

NOVEDADES 2009
CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)

Alejandra Corso
Servicio Antimicrobianos
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”

Se describe aquí un breve resumen de las novedades mas relevantes publicadas en enero de **2009** en el documento **M100-S19** del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**: **“Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement”**. El documento **M100-S19** provee las tablas de interpretación actualizadas de las pruebas de sensibilidad correspondientes a los documentos **M2-A10**: **“Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard - Tenth Edition”** y **M7-A8**: **“Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard - Eighth Edition”**, ambos publicados en el año **2009**.

ESTE MATERIAL DE NINGUNA MANERA PRETENDE REEMPLAZAR LOS DOCUMENTOS NI TABLAS ORIGINALES PUBLICADOS EN M100-S19.

Se ha indicado el número de Tabla o Apéndice en donde se pueden encontrar las nuevas recomendaciones. Las modificaciones o incorporaciones se han resaltado “entre comillas”.

Algunas de dichas recomendaciones están relacionadas a patógenos con perfiles de resistencia que representan un desafío terapéutico o que muestran dificultades importantes para la detección de algún mecanismo de resistencia. Los puntos en los cuales se han observado los cambios más relevantes de este año son:

- **Estafilococos y cefoxitina**
- **Estafilococos y vancomicina**
- **Estafilococos y mupirocina**
- **Enterobacterias y carbapenemasas**
- **Nuevo formato, Nuevos Apéndices**

1) Uno de los mayores cambios en esta Edición involucra la **fusión de las Tablas de difusión (M2) y de CIM (M7)** en una Tabla combinada que incluye los criterios de interpretación de difusión y CIM. Como resultado, algunos comentarios, que se encontraban listados en las Tablas 2A a 2L fueron reubicados en los apéndices A a F o en los documentos del CLSI- M2- A10 y M7-A8.

2) Otro cambio importante es la reenumeración de las **Tablas de Control de Calidad**. Previamente la información de control de calidad para el método de difusión y para CIM estaba incluida en la serie de las Tablas 3 de difusión y CIM, respectivamente. Actualmente, la información para el **control de calidad** de las pruebas de **difusión** se encuentran en las **Tablas 3A a 3E** y la de **CIM** en las **Tablas 4A a 4F**.

3) **Nueva categoría de interpretación “NO SENSIBLE”**: Introducción de las Tablas 1 y 2.

“Esta categoría se usa para microorganismos que sólo tienen categoría de interpretación sensible, y no se dispone de las categorías intermedio o resistente. La categoría de “sólo sensible” se puede aplicar a nuevos agentes antimicrobianos para los cuales no se han detectado aislamientos resistentes. Los aislamientos con CIMs mayores al punto de corte de sensible, se designan como “no sensibles”. Esta designación no implica necesariamente que exista un mecanismo de resistencia en el microorganismo. La CIM de un aislamiento “no sensible” podría estar dentro de la distribución de CIMs “wild type” de sensibilidad, sin embargo se dispone de una limitada experiencia clínica en ensayos clínicos con estos aislamientos.”

4) ***Staphylococcus* spp. y disco de cefoxitina**: Tabla 2C

Se **eliminó** el criterio de interpretación del **disco de oxacilina** para los **estafilococos coagulasa negativa**, ya que da muchos resultados falsos resistentes con *Staphylococcus* coagulasa negativa distintos de *S. epidermidis*. Para ***Staphylococcus* coagulasa negativa** (excepto *S. lugdunensis*) se prefiere el **disco de cefoxitina** porque es más específico que la CIM a oxacilina. Ambos métodos presentan una sensibilidad equivalente.

“Los resultados de las pruebas de **difusión o CIM de cefoxitina** se pueden usar para predecir la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* en *S. aureus* y *S. lugdunensis*. Para *Staphylococcus coagulasa negativa* (excepto *S. lugdunensis*), el **disco de cefoxitina** es el método de elección para la detección de resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA*. Cefoxitina se usa en reemplazo de oxacilina, informar como sensible o resistente oxacilina basado en los resultados del disco de cefoxitina.”

