

# Determinación e interpretación de la sensibilidad a cefiderocol

Determination and interpretation of cefiderocol susceptibility

Joaquim Ruiz<sup>1, a</sup>, Rocío Egoávil-Espejo<sup>1</sup>, Barbara Ymaña<sup>1</sup>, Rosario Oporto-Llerena<sup>1</sup>, María J. Pons<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Dinámicas y Epidemiología de la Resistencia a Antimicrobianos - "One Health", Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.



**Citar como:** Ruiz J, Egoávil-Espejo R, Ymaña B, Oporto-Llerena R, Pons MJ. Determinación e interpretación de la sensibilidad a cefiderocol. South Health; 2024;1:e008. doi: 10-21142/SH-01-2024-e008.

Fecha de recepción: 29/06/2023

Fecha de aceptación: 15/10/2024

Revisado por pares.



© Los autores, 2024. Publicado por la Universidad Científica del Sur (Lima, Perú)

<sup>a</sup> Corresponding author:

Joaquim Ruiz

Laboratorio de Microbiología Molecular y

Genómica Bacteriana

Universidad Científica del Sur.

Panamericana Sur, Km 19, Lima, Perú

Phone: (511) 610 6400

jruijz.trabajo@gmail.com

jruijb@cientifica.edu.pe

## Resumen

Cefiderocol es un nuevo antibiótico activo frente a bacterias Gram negativas de interés clínico que penetra en las mismas de manera pasiva a través de porinas y de manera activa a través de captadores de hierro. Esta peculiaridad resulta en la necesidad de efectuar pequeñas modificaciones a la hora de efectuar ensayos de concentración mínima inhibitoria. Así, se precisa de un medio de cultivo sin cationes, y la presencia de un crecimiento tenue no se considera a la hora de interpretar los resultados.

**Palabras Clave:** cefiderocol; sensibilidad a antibióticos; concentración mínima inhibitoria

## Abstract

Cefiderocol is a new antibacterial agent active against Gram-negative bacteria of clinical interest. Cefiderocol passively penetrates the bacteria through porins and actively through iron uptake systems. This peculiarity results in the need to perform slight modifications when performing minimal inhibitory concentration assays. Thus, it is needed a cation-free culture media, and a thin grown is unconsidered.

**Keywords:** cefiderocol; antibiotic susceptibility; minimal inhibitory concentration

## Introducción

Uno de los problemas de salud pública de mayor relevancia a nivel mundial es el incremento en los aislamientos de bacterias patógenas resistentes a los tratamientos antimicrobianos (WHO, 2023). El problema se agrava debido a que en las últimas décadas el ritmo de incorporación de nuevos antimicrobianos al mercado ha sido escaso, a que la mayoría de ellos pertenecen a familias de antimicrobianos establecidas, y a que, a menudo, los mecanismos de resistencia son cruzados dentro de una misma familia de antimicrobianos (Ruiz, 2004).

Cefiderocol es un antibiótico cuyo espectro de actividad cubre los principales patógenos Gramnegativos como es el caso de *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* o *Pseudomonadaceae* (Syed, 2021). Cefiderocol ya se ha introducido en la práctica clínica en algunos países, entre ellos EE.UU., donde se ha aprobado para el tratamiento de infecciones urinarias complicadas e infecciones respiratorias adquiridas en el hospital o asociadas a ventiladores, o los pertenecientes a la UE donde se ha autorizado su uso para tratar infecciones por bacterias gramnegativas con limitadas opciones de tratamiento (Kaye *et al.*, 2023; Syed, 2021), si bien aún no en Perú.

Este antibiótico pertenece a la familia de las cefalosporinas, pero posee un doble mecanismo de entrada en la bacteria, dado que accede a la misma tanto por las vías establecidas para esta familia de antimicrobianos (Syed, 2021), como a través de captadores de sideróforos, esto último debido a la presencia de un anillo catecol en posición C3 (Syed, 2021).

No obstante, su capacidad de penetrar a través de captadores de hierro también resulta en problemas a la hora de establecer la actividad antibacteriana *in vitro* (Simner y Patel, 2020). Ello es debido a que los medios de cultivo tradicionales difieren del medio fisiológico en la disponibilidad de hierro. Así, durante una infección, la escasez de hierro libre en el organismo resulta en la expresión de sideróforos y de sistemas de captación de estos por parte de la bacteria (Ganz, 2018; Khasheii *et al.*, 2021), cosa que no es precisa *in vitro* al haber accesibilidad al hierro, por lo que su expresión puede verse disminuida. Así, el uso de medios de cultivos convencionales puede resultar en valores de resistencia erróneos, siendo preciso el uso de medios sin cationes (Simner *et al.*, 2023). Otro problema observado es la presencia de un crecimiento "residual" (denominado "trailing" en la literatura anglosajona) que en ausencia de un criterio claramente establecido puede conducir a interpretaciones dependientes del experimentador (Simner y Patel, 2020; Simner *et al.*, 2023).

