

NOVEDADES 2015

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)

Melina Rapoport

Servicio Antimicrobianos

Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”

Se describe aquí un breve resumen de las novedades más relevantes publicadas en enero de **2015** en el documento **M100-S25** del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**: **“Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement”**. El documento **M100-S25** provee las tablas de interpretación actualizadas de las pruebas de sensibilidad correspondientes a los documentos **M2-A12**: **“Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard - Twelfth Edition”** y **M7-A10**: **“Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition”**. **Los documentos M2-A12 y M7-A10 fueron actualizados en 2015.**

ESTE MATERIAL DE NINGUNA MANERA PRETENDE REEMPLAZAR LOS DOCUMENTOS NI TABLAS ORIGINALES PUBLICADOS EN M100-S25.

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. Se han agregado notas particulares en algunos puntos, con aclaraciones y recomendaciones del Laboratorio Nacional de Referencia (**“Nota del LNR”**).

En este documento se incluyeron “Novedades” relevantes en:

- Incorporación del concepto de “Punto de corte Epidemiológico” (Epidemiological cutoff value - ECV) para *Propionibacterium acnes* vs vancomicina; Punto de corte de azitromicina para *Salmonella Typhi*; Punto de corte de pefloxacina, como subrogante de ciprofloxacina, para *Salmonella* spp.;

Incorporación del método Carba NP para detección de carbapenemasas en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

1.- Punto de corte Epidemiológico (Tabla 2J-2 y Apéndice G).

- Se introdujo el concepto de “**Punto de corte Epidemiológico**” (Epidemiological cutoff value – **ECV**) para una combinación específica organismo/antimicrobiano. El concepto de “Punto de corte” (PC) y de ECV son diferentes. Los PC se establecen utilizando las distribuciones de CIM, los datos farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD), y los datos de evolución clínica (como se describe en el documento M23 del CLSI). Teniendo en cuenta que los PC se basan en abundantes bases de datos farmacológicas y clínicas, se considera que son predictores robustos de los resultados clínicos. Por el contrario, los ECV son valores de CIM que separan las poblaciones bacterianas en aquellas sin (salvajes) y con (no salvajes) mecanismos de resistencia y/o mutaciones adquiridos, basados en fenotipos (CIMs). Por lo tanto, los ECV se basan en información *in vitro* únicamente.

Los ECVs se utilizan principalmente para señalar la emergencia o la evolución de cepas no salvajes. Los ECVs NO son PC clínicos, y por lo tanto la relevancia clínica de éstos no ha sido identificada o aprobada por el CLSI u otra agencia regulatoria.

En M100-S25, se incorporó el concepto de ECV solo para la combinación: *Propionibacterium acnes* vs vancomicina (Tabla 2J-2)

2.- Azitromicina (Enterobacterias - Tabla 2A)

Se incorporó la interpretación para las pruebas de sensibilidad de azitromicina vs **Salmonella Typhi**

	Difusión (mm)			CIM (µg/ml)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	resistente
Azitromicina (15µg)	≥13	-	≤12	≤16	-	≥32

Nota del LNR: AZI se comenzó a utilizar a nivel mundial como alternativa de tratamiento de las infecciones extraintestinales por *Salmonella* spp., por lo tanto se podría extender esta prueba para todas las serovariedades de *Salmonella*.

3.- Pefloxacina (Enterobacterias - Tabla 2A)

Se incorporó punto de corte para las pruebas de sensibilidad por difusión de **pefloxacina** vs *Salmonella* spp. (Tabla 2A). Este ensayo debe utilizarse como prueba de tamizaje subrogante para la detección de no sensibilidad a ciprofloxacina.

El CLSI indica en los comentarios de la Tabla 2A que: “si no es posible realizar CIM de ciprofloxacina, levofloxacina u ofloxacina, entonces el disco de pefloxacina puede ser utilizado como prueba subrogante. Si este disco no estuviera disponible, se puede utilizar el disco de ciprofloxacina y ácido nalidíxico”. Es importante aclarar que “ninguna de estas pruebas por si solas son suficientes para detectar todos los mecanismos posibles de resistencia a fluorquinolonas que están descriptos hasta la fecha en *Salmonella* spp.”

