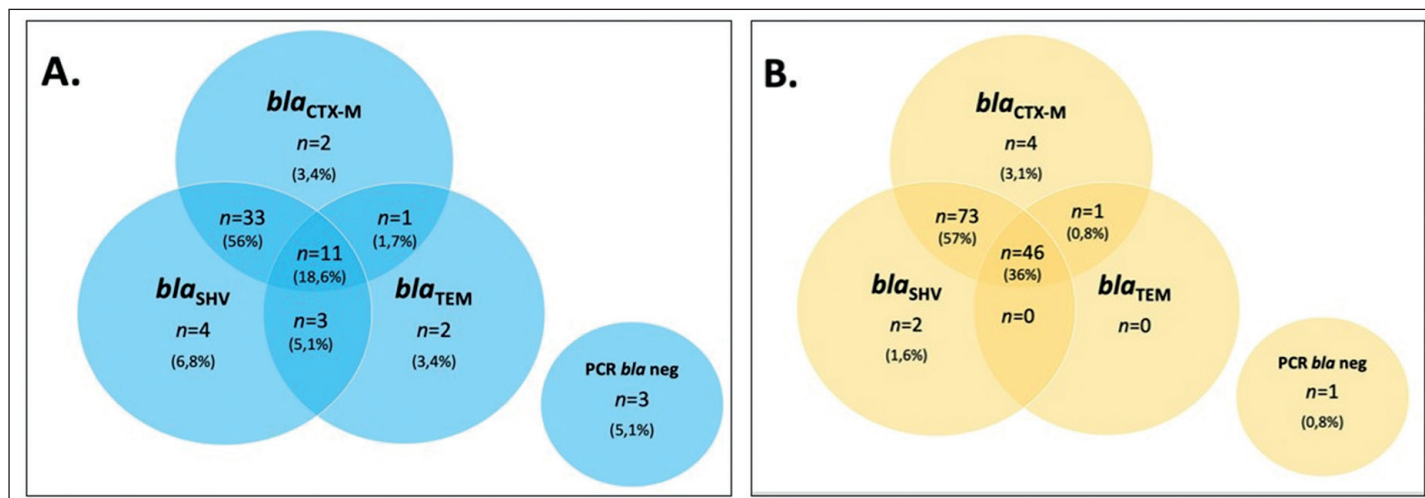
La detección de genes de β-lactamasas por RPC, demostró que 98% de los aislados era portador de al menos una β-lactamasa, con 92% de cepas positivas para *bla<sub>CTX-M</sub>*. La presencia de *bla<sub>CTX-M</sub>* fue 80% para el grupo *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* (Figura 2A) y 98% para los aislados *Kpn-RC NPC* (Figura 2B). La presencia simultánea de *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* se observó en 36% de los aislados de *Kpn-RC NPC*, vs. sólo en 18% en el grupo de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* (Figura 2).