## Procedimientos estándar

### Día 1 - Siembra

El día previo al desarrollo del ensayo, se sembrarán las bacterias en medio sólido (no es preciso que sea un medio específico).

### Día 2 - Ensayo

Todo el ensayo debe realizarse en un ambiente estéril (por ejemplo: cabina de flujo), para minimizar el riesgo de contaminación.

Preparación de la bacteria: tras comprobar que los cultivos están puros, se procederá a preparar una dilución bacteriana en agua estéril o PBS (Tampón fosfato salino por sus siglas en inglés) a una concentración McFarland 0,5 (equivalente a  $5 \times 10^8$  UFC/mL). Este preparado, a su vez se diluirá 1:1000 en agua, PBS, o idealmente en el medio a utilizar para el desarrollo del estudio, para llevar la concentración bacteriana a aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

Preparación del antibiótico: El antibiótico se llevará a una concentración equivalente al doble de la máxima concentración mínima inhibitoria (CMI) a considerar ( $2 \times \text{CMI}$ ); por ejemplo: si el valor máximo a evaluar es de 256  $\mu\text{g/mL}$ , el cefiderocol se preparará a 512  $\mu\text{g/mL}$ . Para ello el diluyente ideal es el medio de cultivo a utilizar, aunque se puede realizar en agua estéril.

**Figura 1.** Lectura a OD600 de la concentración mínima inhibitoria de cefiderocol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,037	0,039	0,045	0,040	0,039	0,040	0,050	0,042	0,038	0,044	0,100	0,045
B	0,041	0,043	0,041	0,042	0,041	0,039	0,039	0,042	0,043	0,042	0,283	0,04
C	0,040	0,041	0,046	0,042	0,042	0,041	0,049	0,042	0,042	0,197	0,285	0,043
D	0,041	0,041	0,042	0,042	0,042	0,144	0,042	0,041	0,039	0,242	0,403	0,041
E	0,041	0,041	0,248	0,043	0,042	0,145	0,36	0,175	0,042	0,231	0,456	0,042
F	0,042	0,096	0,243	0,046	0,256	0,241	0,443	0,214	0,144	0,255	0,468	0,278
G	0,049	0,044	0,042	0,045	0,040	0,041	0,042	0,041	0,037	0,037	0,040	0,043
H	0,230	0,134	0,218	0,210	0,257	0,167	0,149	0,132	0,179	0,177	0,135	0,197

Ejemplo de lectura de ensayo de sensibilidad a cefiderocol de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La lectura se efectuó en un lector de ELISA (SYNERGY LX, Biotek, Santa Clara, USA). La lectura se realizó a una absorbancia de OD<sub>600</sub>. El programa de lectura contemplaba una breve agitación previa a la lectura para que toda la materia estuviese en suspensión.

Carril 1 a 11:

Fila A: 2  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila B: 1  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila C: 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila D: 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila E: 0,125  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila F: 0,06  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila G: control de contaminación (sin bacteria, sin antibiótico); fila H: Control de crecimiento (bacteria inoculada en ausencia de antibiótico).

Carril 12

Fila A: 1  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila B: 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila C: 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila D: 0,125  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila E: 0,06  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila F: 0,03  $\mu\text{g/ml}$  de cefiderocol; Fila G: control de contaminación (sin bacteria, sin antibiótico); fila H: Control de crecimiento (bacteria inoculada en ausencia de antibiótico).

Muestras clínicas en los pocillos inoculados (A - F y H) de los carriles 1 a 11; Cepa control (*E. coli* ATCC 25922) en los pocillos inoculados (A - F y H) del carril 12.

Lectura de resultados de concentración mínima inhibitoria (CMI):

Columna 1: CMI  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$   
 Columna 2: CMI = 0,125  $\mu\text{g/ml}$ \*  
 Columna 3: CMI = 0,25  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 4: CMI  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$   
 Columna 5: CMI = 0,125  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 6: CMI = 0,5  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 7: CMI = 0,25  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 8: CMI = 0,25  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 9: CMI = 0,0125  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 10: CMI = 1  $\mu\text{g/ml}$   
 Columna 11: CMI = 2  $\mu\text{g/ml}$ \*  
 Columna 12: CMI = 0,06  $\mu\text{g/ml}$

\* Dado que la CMI esta en el rango 0,09-0110, se considera un resultado dudoso y a repetir.

El medio a utilizar en el ensayo debe ser un medio Mueller Hinton sin cationes, ya sea comercial o preparado en el laboratorio (Hackel *et al.*, 2019; Simner *et al.*, 2023). El ensayo puede realizarse en tubos (macrodilución) o en microplacas de 96 pocillos de fondo redondo o fondo plano (microdilución), por comodidad y ahorro se recomienda el uso de microplacas. El protocolo prosigue en la consideración que se utiliza el método de microdilución.

En la placa de ELISA se considerará un pocillo para control positivo, otro como control negativo y el resto para los ensayos de antibiótico (Figura 1).

Preparación de la microplaca: Se dispondrá un volumen de 100 µL de medio de cultivo en todos los pocillos. Tras ello, en el pocillo en el que se ensaye la máxima concentración de antibiótico, pocillo 1 del esquema, se dispondrán 100 µL de cefiderocol 2xCMI. Seguidamente se mezclará mediante bombeo suave (2 ó 3 veces) con la micropipeta, se descartará la punta y tras poner una nueva, se pasarán 100 µL del pocillo al siguiente pocillo, pocillo 2 del esquema, y así sucesivamente hasta llegar al pocillo correspondiente a la menor concentración considerada (pocillo 6 del esquema). Los 100 µL que se extraerán del último pocillo serán descartados. En este paso, el uso de pipetas multicanal agiliza el trabajo, aunque se recomienda cerciorarse que en todas las puntas utilizadas los volúmenes son equivalentes, pues si alguna punta queda mal fijada el volumen que capta es notoriamente menor, afectando por tanto a las subsiguientes diluciones.

En el método se considera que una desviación del volumen  $\leq 10\%$  no afecta a los resultados del ensayo, por ello, se añadirá un máximo de 10 µl de una suspensión del microorganismo a concentración  $5 \times 10^5$  UFC/mL al pocillo control positivo (control de crecimiento) y a todos los pocillos con antibiótico. Si este paso se efectúa de pocillo con menor cantidad de antibiótico, a pocillo con mayor cantidad de antibiótico, no es preciso cambiar la punta.

Llegados aquí, la placa se cubrirá con su tapa (no usar film), sin sellar, y se incubará por 18-24 h.

Indicar que uno de los pocillos corresponderá a un control de calidad. Las cepas consideradas y los rangos de CMI aceptables están listados en las guías del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) o del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (CLSI, 2024; EUCAST, 2024a). La cepa de control más usual es la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, con un rango de CMIs a cefiderocol de 0,06 µg/ml a 0,5 µg/ml. Ello obliga, en caso de su uso y de seguir el esquema de pocillos propuesto, a considerar una concentración de antibiótico máxima en el pocillo 1 de 1 µg/mL, para poder llegar a una concentración mínima de 0,03 en el pocillo 6, que permita cubrir el rango de aceptabilidad (Figura 1). Reseñar que la obtención de valores de CMI para la cepa control utilizada fuera del rango de validez indicado, denota o un problema en la preparación del ensayo o un problema con la cepa utilizada. En cualquier caso, implicaría la no validez de los resultados.

### Día 3 - Interpretación

Al tercer día, para evitar la citada subjetividad frente a crecimientos leves y difusos, la placa se leerá a OD<sub>600</sub> utilizando para ello un lector de ELISA que disponga de capacidad para agitar las placas previo a lectura, para resuspender las bacterias que se hubieren depositado en el fondo. Se considerará crecimiento bacteriano cuando la OD sea superior a 0,1 (aproximadamente 2,5 veces el valor del control negativo). En el caso que los valores bordeen el punto de corte considerado por cualquiera de sus dos lados ( $0,09 \leq OD_{600} \leq 0,110$ ) se sugiere que se repita el ensayo para mejor determinar la CMI. El valor de CMI será el pocillo con la menor concentración bacteriana en el que la bacteria no haya crecido (Figura 1). Indicar que en las guías oficiales (CLSI, 2024; EUCAST, 2024a; FDA, 2023) están conceptuadas para una inspección visual de los crecimientos. Por ejemplo, EUCAST considera crecimiento residual ("trailing" en terminología inglesa) si el botón de crecimiento en el fondo de la placa es menor de 1 mm, o si la turbidez (por inspección visual) se reduce en  $\geq 80\%$  (EUCAST, 2024b). El uso de un valor de OD sirve para estandarizar de manera interna, en un laboratorio, las lecturas de CMI evitando las subjetividades de los diferentes experimentadores. No obstante, se ha de tener en cuenta que, en ausencia de validaciones, la consideración de 2,5 veces el valor de la lectura del blanco debe considerarse como indicativa y adecuarla a la realidad de cada centro y al acuerdo interno de interpretación visual de que es, y que no es, crecimiento residual.

La interpretación del resultado se hará siguiendo los estándares internacionales del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) o de *US Food and Drug Administration* (FDA) (Tabla 1). Importante, a la hora de reportar los resultados debe indicarse de manera específica la versión de las guías del CLSI, EUCAST o FDA consideradas, pues los puntos de corte de sensibilidad/resistencia pueden modificarse entre diferentes versiones debido a nuevas evidencias.

**Tabla 1.** Punto de corte de patógenos de especial relevancia hospitalaria

Bacteria	CLSI			EUCAST			FDA		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>Acinetobacter baumannii</i>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	NE		NE	$\leq 1$	2	$\geq 4$
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	$\leq 2$	-	$\geq 4$	$\leq 4$	8	$\geq 16$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	$\leq 2$	-	$\geq 4$	$\leq 4$	8	$\geq 16$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	$\leq 2$	-	$\geq 4$	$\leq 1$	2	$\geq 4$
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	$\leq 1$			NE		NE	NE		NE

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, FDA: *US Food and Drug Administration*, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, NE: no establecido.

Puntos de corte extraídos de las ediciones de 2024 de CLSI, EUCAST y de la última actualización de FDA (CLSI, 2024; EUCAST, 2024; FDA, 2023).

### Sugerencias

1 - Dado que a la fecha los porcentajes de resistencia a cefiderocol son bajos, siempre que ello fuere posible, se sugiere efectuar un primer ensayo considerando las concentraciones dentro del rango de sensibilidad, como por ejemplo 0,06 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/ml si estudiásemos *Escherichia coli* y consideramos, por ejemplo, la guía EUCAST (Si se desea se puede iniciar la serie a niveles inferiores a 0,06 µg/mL). En este caso, sólo en aquellos aislamientos capaces de crecer en el pocillo de 2 µg/ml se procedería a evaluar las concentraciones 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL y 128 µg/mL (si se considera se puede estirar la serie hasta el valor máximo que se desee).

2 - En caso de escasez de medio o antibiótico, se pueden reducir los volúmenes en la microplaca hasta un máximo de 50 µL de medio sin cationes en el primer paso, y proporciones equivalentes del resto de material (50 µL de cefiderocol 2xCM1 y 5 µL de suspensión bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL). En este supuesto es importante disponer de un matraz con agua en la incubadora para maximizar la humedad y minimizar la evaporación.

### Financiación

Sin financiación externa.

### Conflictos de interés

Ninguno

### Referencias bibliográficas

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100 - S34. CLSI, Wayne, USA. 2024.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints - bacteria (v 14.0). 2024a [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (acceso el 24 de agosto de 2024).
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST reading guide for broth microdilution. 2024b. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/MIC\\_testing/Reading\\_guide\\_BMD\\_v\\_5.0\\_2024.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/MIC_testing/Reading_guide_BMD_v_5.0_2024.pdf). (acceso el 18 de agosto de 2024).
- Ganz T. Iron and infection. *Int J Hematol*. 2018;107(1):7-15. doi: [10.1007/s12185-017-2366-2](https://doi.org/10.1007/s12185-017-2366-2).
- Hackel MA, Tsuji M, Yamano Y, Echols R, Karlowsky JA, Sahm DF. Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;94(4):321-325. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.003).
- Kaye KS, Naas T, Pogue JM, Rossolini GM. Cefiderocol, a siderophore cephalosporin, as a treatment option for infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacterales*. *Infect Dis Ther*. 2023;12(3):777-806. doi: [10.1007/s40121-023-00773-6](https://doi.org/10.1007/s40121-023-00773-6).
- Khasheii B, Mahmoodi P, Mohammadzadeh A. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol Res*. 2021;250:126790. doi: [10.1016/j.micres.2021.126790](https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126790).
- Ruiz J. Antimicrobians: des d'abans de 1929 fins ara. *Treb Soc Cat Biol*. 2004; 55:7-8.
- Simner PJ, Palavecino EL, Satlin MJ, Mathers AJ, Weinstein MP, Lewis JS 2nd, et al. Potential of inaccurate cefiderocol susceptibility results: a CLSI AST subcommittee advisory. *J Clin Microbiol*. 2023;61(49):e0160022. doi: [10.1128/jcm.01600-22](https://doi.org/10.1128/jcm.01600-22).
- Simner PJ, Patel R. Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing considerations: the achilles' heel of the trojan horse? *J Clin Microbiol*. 2020;59(1):e00951-20. doi: [10.1128/JCM.00951-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00951-20).
- Syed YY. Cefiderocol: a review in serious Gram-negative bacterial infections. *Drugs*. 2021;81(39):1559-1571. doi: [10.1007/s40265-021-01580-4](https://doi.org/10.1007/s40265-021-01580-4).
- US Food and Drug Administration (FDA). Cefiderocol injection. 2023. <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/cefiderocol-injection> (acceso el 24 de agosto de 2024).
- World Health Organization. Antimicrobial resistance. <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-factsheet.pdf>. (acceso el 05 de junio de 2023).