

NOVEDADES 2017

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 2017 en el documento **M100 27th Edition** del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**: “**Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-seventh Informational Supplement**”. El documento **M100 27th** 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-S 27th Edition.

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*”).

A partir de 2016, CLSI incorporó una versión “de solo-lectura” en su página web para el documento M100, de manera que actualmente éste documento es de libre acceso en

<http://clsi.org/m100>

En este documento se incluyeron “Novedades” relevantes en:

* **Polipéptidos:**

a) Se incorporó un Punto de corte Epidemiológico (Epidemiological Cutoff Value – ECV) de CIM para **Colistin** vs *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Raoultella ornithinolytica* (solo aplica para Colistin y no para Polimixina-B);

b) Se eliminó el punto de corte de difusión de colistin y polimixina-B vs *Pseudomonas aeruginosa*;

c) Se eliminó la categoría Intermedio de CIM para COL vs *P. aeruginosa*;

d) Se eliminaron los puntos de corte de CIM de ambos polipéptidos (COL y POL) de los bacilos negativos no fermentadores distintos de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*.

* **Fluorquinolonas:**

a) Se eliminó el punto de corte de difusión de ácido nalidíxico vs *Salmonella* spp.

b) Se agregó un comentario sobre el uso de pefloxacina en *Salmonella* spp.

* Incorporación del Método modificado de Inactivación de Carbapenemes (**mCIM – modified Carbapenem Inactivation Method**), para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias;

* Informe de meticilino resistencia en *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa; * Incorporación de ECV para azitromicina vs *Neisseria gonorrhoeae*;

1.- Sensibilidad a Polipéptidos.

1.1- Punto de corte epidemiológico (Epidemiological Cutoff Value – ECV) para Colistin (Tabla 2A-2)

El concepto de “Punto de corte” (PC) y de “Punto de corte epidemiológico” (ECV) es diferente. 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 múltiples bases de datos farmacológicos y clínicos, se considera que

son predictores robustos de los resultados clínicos. Por el contrario, los ECV son valores de CIM que separan las poblaciones bacterianas sin mecanismos de resistencia (resistencia (salvajes o wild-type - WT) de aquellas que si lo poseen (no salvajes o non-wild-type - NWT), basados en los fenotipos de CIMs. Por lo tanto, los ECV se basan únicamente en información *in vitro*.

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.

El CLSI establece PC para interpretar el resultado de las pruebas de sensibilidad (S, I, R, SDD) y provee ECVs cuando los PC no están disponibles.

En el año 2016 CLSI incorporó el ECV (CIM y disco) para la combinación: *Shigella flexneri*, y *S. sonnei* vs azitromicina, y este año incorporó el ECV de CIM para la combinación **colistín vs *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *R. ornithinolytica***. Cabe aclarar que este ECV sólo aplica para Colistín y no para Polimixina-B.

ECV Colistin CIM ($\mu\text{g/ml}$)		Aplica para:
Salvaje - WT	No salvaje - NWT	
≤ 2	≥ 4	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , y <i>R. ornithinolytica</i>

“Nota del LNR”: Mientras no se disponga de PC o ECV para el resto de las enterobacterias, el LNR aplicará el ECV $\leq 2\mu\text{g/ml}$ - $\geq 4\mu\text{g/ml}$ para las enterobacterias no incluidas en el cuadro superior. En el informe de colistin en lugar de la interpretación como sensible, intermedio o resistente, debería informarse “aislamiento WT para colistín” o “aislamiento NWT para colistín” según corresponda.

1.2- Polipéptidos vs *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 2B-1)

En la edición de este año el CLSI **eliminó el punto de corte de difusión** para predecir sensibilidad a polipéptidos en *P. aeruginosa*, es decir que la única metodología

aceptada para evaluar esta combinación droga-gérmén es la CIM. Asimismo, eliminó la categoría “Intermedio” en la CIM de colistín.

<i>P. aeruginosa</i> CLSI 2017	Difusión (mm)			CIM (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
colistín	-	-	-	≤2	-	≥4
polimixina-B	-	-	-	≤2	4	≥8

Se incorporó además el siguiente comentario: “El colistín (metanosulfonato) debería ser generalmente administrado con una dosis de carga a las dosis máximas recomendadas, y en combinación con otros agentes”.