#### Actividad in vitro de CZA contra aislados clínicos de *Kpn-RC*

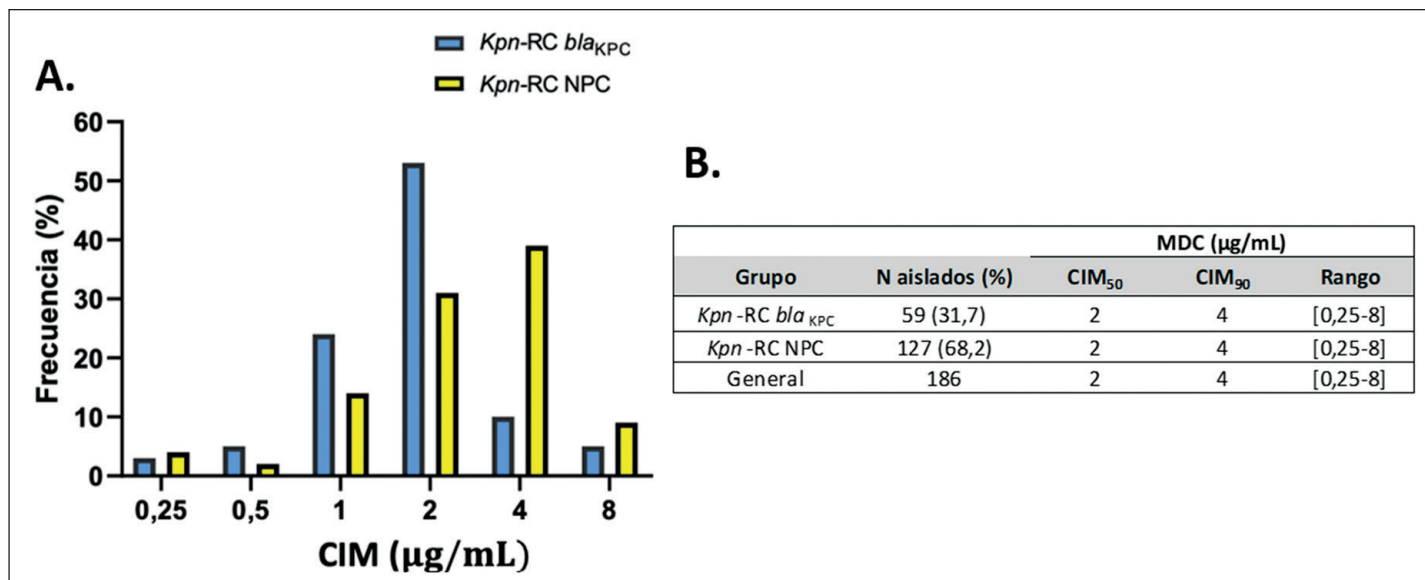
La evaluación de susceptibilidad *in vitro* por MDC mostró que los 186 aislados de *Kpn-RC* fueron catalogados como susceptibles a CZA, con una CIM<sub>90</sub> de 4 µg/mL y un rango entre 0,25 y 8 µg/mL (Figura 3). No se observaron diferencias en la CIM<sub>50</sub> y la CIM<sub>90</sub> entre el grupo de aislados con o sin *bla<sub>KPC</sub>* (Figura 3B). Sin

embargo, mientras que 85% de las cepas *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* exhibieron una CIM a CZA ≤ 2 µg/mL, cerca de 50% de los aislados de *Kpn-RC NPC* presentaron una CIM entre 4-8 µg/mL (Figura 3A). Más aún, 12 de los 15 aislados que exhibieron una CIM a CZA = 8 µg/mL (punto de corte de resistencia 16 µg/mL según M100 del CLSI) pertenecieron al grupo de *Kpn-RC NPC*.

Adicionalmente, analizamos la susceptibilidad a CZA en el tiempo (Figura 4). Interesantemente, mientras que ~40% de los aislados recolectados entre 2018-2021 exhibieron una CIM a CZA entre 4-8 µg/mL, solo 11% de las cepas obtenidas entre 2022-2023 presentaron una CIM 4 µg/mL y ninguna de ellas exhibió una CIM de 8 µg/mL. Con el interés de evaluar un potencial impacto de la pandemia de COVID-19, analizamos la susceptibilidad a CZA dividiendo los aislados en un grupo pre-COVID-19 -junio 2018 a febrero 2020- (n = 86; 46%) y en un grupo post COVID-19 -marzo 2020 a septiembre 2023- (n = 100; 54%). Los aislados de *Kpn-RC NPC* obtenidos en el periodo post COVID-19 exhibieron un aumento de una dilución en la CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> con respecto a los aislados recuperados en el periodo pre-COVID-19 (de 2 a 4 µg/mL y de 4 a 8 µg/mL, respectivamente) (Figura 4B). De manera similar, la CIM<sub>90</sub> a CZA de aislados de *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* aumentó de 2 a 4 µg/mL entre el periodo pre- y post-COVID (Figura 4B).



**Figura 2.** Presencia de β-lactamasas *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> en aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. La detección de β-lactamasas se realizó por ensayo de RPC en 186 aislados *Kpn-RC* (A) 59 aislados clínicos de *Kpn-RC bla*<sub>KPC</sub> y (B) 127 aislados clínicos de *Kpn-RC NPC*.