M100-S19- 2009				
Estafilococos	Método	Sensible	Intermedio	Resistente
coagulasa negativa (no- <i>S. lugdunensis</i>)	CIM -oxacilina	≤ 0.25 µg/ml	--	≥ 0.5 µg/ml
	Disco-cefoxitina	≥ 25 mm	--	≤ 24 mm

M100-S19- 2009				
<i>S. aureus</i>	Método	Sensible	Intermedio	Resistente
	Disco-oxacilina	≥ 13 mm	11-12	≤ 10 mm
<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i>	CIM -oxacilina	≤ 2 µg/ml	--	≥ 4 µg/ml
	Disco-cefoxitina	≥ 22 mm	--	≤ 21 mm
	CIM -cefoxitina	≤ 4 µg/ml	--	≥ 8 µg/ml

5) *Staphylococcus* spp. y disco de vancomicina: Tabla 2C

Se **eliminó** el punto de corte de **difusión para vancomicina y estafilococos**.

“El método de **difusión no es apropiado** para evaluar la sensibilidad a **vancomicina**”.

“Se debería realizar la **CIM a vancomicina** para evaluar la sensibilidad de **todos los aislamientos de estafilococos**. El método de difusión no es apropiado para diferenciar el *S. aureus* sensible de los intermedios a vancomicina. Tampoco es útil para diferenciar los estafilococos coagulasa negativa sensibles, intermedios y resistentes a vancomicina, los cuales dan tamaños de zonas de inhibición similares.”

“El **disco de vancomicina detecta** los aislamientos de *S. aureus* que contienen el gen de resistencia a vancomicina *vanA* (**VRSA**). Estos aislamientos presentan

ausencia de zona inhibición alrededor del disco de vancomicina (zona = **6mm**). Deben confirmarse los aislamientos que no presenten zonas de inhibición. Los aislamientos de estafilococos que den zonas de inhibición de vancomicina ≥ 7 mm, no deben informarse como sensibles sin realizar la **CIM** a vancomicina.”

“Enviar cualquier *S. aureus* que presente una CIM elevada a vancomicina (**CIMs ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$**) a un laboratorio de referencia.”

“Enviar cualquier *Staphylococcus coagulasa negativa* que presente una CIM elevada a vancomicina (**CIMs ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$**) a un laboratorio de referencia.”

M100-S19- 2009				
Difusión VAN		Sensible	Intermedio	Resistente
	<i>S. aureus</i> y <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	--	--	--
CIM VAN				
	<i>S. aureus</i>	≤ 2 $\mu\text{g/ml}$	4-8	≥ 16 $\mu\text{g/ml}$
	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	≤ 4 $\mu\text{g/ml}$	8-16	≥ 32 $\mu\text{g/ml}$

“En los estudios recientes, no se han reevaluado los puntos de corte de difusión para teicoplanina (≤ 10 mm, 11-13 mm, ≥ 14 mm) como se ha hecho con los de vancomicina. Por lo tanto, **se desconoce la habilidad de los puntos de corte de difusión de teicoplanina** para diferenciar estafilococos intermedios (16 $\mu\text{g/ml}$), resistentes (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), y sensibles a teicoplanina (≤ 8 $\mu\text{g/ml}$).”

6) *Staphylococcus aureus* y prueba de “screening de vancomicina”: Apéndice B

En el “Apéndice B: Métodos de screening para el Grupo *S. aureus* ...”, se reemplazó el **nombre** del método de agar screening de VAN (BHI +6 $\mu\text{g/ml}$ VAN) para detección de “sensibilidad reducida a vancomicina” por “**CIM de VAN ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$** ”, debido a la **falta de consistencia** que presenta este screening para detectar *S. aureus* con **CIM de vancomicina de 4 $\mu\text{g/ml}$** .

Por lo tanto, en el Apéndice B de M100-S19: “Métodos de screening para el grupo *S. aureus*: producción de β -lactamasas, resistencia a oxacilina, resistencia a oxacilina

mediada por el gen *mecA* usando cefoxitina, **CIM de VAN ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$** , resistencia inducible a clindamicina y resistencia de alto nivel a mupirocina”, se agrega el siguiente comentario en “pruebas confirmatorias e informe”:

“Realizar la CIM a vancomicina con un método validado a todos los *S. aureus* que crezcan en el agar screening BHI –vancomicina. El método de **agar screening BHI – vancomicina no detecta** apropiadamente todos las cepas de *S. aureus* con **sensibilidad intermedia a vancomicina**. Algunas cepas con CIM de VAN de 4 $\mu\text{g/ml}$ fallaran de crecer”.

En el siguiente cuadro se muestra la habilidad de los distintos métodos propuestos por el CLSI para la detección de distintos niveles de sensibilidad a vancomicina:

CIM VAN ($\mu\text{g/ml}$)	Mecanismo	Método CIM	Método Difusión	Agar screening BHI – VAN 6 $\mu\text{g/ml}$
≤ 2 S	h-VISA	NO	NO	NO
≤ 2 S	VSSA	SI	NO	SI
4 I	VISA	SI	NO	variable
8 I	VISA	SI	NO	SI
16 R	VRSA	SI	NO	SI
≥ 32 R	VRSA	SI	SI	SI

El agar screening BHI –vancomicina no es apropiado para detectar VISA y h-VISA.

Realizando la CIM en cualquiera de sus modalidades (micro y macrodilución en caldo, dilución agar, E-test, métodos automatizados) no se puede diferenciar un h-VISA de la población sensible ya que presentan CIMs de vancomicina de 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$. **Por el momento, la CLSI no provee recomendaciones para la detección de h-VISA.**

7) *Staphylococcus aureus* y prueba de “alto nivel de resistencia a mupirocina”:

Apéndice B

En el Apéndice B de M100-S19: “Métodos de screening para el grupo *S. aureus*: producción de β -lactamasas, resistencia a oxacilina, resistencia a oxacilina

mediada por el gen *mecA* usando cefoxitina, CIM de VAN ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, resistencia inducible a clindamicina y **resistencia de alto nivel a mupirocina**” se incorporan dos métodos de screening para detección de alto nivel de resistencia mupirocina:

Screening de Alto nivel de Resistencia Mupirocina	
Difusión	CIM
Disco de mupirocina de 200 μg	Un solo pocillo de 256 $\mu\text{g/ml}$
Agar MH, 35°C, 24 hs (leer con luz transmitida)	Caldo MH y condiciones estándares
Ausencia de zona de inhibición (6mm): alto nivel de resistencia mupirocina.	Crecimiento: alto nivel de resistencia mupirocina.
Cualquier zona de inhibición ($\geq 7\text{mm}$): ausencia de alto nivel de resistencia mupirocina	Sin crecimiento: ausencia de alto nivel de resistencia mupirocina

“Aunque no formalmente validados en el documento CLSI-M23, algunos estudios han relacionado la falta de respuesta a los regimenes de decolonización con mupirocina en aislamientos con CIMs ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$. Aunque este documento no provee una guía de interpretación de los puntos de corte de mupirocina, los métodos de screening descritos aquí (difusión con disco y una concentración de CIM), identifican los aislamientos con CIMs ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ ”.

“Incubar la difusión por 24hs completas y examinar cuidadosamente con luz transmitida para la visualización de un crecimiento débil dentro de la zona de inhibición.”

La mupirocina es un antibiótico de uso tópico, que se usa para decolonización nasal de *S. aureus* y para el tratamiento local de algunas infecciones de piel como p. ej. impétigo. Por lo tanto, “No es necesario realizar de rutina la evaluación del nivel de resistencia a mupirocina, evaluar sólo cuando el cuerpo medico lo solicita”.

Sólo para recordar los casos particulares donde la **lectura del antibiograma** se hace con **luz transmitida**:

1) *Staphylococcus* spp. (Tabla 2C): oxacilina, vancomicina, linezolid y mupirocina.

2) *Enterococcus* spp. (Tabla 2D): vancomicina.

8) *Streptococcus* spp.: Tabla 1A y 2H-2

S. pneumoniae: Tabla 1A

“Los aislamientos de *S. pneumoniae* sensibles a levofloxacina son predeciblemente sensibles a gemifloxacina y moxifloxacina. Sin embargo, no se puede asumir que los *S. pneumoniae* sensibles a gemifloxacina o moxifloxacina sean sensibles a levofloxacina.”

- *Streptococcus* spp. grupo Viridans: Tabla 2 H-2

“El método de difusión no es apropiado para evaluar penicilina y ampicilina”.

9) Métodos de screening y confirmatorios de carbapenemasas en Enterobacterias:

Tabla 2A y Apéndice G

En M100-S19 se incorporan dos **métodos de screening** y uno **confirmatorio** para la detección de **carbapenemasas en Enterobacterias**.

Es importante resaltar que la metodología propuesta por CLSI responde a la epidemiología del país de origen. Los métodos sugeridos por CLSI tienen una utilidad muy limitada en países con resistencia a carbapenemes de naturaleza distinta de carbapenemasas (como por ejemplo CTX-M + impermeabilidad). Por ello y en base a la epidemiología de Argentina, nuestro laboratorio, propone una metodología más sensible y específica para la búsqueda de carbapenemasas basados en un tamizaje inicial con el disco de imipenem utilizando un punto de corte poblacional, seguido de confirmación por el método de sinergias con EDTA/SMA y Acido borónico (ver ANEXO 1, página 141). A diferencia de lo recomendado por CLSI, el método propuesto por el INEI contempla no solo la detección de MBL y KPC, sino también otras carbapenemasas que no se acompañan de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, como por ejemplo Sme e Imi/NMC-A. La CLSI no propone en sus recomendaciones la utilización de los discos de quelantes de zinc (ej.: EDTA/SMA) para la detección de MBL, ni de discos de Ácido borónico para la búsqueda de AMPc plasmídico (en cepas sin resistencia natural por AMPc) y carbapenemasas del grupo 2F (KPC, Sme, Imi/NMC-A).

El método de Hodge modificado propuesto por CLSI como técnica confirmatoria de carbapenemasas, es un método sensible pero puede presentar resultados falsos positivos sobre los carbapenemes frente a cepas productoras de BLEE tipo CTX-M.

Los criterios de informe sugeridos por el INEI para las distintas carbapenemasas son los siguientes:

Sme/NMC: no se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (1ª y 2ª generación) y carbapenemes independientemente de la sensibilidad *in vitro*. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amoxicilina/clavulánico, piperacilina-tazobactama, cefalosporinas de 3ª y 4ª gen. y monobactames (demostrar ausencia de BLEE asociada) y agentes no beta-lactámicos.

KPC: no se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenemes independientemente de la sensibilidad *in vitro*. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): amox./clavulánico, piperacilina-tazobactam y agentes no beta-lactámicos.

MBL: no se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones) y carbapenemes independientemente de la sensibilidad *in vitro*. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): monobactames, piperacilina-tazobactam y agentes no beta-lactámicos.

Para todas las carbapenemasas, se recomienda aislamiento de paciente.

CLSI M100-S19: “Las enterobacterias con resistencia a una o múltiples cefalosporinas de la subclase III (p. ej. cefotaxima, ceftacidima y/o ceftriaxona) y que presentan CIMs elevadas o zonas de inhibición reducidas a los carbapenemes podrían ser productoras de carbapenemasas, a pesar del hecho que las CIMs o zonas de inhibición se encuentren dentro de la actual categoría de sensibilidad.”

“El Apéndice G describe los métodos screening usando los puntos de corte de CIM o zona de diámetro de inhibición y un test confirmatorio, el método de Hodge modificado, el cual ha mostrado poseer una sensibilidad y especificidad superior al 90% para la detección de la producción de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*. Lo géneros *Proteus* spp, *Providencia* spp y *Morganella* spp podrían tener CIMs elevadas a imipenem por otros mecanismos distintos a carbapenemasas; por lo tanto, no se ha establecido la utilidad de la CIM de imipenem como método de screening para la detección de carbapenemasas en estos 3 géneros.”

“No se ha establecido aún la eficacia clínica de los carbapenemes para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de

carbapenemasas que resulten sensibles usando los puntos de corte de sensibilidad establecidos. Para aislamientos con producción de carbapenemasa confirmada, se deberían determinar e informar los valores de CIM de los carbapenemes pero sin interpretación. Se debe informar al cuerpo médico y al comité control de infecciones sobre la presencia de este mecanismo y se debería considerar la utilización de antibióticos alternativos.”

“No es necesario evaluar la presencia de carbapenemasas por el método de Hodge modificado cuando todos los carbapenemes dan resultados de intermedio o resistente (estos resultados deberían informarse como dan). Sin embargo, el método de Hodge modificado podría ser de utilidad en este caso para el control de infecciones o con propósito epidemiológico.”

Métodos de screening de carbapenemasas: ver interpretación Apéndice G

- a) Método de difusión con discos de Ertapenem 10 µg o Meropenem 10 µg
- b) Dilución en caldo Ertapenem 1 µg/ml, Imipenem 1 µg/ml o Meropenem 1 µg/ml.

Método de Hodge modificado: método fenotípico confirmatorio de carbapenemasas:

- Cuando hacer el método de Hodge: cuando de positivo un método de screening y resistencia a una o más cefalosporinas de tercera generación.

(1) Preparar una suspensión 0.5 de Mc. Farland estándar de *E. coli* ATCC 25922 (organismo indicador). La suspensión estándar se puede realizar usando suspensión directa de colonias o el método de crecimiento previo. Diluir el estándar en caldo o solución salina 1:10. Inocular en una placa de agar MH como si fuera el método de difusión de rutina. Dejar secar la placa entre 3 y 10 minutos. Colocar un disco de ertapenem o meropenem como muestra la Figura 1 (ANEXO 2, Fig. 1 y 2, pag 142).

(2) Usando un ansa de 10 µl o hisopo, tomar de 3 a 5 colonias del organismo a evaluar de una placa de agar sangre e inocular una línea derecha desde el disco hacia el borde de la placa. La línea debe tener al menos entre 20 y 25 mm de longitud.

Usar las cepas recomendadas para el control de calidad del método de Hodge:

K. pneumoniae ATCC BAA-1705: cepa productora de KPC, test de Hodge positivo.

K. pneumoniae ATCC BAA-1706: cepa resistente a carbapenemes por un mecanismo distinto a carbapenemasas, test de Hodge negativo.

(3) Incubar por 16 a 20 hs a 35°C en ambiente de aire.

(4) Examinar en la placa de MH el crecimiento del *E. coli* ATCC 25922 en la zona de intersección con la estría del organismo en estudio.

Test positivo para la producción de carbapenemasas = crecimiento exaltado en la zona intersección (distorsión de la circunferencia de la zona de inhibición de la cepa indicadora).

Test negativo para la producción de carbapenemasas = ausencia de crecimiento exaltado en la zona intersección.

“Algunas cepas pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Cuando esto ocurre, se verá un área clara o de ausencia de crecimiento alrededor de la estría de la cepa a evaluar (ANEXO 2, Fig. 3, pag 142). En estos aislamientos el test de Hodge no se puede interpretar ya que el resultado es indeterminado”.

“A los aislamientos con screening de meropenem o ertapenem positivo Y test de Hodge positivo, realizar la CIM antes de informar el resultado de los carbapenemes.”

“Para aislamientos con el test de Hodge positivo pero sensibles a los carbapenemes, informar la CIM de los carbapenemes sin la interpretación con el siguiente comentario: “Este aislamiento presenta carbapenemasa. No se ha establecido la eficacia clínica de los carbapenemes en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* que dan sensibles a los carbapenemes, pero que producen carbapenemasas *in vitro*.”

“Si el test de Hodge modificado da un resultado negativo, interprete la CIM de los carbapenemes usando el criterio de CLSI vigente”.

“Los métodos propuestos de screening y confirmatorios de carbapenemasas fueron evaluados ampliamente en aislamientos de *Enterobacteriaceae* de US y son altamente sensibles (> 90%) y específicos (> 90%) para detectar carbapenemasas del tipo KPC. Se desconoce la sensibilidad y especificidad de estos test para detectar la producción de metalo-β-lactamasas de bajo nivel.”

“No se dispone de datos sobre la utilidad de estos tests para la detección de producción de carbapenemasas en bacilos gran negativos no fermentados.”

9) Incorporación de cepas para el Control de Calidad de los nuevos métodos de “screening”

- Cepas de QC del Método de Hodge modificado: Apéndice G

K. pneumoniae ATCC BAA-1705: cepa productora de KPC, test de Hodge positivo.

K. pneumoniae ATCC BAA-1706: cepa resistente a carbapenemes por un mecanismo distinto a carbapenemasas, test de Hodge negativo.

- Cepas de QC alto nivel de resistencia a mupirocina: Apéndice B

a) Método de Difusión:

S. aureus ATCC 25923: sensible a mupirocina, *mupA* negativo

S. aureus ATCC BAA-1708: alto nivel de resistencia a mupirocina, *mupA* positivo

b) CIM (una dilución):

S. aureus ATCC 29213: sensible a mupirocina, *mupA* negativo

E. faecalis ATCC 29212: sensible a mupirocina, *mupA* negativo

S. aureus ATCC BAA-1708: alto nivel de resistencia a mupirocina, *mupA* positivo

10) Nuevos Apéndices:

En M100-S19, se incluyen los **Apéndices F y G** a los cinco incorporados en el 2008: A, B, C, D y E con información pre-existente condensada en formato de Tablas.

Apéndice A: Métodos confirmatorios y de screening para detección de β -lactamasas de espectro extendido en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis*.

Apéndice B: Métodos de screening para *S. aureus* y *S. lugdunensis*: producción de β -lactamasas, resistencia a oxacilina, resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* usando cefoxitina, CIM de VAN ≥ 8 μ g/ml, resistencia inducible a clindamicina y resistencia de alto nivel a mupirocina”.

Apéndice C: Métodos de screening para *Staphylococcus* coagulasa-negativa (excepto *S. lugdunensis*): producción de β -lactamasas, resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* usando cefoxitina y resistencia inducible a clindamicina.

Apéndice D: Método de screening para detección de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos y resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp.

Apéndice E: Sugerencias para la verificación de resultados de las pruebas de sensibilidad y confirmación de la identificación de los organismos.

Apéndice F: Cepas para el Control de Calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. (Ver Pag. 143 y 144)

Apéndice G: Métodos de screening y confirmatorios para *Enterobacteriaceae* con sospecha de carbapenemasas.

ANEXO 1.

**XI CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA
2007. ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA**

Código de Trabajo 20836 -		
Título y Autores		
DETECCION DE CARBAPENEMASAS DEL GRUPO 2F: USOS ADICIONALES Y PROMETEDORES DEL DISCO DE BORONICO		
PASTERAN, F; GUERRIERO, L; RAPOPORT, M; OTAEGUI, L; GALAS, M		
Datos Secundarios		
<i>UNIDAD TEMATICA</i>	Microbiología Clínica: Antimicrobianos	
<i>E-mail del expositor</i>	fpasteran@anlis.gov.ar	
<i>Institución</i>	SERVICIO ANTIMICROBIANOS, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr C. Malbran	
Texto Libre		
<p>Desde 1997, 256 enterobacterias (ENT) con resistencia (R) o sensibilidad disminuida (Sd) a los carbapenemes fueron derivadas al INEI para su caracterización. Sin embargo, solo un número reducido demostró, por técnicas referenciales, la presencia de carbapenemasas (Carbasas). Todas ellas correspondieron al grupo 2f (GES, Sme, KPC). Su detección temprana permite orientar un correcto tratamiento antimicrobiano y evitar la diseminación. Por otro lado, derivados del ac. borónico, como 3-aminofenil-borónico (APB, 300mg/disco), fueron inicialmente desarrollados como inhibidores de beta-lactamasa AmpC. Objetivo: analizar distintas técnicas fenotípicas de fácil realización para la detección de Carbasas 2f en ENT.</p> <p>Se analizó un panel seleccionado de ENT productoras de carbasas 2f y un grupo control con distintos mecanismos de R caracterizados por IEF/PCR (beta-lactamasas/n): <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922, salvaje/1; CTXM-2/1); <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603, SHV-18/1; CMY/1; CTXM-2/3; CTXM-2+PER/1; VIM/2; KPC+PER/1); <i>Salmonella</i> spp. (salvaje/1; KPC/2; GES-3/1); <i>Serratia marcescens</i> (salvaje/1; Sme/5; Sme+CTXM-2/2; CTXM-2/2); <i>Citrobacter freundii</i> (salvaje/1; KPC+ampC derrepemido/1); <i>Enterobacter</i> spp. (salvaje/1; ampC derrepemido/1; GES-3/1); <i>Morganella</i> spp. (salvaje/1; ampC derrepemido/1); <i>Proteus</i> spp. (CMY/1); <i>Shigella</i> spp. (CMY/1). Se evaluó la sensibilidad a carbapenemes por el método de difusión (CLSI, triplicados): se definió Sd a imipenem (IMP) a halo ≤ 21 mm, excepto <i>Salmonella</i> que se consideró $\text{IMP} \leq 24$ mm. El panel fue sometido a sinergias (difusión, triplicados): APB-IMP y amoxicilina/clavulánico (AMC)-IMP. Los discos fueron colocados a una distancia igual a la suma de los radios de las zonas de inhibición (previamente obtenidas) más 5 mm. Se evaluó el desempeño del método de Masuda (extracción por zirconio). Resultados:</p>		
Tabla		
% de resultados positivos de los sigs. métodos	Grupo Carbasas 2f (n=13)	Grupo Control (n=22)
R a Ertapenem (≤ 15 mm)	15%	41%
Sd a IMP	100%	36%
Sinergia AMC-IMP	85%	9%
Sinergia APB-IMP	100%	9%
Masuda (IMP)	100%	36%
Conclusiones		
APB presentó excelente desempeño para detectar Carbasas del grupo 2f, convirtiéndose en una poderosa herramienta diagnóstica. El presente trabajo propone la necesidad de optimizar los métodos confirmatorios mediante la colocación estratégica de discos de APB próximos al de IMP en cepas con documentada Sd al IMP.		

ANEXO 2:
Apéndice G: Método Hodge modificado -CLSI 2009

E. coli ATCC 25922
(cepa indicadora)

Zona de inhibición de ERT
en *E. coli* ATCC 25922

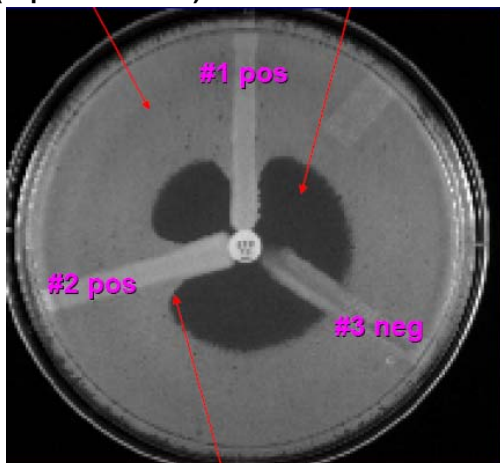


Fig. 1: Método Hodge en placa 100mm

#1: Cepa clínica, resultado positivo
#2: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, control positivo
#3: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, control negativo

Crecimiento exaltado de *E. coli* ATCC 25922

La carbapenemasa inactiva el ERT que difunde en el medio. Por lo tanto, no hay suficiente ERT para inhibir a la cepa indicadora y se produce la deformación de la zona de inhibición.

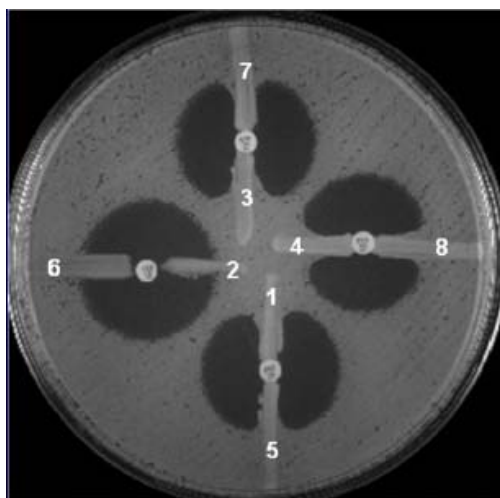
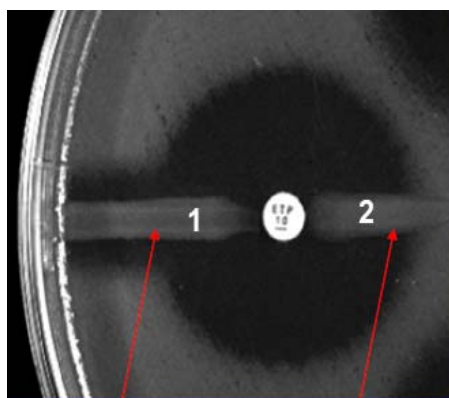


Fig. 2: Método Hodge en placa 150mm

#1: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, control positivo
#2: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, control negativo
#3, 4, 5, 7, 8: Cepas clínicas, resultado positivo
#6: Cepa clínica, resultado negativo

Fig. 3: Ejemplo de un resultado indeterminado del Método Hodge



Cepa clínica con resultado indeterminado Cepa clínica con resultado negativo

Apéndice F, CLSI-2009: Cepas para el Control de Calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Cepa de Control de Calidad	Características del organismo	Pruebas de Difusión	Pruebas de Dilución	Pruebas de Screening	Otros
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC ® 29212			-gram positivos no fastidiosos.	Screening en agar para vancomicina y alto nivel de resistencia a aminogluco-sidos.	Evalúa la aptitud del medio de cultivo para realizar la CIM a sulfonamidas y trimetoprima
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC ® 51299	Resistente a vancomicina (<i>VanB</i>) y resistencia de alto nivel a aminogluco-sidos.			Screening en agar para vancomicina y alto nivel de resistencia a aminogluco-sidos.	
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 25922	β-lactamasa negativo.	gram negativos no fastidiosos. <i>N. meningitidis</i> .	-gram negativos no fastidiosos. <i>-N. meningitidis</i> <i>-Agentes potenciales de bioterrorismo.</i>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC ® 35218	Posee un plásmido que codifica para β-lactamasa TEM-1(no BLEE).	Combinacion β-lactámicos /inhibidor de β-lactamasa.	Combinacion β-lactámicos /inhibidor de β-lactamasa.		
<i>H. influenzae</i> ATCC ® 49247	BLNAR (resistente a ampicilina, β-lactamasa negativo).	<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Haemophilus</i> spp.		
<i>H. influenzae</i> ATCC ® 49766	Sensible a ampicilina.	<i>Haemophilus</i> spp (mayor reproducibilidad con ciertos β-lactámicos.)	<i>Haemophilus</i> spp (mayor reproducibilidad con ciertos β-lactámicos).		
<i>H. pylori</i> ATCC ® 43504			<i>Helicobacter pylori</i> .		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC ® 700603	Productor de BLEE, SHV-18.	Screening de BLEE y pruebas confirmatorias.	Screening de BLEE y pruebas confirmatorias.		
<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC ® 49226	CMRNG, resistencia cromosómica a penicilina.	<i>N. gonorrhoeae</i> .	<i>N. gonorrhoeae</i> .		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC ® 27853	Posee β-lactamasa AmpC Inducible.	gram negativos no fastidiosos.	gram negativos no fastidiosos. Agentes potenciales de bioterrorismo.		Se ensaya frente a gentamicina para determinar si es correcto el contenido de cationes de cada lote de MH.
<i>S.aureus</i> ATCC ® 25923	β-lactamasa negativo. <i>mecA</i> negativo. Tiene poco valor en los ensayos de dilución porque es muy sensible a la mayoría de drogas.	gram positivos no fastidiosos.			

Apéndice F, CLSI-2009 (CONTINUACION): Cepas para el Control de Calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Cepa de Control de Calidad	Características del organismo	Pruebas de Difusión	Pruebas de Dilución	Pruebas de Screening	Otros
<i>S.aureus</i> ATCC ® 29213	Productora de una β -lactamasa débil. <i>mecA</i> negativo.		gram positivos no fastidiosos. Agentes potenciales de bioterrorismo.	Screening en agar para oxacilina.	Determina si es correcto el contenido de cationes de cada lote de MH para ensayar daptomicina.
<i>S.aureus</i> ATCC ® 43300	Resistente a oxacilina. <i>mecA</i> positivo.	Ensayo del disco de cefoxitina	Ensayo del disco de cefoxitina .	Screening en agar para oxacilina.	
<i>S.aureus</i> ATCC ® BAA-1708	Alto nivel de resistencia a mupirocina por el gen <i>mupA</i>	Prueba de screening de resistencia de alto nivel a mupirocina	Prueba de screening de resistencia de alto nivel a mupirocina		
<i>S.pneumoniae</i> ATCC ® 49619	Intermedio a penicilina por alteración de PBP.	<i>S.pneumoniae</i> . <i>Streptococcus</i> spp. <i>N. meningitidis</i> .	<i>S.pneumoniae</i> . <i>Streptococcus</i> spp. <i>N. meningitidis</i> . Agentes potenciales de bioterrorismo.		
Cepas Suplementarias					
<i>E. faecalis</i> ATCC ® 33186					Alternativa a <i>E. faecalis</i> ATCC ® 29212 para ensayar la aptitud del medio para CIM de sulfonamidas o trimetoprima. ^d
<i>H.influenzae</i> ATCC ® 10211					Ensayo capacidad para crecimiento de cada lote de HTM.
<i>K.pneumoniae</i> ATCC ® BAA-1705	Cepa productora de KPC. Prueba de Hodge modificada, positiva.	Confirmación fenotípica de producción de carbapenemasa (prueba de Hodge modificada)			
<i>K.pneumoniae</i> ATCC ® BAA-1706	Resistente a carbapenemes por mecanismos distintos a carbapenemasa. Prueba de Hodge modificada, negativa.	Confirmación fenotípica de producción de carbapenemasa (prueba de Hodge modificada)			
<i>S.aureus</i> ATCC ® BAA-976	Resistente a macrólidos solo por <i>msrA</i> .	Prueba de aproximación de discos de eritromicina y clindamicina (D-test negativo)	Control de calidad. Ver M100 Apéndice B.		
<i>S.aureus</i> ATCC ® BAA-977	Resistencia inducible a macrólidos mediada por <i>ermA</i> .	Prueba de aproximación de discos de eritromicina y clindamicina (D-test positivo)	Control de calidad de rutina para probar resistencia inducible a clindamicina por el método de CIM.Ver M100 Apéndice B		