1.3- Polipéptidos vs *Acinetobacter spp.* (Tabla 2B-2)

Se incorporó el mismo comentario que en *P. aeruginosa* respecto a la dosificación de colistín y la siguiente aclaración: “Los puntos de corte para colistín ≤2µg/ml sensible - ≥4µg/ml resistente sólo aplican al complejo *A. baumannii*”.

1.4- Polipéptidos vs *otras no-Enterobacteriaceae* (Tabla 2B-5)

Se eliminó el punto de corte de CIM para colistín y polimixina-B de los otros bacilos negativos no fermentadores (BNNF) distintos de *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

“Nota del LNR”: Se aplicará el ECV de la Tabla 2A-2 (≤2µg/ml WT - ≥4µg/ml NWT) para las otras especies de BNNF no incluidas por el CLSI. En el informe en lugar de la interpretación de colistín como sensible, intermedio o resistente, debería informarse “aislamiento WT para colistin” o “aislamiento NWT para colistin” según corresponda.

2.- Quinolonas y Fluorquinolonas vs *Salmonella spp.* (Enterobacterias - Tabla 2A-1)

Se eliminó el punto de corte de ácido nalidixico para tamizaje de resistencia a fluorquinolonas en *Salmonella spp.* y se agregaron los siguientes comentarios:

- “La metodología de preferencia para determinar la sensibilidad o resistencia a fluorquinolonas en *Salmonella spp.* es la CIM de ciprofloxacina. Se podría

realizar CIM a levofloxacin u ofloxacin cuando alguno de éstos sea la droga de elecci3n. Si no se pueden realizar la CIM de ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, o el disco de ciprofloxacina, entonces el disco de pefloxacina se puede utilizar como subrogante para predecir la sensibilidad a ciprofloxacina”.

- “No hay una única metodología que detecte la resistencia generada por todos los posibles mecanismos de resistencia a fluorquinolonas que fueron descritos en *Salmonella* spp.”
- “Si se utiliza el disco de pefloxacina, reportar el resultado como “sensible” o “resistente” a ciprofloxacina. La pefloxacina no detectará la resistencia debida a *aac-6'-Ib-cr* en *Salmonella* spp. Los discos de pefloxacina no están disponibles en Estados Unidos” .

“Nota del LNR”: En el LNR se continuará con el tamizaje de mecanismos de resistencia a fluorquinolonas basado en el uso del disco de ácido nalidíxico y ciprofloxacina tanto en *Salmonella* spp. como en el resto de las enterobacterias.

El punto de corte de ácido nalidíxico para informar aislamientos de infecci3n urinaria por *Enterobacteriaceae* distintas de *Salmonella* spp. (tabla 2A-1: $\leq 13\text{mm}$ resistente, 14-18 intermedio, $\geq 19\text{mm}$ sensible) continua vigente sin modificaci3n.

3.- Método modificado de Inactivaci3n de Carbapenemes (mCIM – modified Carbapenem Inactivation Method) (Tabla 3D)

En esta edici3n del CLSI se incorporó una nueva metodología para la búsqueda de carbapenemasas en Enterobacterias: el **mCIM** (método modificado de inactivaci3n de carbapenemes – en inglés: modified carbapenem inactivation method).

- Cuándo realizar esta prueba?: Para conocer la epidemiología o para el control de infecciones. No es necesario el cambio en la interpretaci3n de la sensibilidad a carbapenemes si se obtiene un resultado positivo de mCIM. El mCIM no está recomendado como prueba de rutina.

“Nota del LNR” - En Argentina la búsqueda de carabapenemasas se realiza de rutina a TODOS los aislamientos de BGN con seÑales de alerta para estos mecanismos (por ej: Enterobacterias (no Proteeae) con halos de IMP $\leq 22\text{mm}$,

Proteaeae con halos de MER ≤ 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/>

* Reactivos y Materiales:

- Caldo Trypticase soya (TSB) en alícuotas de 2ml.
- Discos de meropenem (MER-10µg)
- Ansas de 1 y 10µl
- Caldo nutritivo (TSB, MH, etc) o solución fisiológica en alícuotas de 3-5ml.
- Placas con agar MH con el volumen adecuado para antibiograma.
- Cepa indicadora sensible a meropenem: *E. coli* ATCC 25922.