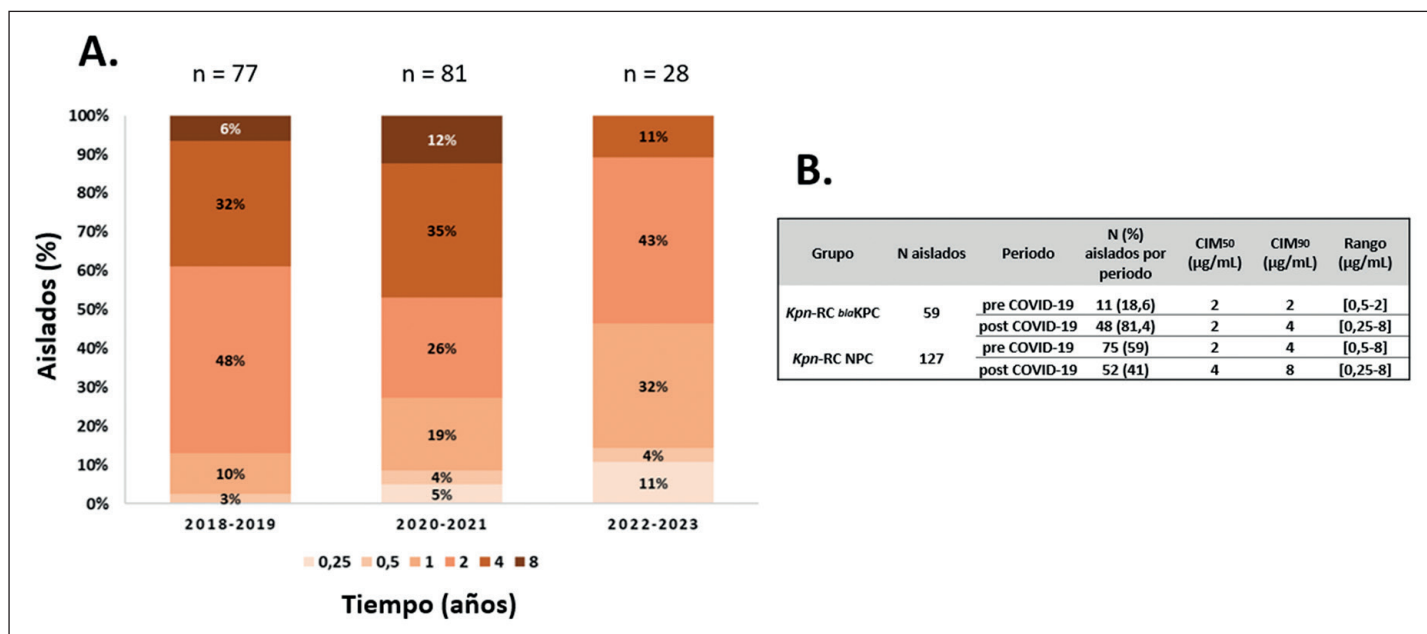


**Figura 3.** Distribución general de la CIM de CZA para aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos según microdilución en caldo. (A) Para 59 aislados clínicos de *Kpn-RC bla*<sub>KPC</sub> y 127 aislados clínicos de *Kpn-RC NPC* determinada por microdilución en caldo según M100 CLSI 2023; (B) y sus respectivas CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> por grupo.

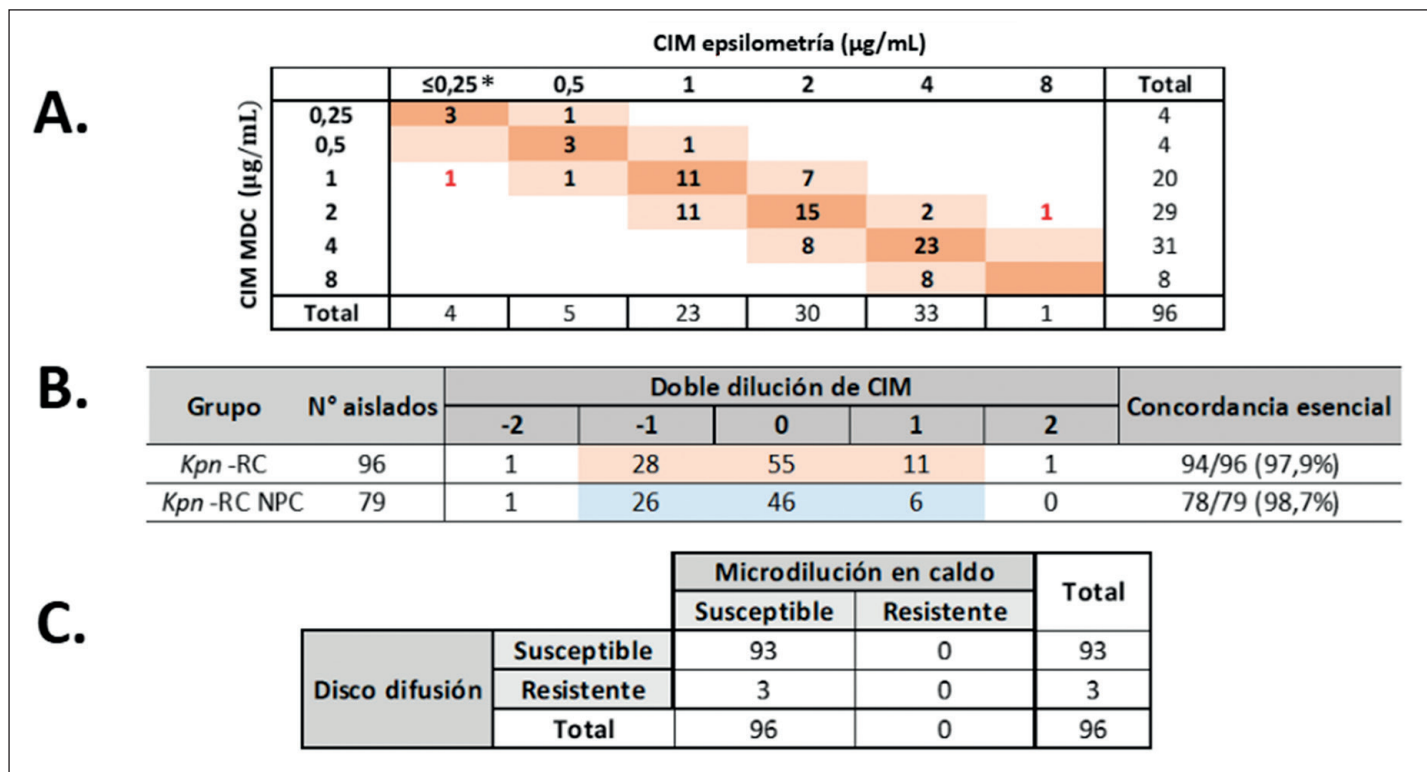
### Rendimiento de la técnica de epsilometría y DD para evaluar la susceptibilidad in vitro a CZA

Con el fin de comparar el rendimiento de la epsilometría y de la DD respecto de MDC para evaluar la actividad *in vitro* de CZA, usamos 96 aislados (79 a *Kpn-RC NPC* y 17 *Kpn-RC bla*<sub>KPC</sub>) que fueron analizados con las tres técnicas en simultáneo. La concordancia en cuanto a categoría entre la epsilometría y la MDC fue 100%, y la concordancia esencial fue 98% (94/96), con

discrepancias para dos aislados con CIM de 1 μg/mL y 2 μg/mL por MDC versus 0,25 μg/mL y 8 μg/mL por epsilometría, respectivamente (Figura 5A). En ambos casos, la discrepancia superó en una dilución al error aceptable (1 dilución) y en ninguno de ellos se tradujo en un cambio en la categorización del aislado. La diferencia entre el sesgo superior (CIM<sub>epsilometría</sub> > CIM<sub>MDC</sub>) e inferior (CIM<sub>epsilometría</sub> < CIM<sub>MDC</sub>) fue -15%, valor considerado como aceptable.



**Figura 4.** Distribución de la CIM de CZA para aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos según microdilución en caldo entre los años 2018 y 2023. (A) Comparación de la CIM de CZA para 186 aislados de *Kpn-RC* (incluido *Kpn-RC blaKPC* y *Kpn-RC NPC*) y (B) su distribución de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> considerando el periodo pre y post-COVID 19.