	Difusión (mm)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Pefloxacina (5µg)	≥24	-	≤23

Nota del LNR: En el país se continúan usando los discos de **ácido nalidíxico y ciprofloxacina** para evaluar la sensibilidad reducida a FQ. En estudios publicados se ha demostrado que pefloxacina no es superior a la combinación NAL+CIP para la detección de mecanismos transferibles de resistencia a FQ. Los laboratorios participantes de la Red WHONET-Argentina están realizando durante el año 2015, la prueba simultanea de los discos de NAL, CIP y PEF para evaluar la utilidad de PEF como marcador de la presencia de mecanismos de resistencia a FQ.

4.- Control de calidad de los discos de Oxacilina (*Streptococcus pneumoniae* - Tabla 2G)

Para las pruebas de difusión de oxacilina vs *Streptococcus pneumoniae*, la mejor forma de controlar el deterioro de los discos de oxacilina es utilizar el *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 en agar Mueller-Hinton sin suplementar. El rango aceptable es 18-24mm.

5.- Pruebas de tamizaje y pruebas confirmatorias para carbapenemasas (Tabla 3B y 3C)

En esta edición del CLSI se incorporó una nueva metodología para la búsqueda de carbapenemasas en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.: el **Carba NP** (método colorimétrico rápido)

Introducción a las Tablas 3B y 3C:

Los procedimientos de control de infecciones y/o las investigaciones epidemiológicas pueden requerir la identificación de aislamientos de Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. productores de carbapenemasa. Estas metodologías no están recomendadas por el CLSI para su uso de rutina.

***Nota del LNR 5.0:** debido a la creciente prevalencia de cepas productoras de carbapenemasas en Argentina, es recomendación del LNR que se incluyan pruebas de tamizaje y confirmación de estos microorganismos en la rutina y práctica diaria del laboratorio de microbiología, con el objeto de orientar el tratamiento antimicrobiano definitivo de manera precoz.*

Las enterobacterias productoras de carbapenemasa generalmente resultan Intermedias o Resistentes a uno o mas carbapenemes, utilizando los puntos de corte actuales, (nota: la no sensibilidad a Ertapenem es el indicador mas sensible de producción de carbapenemasa), y usualmente son resistentes a una o mas cefalosporinas de tercera generación (ej: cefoperazona, cefotaxima, ceftacidima, ceftizoxima y ceftriaxona); Sin embargo, algunos aislamientos que producen carbapenemasa del tipo SME o IMI/NMC-A son usualmente sensibles a estas cefalosporinas.

Pruebas realizadas con fines epidemiológicos y/o control de infecciones:

	Hodge Modificado (MHT)	Carba NP	Otros (ej: ensayos moleculares)
Organismo	Enterobacterias no sensibles a uno o mas carbapenemes Ver Nota 5.1	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> , y <i>Acinetobacter</i> spp. no sensibles a uno o mas carbapenemes Ver Nota 5.1	Enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter</i> spp. no sensibles a uno o mas carbapenemes para determinar la presencia de carbapenemasa, o para determinar el tipo de carbapenemasa en cepas con MHT y/o Carba NP positivos.
Fortalezas	- Simple de realizar. - No necesita reactivos o medios de cultivo especiales.	Rápido	Determina el tipo de carbapenemasa, además de determinar presencia o ausencia.
Limitaciones	- Puede haber falsos positivos en aislamientos que producen BLEE o AmpC junto con impermeabilidad. - Ocasionalmente puede haber falsos negativos, por ej. aislamientos productores de carbapenemasa tipo NDM. - Solo sirve para enterobacterias. Ver Nota 6.1	- Se necesitan reactivos especiales, algunos de los cuales deben ser preparados en forma casera y suelen tener una vida útil corta. - Puede haber resultados inválidos con algunos aislamientos. Ciertas carbapenemasas (ej. enzimas tipo OXA, enzimas cromosómicas) no son consistentemente detectadas.	- Se necesitan reactivos especiales. - Es específico de genes puntuales; puede haber resultados falsos negativos si no se buscan genes específicos de carbapenemasas conocidas.