*Procedimiento:

1. Para cada aislamiento a evaluar, disolver una ansada de 1µl de un cultivo fresco proveniente de agar sangre, en 2 ml de TSB.
2. Mezclar con vortex 10-15 seg.
3. Agregar al tubo de TSB un disco de meropenem. Asegurarse que todo el disco quede sumergido en la suspensión.
4. Incubar a 35°C ± 2°C, en aerobiosis, durante 4 hs. ± 15 min.
5. Justo antes o inmediatamente a continuación de la incubación de la suspensión con el disco de meropenem, preparar una suspensión de 0.5 de Mc Farland de *E. coli* ATCC 25922 en caldo nutritivo o solución fisiológica.
6. Inocular una placa con agar MH con la suspensión de *E. coli* ATCC 25922, de igual manera que durante la rutina de las pruebas de sensibilidad. Asegurarse que tanto la preparación del inóculo, como la inoculación de la placa, se realicen en no más de 15 min. Dejar secar las placas por 3-10 min antes de agregar el disco de meropenem.
7. Remover el disco de meropenem de la suspensión de la cepa a evaluar utilizando un ansa de 10µl y ayudándose con las paredes del tubo para levantar el disco de meropenem. Con cuidado presionar contra las paredes del tubo para remover el exceso de líquido del disco. Colocar el disco en la placa de MH previamente inoculada con la cepa ATCC. No colocar más de 4 discos de meropenem en las placas de 100mm y 8 discos en las placas de 150mm. Ver figura 1.
8. Invertir la placa e incubar a 35°C ± 2°C, en aerobiosis, durante 18-24 hs.

9. Luego de la incubación, medir la zona de inhibición como en la rutina de las pruebas de sensibilidad.

*Interpretación:

Ver figuras 2 y 3.

1. Carbapenemasa positivo: **zonas de inhibición entre 6-15mm o presencia de colonias dentro de zonas de inhibición de entre 16-18mm**. Si el aislamiento a evaluar produce carbapenemasa, el disco de meropenem será hidrolizado durante la incubación y no habrá inhibición o limitación del crecimiento para *E. coli* ATCC 25922 sensible a meropenem.

2. Carbapenemasa negativo: **zonas de inhibición ≥ 19 mm**. Si el aislamiento a evaluar no produce carbapenemasa, el disco de meropenem no será hidrolizado durante la incubación y podrá inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 sensible a meropenem.

3. Indeterminado: **Zonas de inhibición entre 16-18mm (sin la presencia de colonias intra halo)**. La presencia o ausencia de carbapenemasa no puede ser confirmada (ver Notas).

Notas:

1. Para resultados indeterminados:

- Corroborar la pureza de la cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922.
- Corroborar la integridad de los discos de meropenem, con los controles de calidad pertinentes.
- Repetir el mCIM para la cepa a evaluar y utilizar un control positivo y/o negativo.
- Si el resultado sigue siendo indeterminado, considerar la realización de una metodología para detectar genes de carbapenemasa.

2. Algunos aislamientos pueden mostrar colonias dentro de la zona de inhibición de meropenem. Si la zona de inhibición es ≤ 18 mm, esto debe ser considerado como un resultado positivo. Sin embargo, si la zona de inhibición es ≥ 19 mm, el resultado es indeterminado.

3. El CLSI ha estandarizado esta prueba para *Enterobacteriaceae* únicamente.

*Informe:

mCIM POSITIVO: Informar “carbapenemasa detectada”

mCIM NEGATIVO: informar “carbapenemasa no detectada”

mCIM INDETERMINADO: Informar “Prueba no concluyente para determinar la presencia de carbapenemasa. Comuníquese con el laboratorio”

*Pruebas adicionales e Informe:

Informar los resultados del mCIM al comité de control de infecciones o aquellos que soliciten información epidemiológica.

No es necesario el cambio en la interpretación de las pruebas de sensibilidad a carbapenemes para aislamientos con mCIM positivos.

*Recomendación de control de calidad:

Utilizar un control positivo y negativo cada día que realice la prueba mCIM.

Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705™.

Control negativo: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706™.

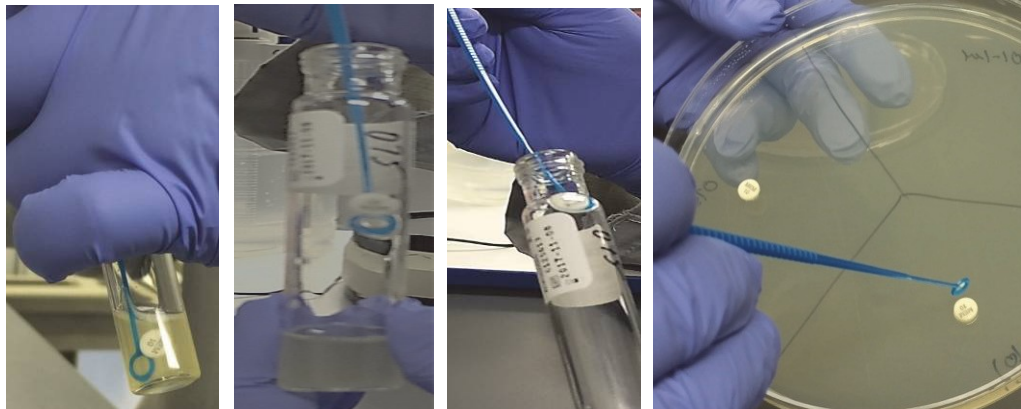
Adicionalmente, realice el control de calidad de los discos de meropenem diaria o semanalmente en lineamiento con la rutina de control de calidad de las pruebas de difusión.

NOTA 1: Este método demostró una sensibilidad y especificidad >99% para la detección de carbapenemasas KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, SME y OXA-like. El desempeño para otras carbapenemasas o para no-*Enterobacteriaceae* no fue evaluado.

NOTA 2: En los estudios en el CLSI, una *K. pneumoniae* productora de OXA-232 dio resultado negativo en 4 de 9 sitios de validación.

“Nota del LNR”: Estudios preliminares en el LNR han demostrado que el mCIM es altamente sensible y específico para la detección de KPC en enterobacterias y de MBL en enterobacterias distintas del grupo *Proteeae*. OXA-163 no es detectada eficientemente por esta metodología.

mCIM - Figura 1:



mCIM – Figura 2:

Resultado de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706™ (negativo), y *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705™ (positivo). Un pequeño anillo de crecimiento alrededor del disco de meropenem no debe tenerse en cuenta (es el resultado del arrastre de la suspensión bacteriana)



mCIM – Figura 3:

Ejemplo de aislamiento productor de carbapenemasa = mCIM positivo.



4.- *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN), informe de meticilino resistencia – (Tabla 2c):

- *S. aureus* y SCN que son resistentes de acuerdo al resultado de la CIM de cefoxitina o el disco de cefoxitina o tienen una CIM de oxacilina $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ deben informarse como meticilino resistentes. Para infecciones severas por SCN, distintos de *S. epidermidis*, con CIM de oxacilina 0.5-2 $\mu\text{g/ml}$ se recomienda detección de *mecA*, PBP2A o disco de cefoxitina.
- Los *S. epidermidis* con CIM oxacilina $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ deben ser informados como meticilino resistentes.
- La CIM y el disco de cefoxitina que no sean realizados en caldo MH ajustado con cationes o agar MH sin suplementos, no detecta eficientemente la meticilino resistencia mediada por *mecA* en *S. aureus* que no desarrollen bien en estos medios (ejemplo: *S. aureus* variante colonia pequeña). Para estos casos, la prueba de PBP2A utilizando crecimiento inducido (tomando del borde del disco de cefoxitina) o la PCR para detectar el gen *mecA* deben ser las pruebas de elección.

“**Nota del LNR**”: para SCN, excepto *S. lugdunensis* y *S. pseudintermedius*, se recomienda el disco de cefoxitina como mejor predictor de meticilino resistencia utilizando los siguientes puntos de corte: $\geq 25 \text{ mm}$ sensible y $\leq 24 \text{ mm}$ resistente. Para *S. aureus* y *S. lugdunensis*: cefoxitina $\geq 22 \text{ mm}$ sensible y $\leq 21 \text{ mm}$ resistente. Para *S. pseudintermedius* utilizar disco o CIM de oxacilina: $\geq 18 \text{ mm}$ sensible y $\leq 17 \text{ mm}$ resistente; $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ sensible, $2 \mu\text{g/ml}$ intermedio, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ resistente.

5.- Punto de corte epidemiológico (Epidemiological Cutoff Value – ECV) para Azitromicina vs *Neisseria gonorrhoeae* (Tabla 2F-2)

Azitromicina CIM ($\mu\text{g/ml}$)		Especies
Salvaje - WT	No salvaje - NWT	
≤ 1	≥ 2	<i>N. gonorrhoeae</i>