**Figura 5.** Correlación de la susceptibilidad de CZA obtenida por la microdilución en caldo respecto de epsilonometría y disco difusión en aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. (A) Valor de la CIM según MDC y epsilonometría para el total de aislados de *Kpn-RC* (incluye *Kpn-RC blaKPC* y *Kpn-RC NPC*), (B) Concordancia esencial entre la MDC y epsilonometría en base a doble diluciones de CIM para *Kpn-RC* y *Kpn-RC NPC* y (C) Comparación de la interpretación categórica entre MDC y DD para el total de aislados de *Kpn-RC*. \*Incluye 2 aislados con CIM a CZA por epsilonometría de 0,19 y 0,125 µg/mL.

Por otro lado, la comparación de DD frente a MDC mostró una concordancia en la categoría de 97%. La DD identificó como CZA susceptible a 93 de los 96 aislados analizados con una especificidad de 97%, y un EM ~3%. Los tres aislados categorizados como resistentes por DD correspondieron a *Kpn*-RC NPC con CIM a CZA por MDC entre 4 y 8 µg/mL (Figura 5C). Dado la ausencia de aislados categorizados como resistentes a CZA por MDC, no fue posible calcular la sensibilidad del método.

## Discusión

Las infecciones causadas por *Kpn*-RC se han convertido en un problema mundial<sup>26</sup>. Guías internacionales sugieren el uso de nuevas combinaciones de β-lactámicos con inhibidores de β-lactamasas como una alternativa de manejo<sup>27-29</sup>. En Chile solo se encuentra disponible CZA. En este trabajo, evaluamos la actividad de CZA frente a 186 aislados clínicos de *Kpn*-RC recolectados en 11 centros del país y realizamos una comparación de dos técnicas de difusión en agar en relación a la MDC. Del total de aislados evaluados, 100% resultó susceptible a CZA según la MDC, con un rango de CIM entre 0,25 y 8 µg/mL, y una CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> de 2 y 4 µg/mL, respectivamente.

El porcentaje de susceptibilidad a CZA en *Kpn*-RC que encontramos fue similar al reportado en otros trabajos, que reportaron una susceptibilidad entre 93 y 100%, incluso en *Kpn*-RC *bla*<sub>KPC</sub><sup>16,17,20,30</sup>. Nuestros datos sugieren que CZA mantiene una buena actividad *in vitro* frente a aislados de *Kpn*-RC. Así mismo, la distribución de CIM previamente reportada para CZA frente a *Kpn*-RC también es similar a la observada en nuestra colección, con CIM<sub>50/90</sub> de 1 µg/mL y 2 µg/mL, respectivamente<sup>18</sup>. Cabe destacar que la mayoría de los reportes previos incluyen principalmente aislados de *Kpn*-RC *bla*<sub>KPC</sub>, y los datos frente a *Kpn*-RC NPC son más escasos<sup>31</sup>. En nuestro trabajo, 127 de los 186 aislados estudiados (68%) correspondieron a *Kpn*-RC NPC. Si bien no encontramos diferencias en la distribución de CIM entre aislados productores y no productores de carbapenemasas, es interesante destacar que 80% (12/15) de los aislados que exhibieron una CIM a CZA de 8 µg/mL (cerca al punto de corte) correspondieron al grupo de *Kpn*-RC NPC.

Los principales mecanismos de resistencia a CZA se han identificado en aislados de *Kpn*-RC *bla*<sub>KPC</sub><sup>32</sup> y se han relacionado con cambios a nivel de la KPC o con alteraciones a nivel de la PBP3<sup>33-35</sup>. Si bien en nuestros datos no encontramos aislado alguno resistente a CZA, la observación de CIM a CZA cercanas al punto de corte en aislados de *Kpn*-RC NPC es potencialmente relevante y requiere mayor estudio para entender sus bases moleculares, las que podrían estar en el contexto de una combinación de mecanismos no enzimáticos y de la expresión de β-lactamasas de espectro reducido<sup>36,37</sup>.

La evaluación de la actividad a CZA antes y después de la pandemia de COVID reveló un aumento de una dilución de la CIM<sub>90</sub> en el periodo post pandemia para ambos grupos de aislados. Sin embargo, el análisis temporal por años no sugiere que dicho incremento se haya mantenido en el tiempo. Por el contrario, ninguno de los aislados recolectados entre 2022-2023 presentó una CIM = 8 µg/mL y sólo 11% de ellos exhibieron una CIM = 4 µg/mL, lo que contrasta con que 47% de las cepas obtenidas entre 2020-2021 tenían una CIM a CZA entre 4-8 µg/mL (Figura 4).

El rendimiento de las técnicas se evaluó según la norma ISO 20776:2021<sup>24</sup>, que proporciona directrices detalladas sobre cómo validar métodos para determinar la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, asegurando resultados precisos y confiables. Una diferencia destacable de la norma ISO 20776:2021 respecto al *Clinical Microbiology Procedures Handbook*<sup>38</sup>, estándares frecuentemente utilizados en la práctica clínica para evaluar el rendimiento de las técnicas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, es que permite cuantificar el porcentaje de discrepancias del método bajo evaluación respecto al método de referencia, al incluir el concepto de sesgo. El sesgo determina si los resultados que difieren del método de referencia lo hacen predominantemente en una dirección, ya sea superior o inferior.

La comparación del rendimiento de epsilometría y de la DD frente a la MDC reveló una alta concordancia en cuanto a su categoría (98 y 97%, respectivamente), y un EM (~3%) dentro del límite aceptable establecido por el M23 del CLSI, resultados que son consistentes con la literatura científica<sup>32,39,40</sup>. Cabe destacar que en los tres aislados categorizados como resistentes por DD y susceptibles por MDC el resultado del halo de inhibición fue entre 20 y 22 mm. De acuerdo con lo establecido por el M100 del CLSI<sup>22</sup>, frente a dichos halos de inhibición se sugiere confirmar la susceptibilidad *in vitro* por un método que entregue una CIM. En nuestro caso, la CIM por MDC fue de 8 µg/mL. Por este motivo, nos parece relevante que los laboratorios clínicos cuenten con ensayos complementarios que puedan otorgar valores de CIM (como tira de gradiente antimicrobiana) cuando se enfrenten a casos como estos. Sin bien hay reportes previos que han mostrado un buen rendimiento de epsilometría y DD<sup>32,41</sup>, dichos trabajos fueron realizados utilizando un grupo diverso de ERC (que incluían *Kpn*-RC *bla*<sub>KPC</sub>) y con muy baja representación de *Kpn*-RC NPC. En nuestro trabajo las discrepancias obtenidas con la DD correspondieron a aislados *Kpn*-RC NPC, de lo que hasta el momento no existen datos reportados.

Dentro de las limitaciones de este estudio, se encuentra la falta de aislados de *Kpn*-RC resistentes a CZA, lo que limita la evaluación de la sensibilidad de los métodos analizados. Además, dado que la temporalidad de

recolección de los aislados para este estudio fue desigual a través de los años, no es posible inferir conclusiones sobre el comportamiento de la población en general. Por otra parte, no tenemos información respecto del linaje genético de los aislados, lo que no nos permite comprender la diversidad de nuestra muestra y, por lo tanto, su validez externa en otras áreas geográficas. Así mismo, dado que no tenemos el genoma completo de los aislados, no podemos evaluar las observaciones de CIM con potenciales mecanismos de resistencia como la producción de otras enzimas, cambios en la permeabilidad o bombas de expulsión. Esta información sería de gran interés para comprender el desplazamiento a la

derecha de la curva de CIM a CZA observado en los aislados de *Kpn-RC NPC*.

En conclusión, observamos que CZA mantiene una buena actividad *in vitro* frente a aislados clínicos de *Kpn-RC* tanto *Kpn-RC bla<sub>KPC</sub>* como *Kpn-RC NPC*. Sin embargo, existe un grupo de aislados de *Kpn-RC NPC* con una CIM a CZA cercana al punto de corte de resistencia, observación que podría ser potencialmente relevante. Por otro lado, respecto de la comparación de técnicas de susceptibilidad a CZA, nuestros resultados respaldan el uso de la epsilometría y de la DD, y sugieren que hay circunstancias puntuales en que es relevante corroborar el resultado de la DD con la determinación de la CIM.

## Referencias bibliográficas

- World Health Organization. Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. WHO, Geneva, Switzerland. 2024. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
- World Health Organization. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) Report 2022. WHO, Geneva, Switzerland. 2024. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364996/9789240062702-eng.pdf?sequence=1>
- Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; 399 (10325): 629-55. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- Instituto de Salud Pública. Vigilancia de carbapenemasas en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), Chile 2014-2017. ISP. 2018. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnCarbapenemasas-02042019A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnCarbapenemasas-02042019A%20(1).pdf)
- Instituto de Salud Pública. Boletín de Resistencia Antimicrobiana. ISP. 2022. [https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/Bolet%C3%ADnRAM\\_FINAL-1-1.pdf](https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/Bolet%C3%ADnRAM_FINAL-1-1.pdf)
- Allel K, Peters A, Conejeros J, Martínez JRW, Spencer Sandino M, Riquelme-Neira R, et al. Antibiotic consumption during the coronavirus disease 2019 pandemic and emergence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* lineages among inpatients in a Chilean hospital: a time-series study and phylogenomic analysis. *Clin Infect Dis* 2023; 77(Suppl1): S20-S28. doi: 10.1093/cid/ciad151
- Bush K, Bradford PA. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17 (5): 295-306. doi: 10.1038/s41579-019-0159-8
- Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(4): 659-67. doi: 10.1093/jac/dkp029
- Livingstone D, Gill MJ, M, Wise R. Mechanisms of resistance to the carbapenems *J Antimicrob Chemother* 1995;35(1):1-5. doi: 10.1093/jac/35.1.1
- Sugumar M, Kumar KM, Manoharan A, Anbarasu A, Ramaiah S. Detection of OXA-1  $\beta$ -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* from blood stream infections (BSI) by conventional PCR and in-silico analysis to understand the mechanism of OXA mediated resistance. *PLOS One* 2014; 9 (3). doi: 10.1371/journal.pone.0091800
- Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 2019; 69(Suppl7): S521-S528. doi: 10.1093/cid/ciz824
- Spencer-Sandino M, Riquelme-Neira R, Shropshire WC, An Q, Dinh AQ, González-Rocha G, González-Muñoz P, et al. Selective digestive decontamination with oral colistin plus gentamicin for persistent bacteraemia caused by non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neutropenic patient. *JAC Antimicrob Resist* 2021; 3(2).doi: 10.1093/jacamr/dlab079
- Falcone M, Paterson D. Spotlight on ceftazidime-avibactam: A new option for MDR Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(10): 2713-22. doi: 10.1093/jac/dkw239
- Dietl B, Martínez LM, Calbo E, Garau J. Update on the role of ceftazidime-avibactam in the management of carbapenemase-producing Enterobacterales. *Future Microbiol* 2020;15 (7): 473-84. doi: 10.2217/fmb-2020-0012
- Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PL, McLaughlin RE, Olivier NB, Alm RA. Avibactam and class C  $\beta$ -lactamases: mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(10): 5704-13. doi: 10.1128/AAC.03057-14
- Appel TM, Mojica MF, De La Cadena E, Christian José Pallares CJ, Radice MA, Castañeda-Méndez P, et al. *In vitro* susceptibility to ceftazidime/avibactam and comparators in clinical isolates of *Enterobacterales* from five Latin American countries. *Antibiotics* 2020; 9(2): 62. doi: 10.3390/antibiotics9020062
- Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, de Jonge BLM, Stone GG, Sahn DF. *In vitro* activity of ceftazidime-avibactam against clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* collected in Latin American countries: Results from the INFORM Global Surveillance Program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(4). doi: 10.1128/AAC.01814-18
- Shields RK, Clancy CJ, Hao B, Chen L, Press EG, Iovine NM, et al. Effects of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase subtypes, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and porin mutations on the *in vitro* activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(9): 5793-7. doi: 10.1128/AAC.00548-15
- Sader HS, Castanheira M, Flamm RK. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against Gram-negative bacteria isolated from patients hospitalized with pneumonia in U.S. medical centers, 2011 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(4). doi: 10.1128/AAC.02083-16
- Shields RK, Nguyen H, Chen L, Press EG, Potoski BA, Marini RV, et al. Ceftazidime-

- avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61 (8): e00883-17. doi: 10.1128/AAC
21. Instituto de Salud Pública. Ficha productos registrados. <https://registrosanitario.ispch.gob.cl/Ficha.aspx?RegistroISP=F-24968/19>
  22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved Standard 33th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA; 2023
  23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard 10th ed. CLSI document M07-A10. Wayne, PA; 2015.
  24. The International Organization for Standardization (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infection agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices-Part 2, Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices (ISO/FDIS 20776:2021). <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/92fc193a-5135-4d74-b3b5-a6962a16e505/en-iso-20776-2-2022>
  25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Development of *in vitro* susceptibility test methods, breakpoints, and quality control parameters. Approved Standard 6th ed. CLSI document M23. 2023. <https://clsi.org/shop/standards/m23/>
  26. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen, GS et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(1): 56-66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4
  27. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European Society of Intensive Care Medicine). *Clin Microbiol Infect* 2022; 28(4): 521-47. doi: 10.1016/j.cmi.2021.11.025
  28. Giacobbe DR, Di Pilato V, Karaiskos I, Giani T, Marchese A, Rossolini GM, et al. Treatment and diagnosis of severe KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a perspective on what has changed over last decades. *Ann Med* 2023; 55(1):101-13. doi: 10.1080/07853890.2022.2152484
  29. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Treatment guidelines for multidrug-resistant Gram-negative microorganisms. *Rev Española Quimioter* 2023; 36: 46-51. doi: 10.37201/req/s01.11.2023
  30. Tumbarello M, Treccarichi EM, Corona A, De Rosa FG, Bassetti M, Mussini C, et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam salvage therapy in patients with infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2019; 68(3): 355-64. doi: 10.1093/cid/ciy492
  31. Ruan Y, Li M, Wang D, Duan J, Zhang H, Zhou Y. Characteristics of non-carbapenemase producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a tertiary hospital in China. *J Infect Dev countries* 2024;18(01):106-15. doi: 10.3855/jidc.17779
  32. Shields RK, Clancy CJ, Pasculle AW, Press EG, Haidar G, Hao B, et al. Verification of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam susceptibility testing methods against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2018; 56(2). doi: 10.1128/JCM.01093-17
  33. Guo Y, Liu N, Lin Z, Ba X, Zhuo C, Li F, et al. Mutations in porin LamB contribute to ceftazidime-avibactam resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 2021; 10(1): 2042-51. doi: 10.1080/22221751.2021.1984182
  34. Zhang Y, Kashikar A, Brown CA, Denys G, Bush K. Unusual *Escherichia coli* PBP 3 insertion sequence identified from a collection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* tested in vitro with a combination of ceftazidime-, ceftaroline-, or aztreonam-avibactam. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(8). doi: 10.1128/AAC.00389-17
  35. Xiong L, Wang X, Wang Y, Yu W, Zhou Y, Chi X, et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. *WIREs Mechanisms Dis* 2022;14(6). doi: 10.1002/wsbm.1571
  36. Tze-Peng L, Jun-Yuan H, Qi-Min TJ, Heng-Chiak Sim J, Si-Hui T, Thuan-Tong T, et al. *In vitro* susceptibility to ceftazidime-avibactam and comparator antimicrobial agents of carbapenem-resistant *Enterobacteriales* isolates. *Microorganisms* 2023; 11(9): 2158. doi: 10.3390/microorganisms11092158
  37. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, et al. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(10): 6605-7. doi: 10.1128/AAC.01165-15
  38. Leber AL, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press; 2016. doi: 10.1128/9781555818814
  39. Kresken M, Körber-Irrgang B. Performance of the etest for susceptibility testing of *Enterobacteriales* (*Enterobacteriaceae*) and *Pseudomonas aeruginosa* toward ceftazidime-avibactam. *J Clin Microbiol* 2018; 56(9). doi: 10.1128/JCM.00528-18
  40. Han R, Shen S, Yin D, Ding L, Shi O, Yang Y, et al. Performance of ceftazidime-avibactam 30/20- $\mu$ g and 10/4- $\mu$ g disks for susceptibility testing of *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr* 2023;11(2). doi: 10.1128/spectrum.02720-22
  41. Zhang J, Li G, Zhang G, Wei Kang, Simeng Duan, Tong Wang, et al. Performance evaluation of the gradient diffusion strip method and disk diffusion method for ceftazidime-avibactam against *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa*: a dual-center study. *Front Microbiol* 2021; 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.710526