Notas del LNR 5.1- En Argentina la búsqueda de carbapenemasas se realiza de rutina a TODOS los aislamientos de BGN con señales de alerta para estos mecanismos (por ej: Enterobacterias con halos de IMP \leq 22mm, ERT I/R, etc). Ver Algoritmo actualizado para búsqueda de carbapenemasas en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. en:

<http://antimicrobianos.com.ar/category/algoritmo/>

Nota del LNR 5.2- Las referencias a las acciones que deberían ser realizadas por laboratorios que emplearen estándares del CLSI de ediciones previas a Junio de 2010 (M-100-S-20 y precedentes) no fueron incluidas en este resumen debido a que

en Argentina se utilizan rigurosamente los estándares del CLSI correspondiente al año en curso.

6.- El método de Hodge modificado - MHT (Tabla 3B)

En esta edición del CLSI no aparece ninguna modificación respecto a la metodología de realización del MHT. Solo hay una aclaración respecto al informe de resultados: Cuando un aislamiento tiene un ensayo de MHT positivo se lo considera como “positivo para producción de carbapenemasa”, sin embargo el CLSI recomienda que no hay que modificar la interpretación de las pruebas de sensibilidad a carbapenemes, aun teniendo un MHT positivo; es decir que el valor de CIM se debería interpretar de acuerdo a los puntos de corte actuales.

***Nota del LNR 6.1:** En Argentina, así como en el resto de los países de la región se ha acordado que frente al hallazgo y confirmación de la presencia de carbapenemasa, ésta debe ser reportada al cuerpo medico. Se ha sugerido reportar los carbapenemes en concordancia con los lineamientos propuestos en publicaciones internacionales para los regímenes de tratamiento combinados en base a la CIM de MER y la sensibilidad a un segundo o tercer antibiótico alternativo (1.Tumbarello M., CID, 2012; 2.Daikos GM., CMI, 2011; 3.Qureshi Z., AAC, 2012; 4. Tzouveleki LS, CMI 2014). Ver detalles para reporte de carbapenemasas en <http://antimicrobianos.com.ar/2014/04/anexo-pcc-reporte-de-carbapenemes/>*

***Nota del LNR 6.2:** El método de Hodge por si solo NO es suficiente para determinar la presencia de carbapenemasa. En cepas productoras de BLEE y/o AmpC con déficit de permeabilidad se pueden obtener resultados de MHT positivos. En esos casos la presencia de carbapenemasa deberá ser confirmada con otra metodología. El LNR ha estandarizado el método de Hodge modificado - MHT para ser utilizado también en *P. aeruginosa*, utilizando como cepa reveladora *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (Pasteran F. y col. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(12):4301. Sensitive and Specific Modified Hodge test for KPC and Metallo- β -lactamase Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Novel Indicator Strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603).*

7.- El método Carba NP (tabla 3C)

El método Carba NP, es una prueba colorimétrica confirmatoria de la producción de carbapenemasa en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. En la Tabla 3C encontrarán que el CLSI establece que: “Esta metodología debe utilizarse con fines epidemiológicos y/o de control de infecciones. No se recomienda su realización de rutina. No sería necesario modificar la interpretación de los resultados de sensibilidad de los carbapenemes si el Carba NP diese resultado positivo.”

Nota del LNR: aplican los comentarios 5.0, 5.1 y 6.1

A continuación se detalla la metodología para realizar el Carba NP:

* Reactivos y Materiales:

- Agua destilada
- Imipenem droga estandar de referencia
- Buffer de extracción de proteínas Tris HCl pH 7.4 (disponible comercialmente)
- Sulfato de Zinc heptahidratado
- Rojo fenol en polvo
- Solución de NaOH 1N
- Solución de HCl 10%
- Tubos para micro-centrífuga de 1.5ml
- Ansas de 1µl

Utilizar los reactivos antes mencionados para preparar las siguientes soluciones (ver preparación abajo):

- 10mM sulfato de zinc heptahidratado
- Rojo fenol 0.5%
- NaOH 0.1N
- Carba NP Solución A
- Carba NP solución B (Sol. A + imipenem)

*Preparación de soluciones:

- Solución 10mM sulfato de zinc heptahidratado: Pesar 1.4g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Agregar a 500ml de agua destilada. Mezclar. Conservar a temperatura ambiente. Vencimiento: 1 año.
- Solución Rojo fenol 0.5%: Pesar 1.25g rojo fenol. Agregar a 250ml de agua destilada. Mezclar. Conservar a temperatura ambiente. Vencimiento: 1 año. Esta solución debe mezclarse bien antes de usarse.
- Solución NaOH 0.1 N: Agregar 20ml de NaOH 1N a 180ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente. Vencimiento: 1 año.
- Carba NP solución A: en un vaso de precipitados de 25-50ml, con 16.6ml de agua destilada, agregar 2ml de solución de rojo fenol 0.5%. Luego agregar 180 μ l de solución de sulfato de zinc 10mM. Ajustar a pH 7.8 ± 0.1 con NaOH 0.1N (o HCl 10% si el pH es muy elevado). Conservar a 4-8°C en una botella al abrigo de la luz. Vencimiento: dos semanas. La solución debe permanecer roja o roja-anaranjada; no la utilice si cambia de color.
- Carba NP solución B (Sol. A + 6mg/ml de Imipenem): Calcular la cantidad de Sol. B necesaria, teniendo en cuenta que se requieren 100 μ l por tubo de reacción. Pesar 10-20mg de Imipenem aproximadamente. Se aconseja pesar al menos 10mg de imipenem. Luego dividir el peso por seis para determinar la cantidad (en ml) de Sol. A necesaria. (Ejemplo: 18mg de IMP / 6 = 3ml de Sol. A, que es suficiente para 30 tubos). Conservar a 4-8°C por no más de tres días.

*Procedimiento:

1. Rotular dos tubos de micro-centrifuga (“a” y “b”) para cada aislamiento clínico a probar, para las cepas de control de calidad y para control de reactivos sin inocular.
2. Agregar 100 μ l de buffer de extracción a cada tubo.
3. Para cada aislamiento a probar, disolver una ansada (loop de 1 μ l) de un cultivo fresco proveniente de agar sangre, en los tubos “a” y “b”. Mezclar con vortex durante 5 seg. (Los tubos de control de reactivos deben tener solo el buffer de extracción, no colocar bacteria). Nota: No utilizar cultivos crecidos en medios selectivos o placas con antibióticos o cualquier otro reactivo de selección bacteriana.
4. Agregar 100 μ l de Sol. A al tubo “a”
5. Agregar 100 μ l de Sol. B al tubo “b”

6. Mezclar bien con vortex

7. Incubar los tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2hs. Los aislamientos que dieran resultados positivos antes de completar las 2hs pueden informarse como productores de carbapenemasa.

*Interpretación de resultados:

1. Leer los tubos de control de reactivos sin inocular. Ambos tubos deben tener un color rojo o rojo-anaranjado. Si alguno de los tubos esta de otro color, la prueba es inválida.

2. Leer el tubo “a”: debe tener un color rojo o rojo-anaranjado. Si está de otro color, la prueba es inválida.

3. Leer el tubo “b”: Rojo o rojo-anaranjado = negativo

Naranja claro, amarillo oscuro o amarillo = positivo

Naranja = inválido

*Informe:

Un resultado “negativo” indica que “no se detectó carbapenemasa”.

Un resultado “positivo” indica que “el aislamiento es productor de carbapenemasa”.

Puede ser que se observe un leve cambio de color en la Sol. A al agregar el imipenem. Comparar los tubos de aislamientos clínicos con el tubo control de reactivos sin inocular.

Cuando los resultados son inválidos puede estar indicando un deterioro de los reactivos. Cuando el tubo control de reactivos sin inocular da un resultado invalido, está indicando un problema con la Sol. A y/o la Sol. B. Revisar el pH de la Sol. A. Si el pH es <7.8 , debe preparar Sol. A y B fresca.

Repita el ensayo incluyendo el tubo control de reactivos sin inocular. Si vuelve a obtener un resultado invalido, pruebe el aislamiento con un ensayo molecular.

Nota 1: Las recomendaciones detalladas son derivadas de un gran número de aislamientos de Enterobacterias, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. probados en Estados Unidos. Los resultados obtenidos fueron de un alto nivel de sensibilidad ($>90\%$) y especificidad ($>90\%$), en la detección de carbapenemasas de tipo KPC,

NDM, VIM, IMP, SPM y SME. La sensibilidad y especificidad de este ensayo para detectar otras carbapenemasas puede ser variable. Por ejemplo, la sensibilidad del Carba NP para detectar OXA-48 resultó baja (11% aprox).

Nota 2: En estudios realizados en el CLSI, dos aislamientos productores de KPC con bajos valores de CIM a carbapenemes dieron resultado negativo con Carba NP (un *E. cloacae* sensible por CIM a los tres carbapenemes y un *E. coli* sensible a meropenem e intermedio a imipenem y ertapenem).

*Control de calidad:

Utilizar siempre aislamientos positivos y negativos conocidos, así como el tubo de control de reactivos sin inocular, cada día que realice el ensayo. Cepas control ATCC®:

K. pneumoniae ATCC® BAA-1705: Carbapenemasa positiva

K. pneumoniae ATCC® BAA-1706: Carbapenemasa negativa

Nota del LNR 7.1- En el Servicio Antimicrobianos se ha estandarizado la técnica de Blue Carba Test (BCT), descrita originalmente por Louisa Peixe y cols (J. Clin. Microbiol.;51:4281-3; 2013) que al igual que el Carba NP se trata de un método colorimétrico para detección de carbapenemasas pero utiliza como indicador el azul de bromotimol. Presenta algunas ventajas respecto al CarbaNP en relación a los reactivos y a la realización que se detallan a continuación:

	CARBA NP	BLUE CARBA TEST
pH de reacción	7.8	7.0
Preparación reactivos	Compleja	Simplificada
Extracción proteica previa	Si requiere	No requiere
Inoculación directa de tubo de reacción	NO	SI
Estabilidad de Sol A a 4°C	2 semanas	4-6 semanas
Medios de partida	MH, AS	MH, AS, ChromKPC, TSA, ACh
Costo por tubo (valor)	4,0 AR\$	0,5 AR\$

aprox. en pesos argentinos)		
Disponible en formato comercial	SI*	SI**

*Rapidec (bioMérieux, incluye buffer de extracción proteica), Neo Rapid CARB Kit (Rosco Diagnostica/Medica-Tec, no incluye buffer de extracción proteica)

** Rapid CARB BLUE Kit (Rosco Diagnostica/Medica-Tec)

Se puede descargar el protocolo detallado para el BlueCarba en

<http://antimicrobianos.com.ar/2014/10/protocolo-de-blue-carba/>

El Servicio Antimicrobianos esta trabajando en la adaptación de la técnica Carba NP para hacerla mas accesible a un laboratorio clínico.

Nota del LNR 7.2- Ver comentario 6.1: En Argentina, así como en el resto de los países de la región se ha acordado que frente al hallazgo y confirmación de la presencia de carbapenemasa, ésta debe ser reportada al cuerpo medico. Se ha sugerido reportar los carbapenemes en concordancia con los lineamientos propuestos en publicaciones internacionales para los regímenes de tratamiento combinados en base a la CIM de MER y la sensibilidad a un segundo o tercer antibiótico alternativo (1.Tumbarello M., CID, 2012; 2.Daikos GM., CMI, 2011; 3.Qureshi Z., AAC, 2012; 4. Tzouvelekis LS, CMI 2014). Ver detalles para reporte de carbapenemasas en <http://antimicrobianos.com.ar/2014/04/anexo-pcc-reporte-de-carbapenemes/>

8.- Control de Calidad (Tabla 4 y 5)

- Se agregaron rangos de control de calidad para las siguientes drogas:

E. coli ATCC® 25922: pefloxacin

K. pneumoniae ATCC® 700603: ceftarolina-avibactam, ceftacidima-avibactam, ceftolozane-avibactam.

- Se agrego una nota con recomendaciones para el manejo de *E. coli* ATCC® 35218 para asegurar que mantenga la integridad de su β -lactamasa: Si se conserva a temperaturas mayores de -60°C (por ejemplo en freezer -20°C , congelador/heladera a 4°C) o si se realizan varios subcultivos, esta cepa puede perder su plásmido. Para asegurar la integridad de la β -lactamasa, cuando la cepa es repicada del stock congelado, se debería probar por difusión o dilución la

sensibilidad a ampicilina, piperacilina o ticarcilina. Si los resultados son los esperados según los rangos de control de calidad, entonces está asegurada la presencia de la β -lactamasa, y puede utilizarse esta cepa para controlar las combinaciones de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa.