



PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD EN BACTERIOLOGIA
INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

BOLETIN INFORMATIVO Nro. 5 - SEPTIEMBRE 2017

**DESAFIOS EN LOS METODOS DE EVALUACION
DE LA SENSILIDAD A POLIMIXINAS
(COLISTINA/POLIMIXINA B)**

La aparición de MDR y XDR – en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, ha llevado al aumento del uso de las polimixinas (COLISTINA y POLIMIXINA B) en la práctica clínica, por lo que la evaluación de la sensibilidad a estas drogas se ha vuelto imprescindible para el manejo terapéutico de los pacientes con infecciones severas por estos gérmenes.

La resistencia a polimixinas puede ser intrínseca en algunas especies (grupo Proteeae, *Serratia marcescens*, complejo *B. cepacia*, etc.) o adquirida debido a mutaciones cromosómicas o, mediante la adquisición de plásmidos transferibles que portan los genes de la familia *mcr* recientemente descritos. La resistencia cromosómica a las polimixinas se relaciona con mutaciones en uno o varios genes que participan de la biosíntesis del lípido A de la membrana

externa, afectando las cargas negativas de este lipopolisacárido, que con llevan a una menor interacción con las polimixinas positivamente cargadas. El mecanismo de resistencia transferible, el gen *mcr-1* codifica una fosfoetanolamina transferasa que incorpora un grupo fosfoetanolamina al lípido A. El efecto resultante es una disminución de la carga neta negativa del lipopolisacárido y al igual que con el mecanismo cromosómico una menor interacción con las polimixinas cargadas positivamente. A la fecha ya se han descrito cuatro variantes de *mcr*: MCR-1, MCR-2, MCR-3 y MCR-4. Dentro de la variante MCR-1, que es la mas frecuente, se han descrito ocho alelos (MCR-1.1 a MCR-1.8) y en Argentina los alelos MCR-1.1 y MCR-1.5.

Las pruebas de sensibilidad a las polimixinas siempre han sido conflictivas por la gran cantidad de parámetros que pueden afectar los resultados, por lo que la interpretación y correlación clínica han sido un gran desafío, aún no resuelto. Entre ellos se incluye la naturaleza catiónica de las moléculas de polimixinas, la pobre difusión en el agar debido a su alto peso molecular, la heterogeneidad en la composición de los principios activos y el fenómeno de hetero-resistencia, entre otros.

LIMITACIONES DE LOS PUNTOS DE CORTE DE POLIMIXINAS CLSI Y EUCAST 2017

El Grupo de trabajo en Polimixinas de CLSI y EUCAST, está realizando actualmente una revisión de los puntos de corte de polimixinas. La compleja farmacocinética y farmacodinamia de éstos compuestos, la variabilidad en las concentraciones alcanzadas y la escasez de datos de correlación con la CIM, han hecho del establecimiento de puntos de corte para polimixinas un gran desafío. En el caso particular de colistín, se ha documentado una variabilidad significativa de las concentraciones séricas en pacientes dependiendo de la función renal. En pacientes con un clearance de creatinina normal (> 80 ml /min), se dificulta lograr concentraciones plasmáticas de colistín de $2 \mu\text{g/ml}$ (la mínima concentración requerida para que éste sea efectivo). Esto se debe a que colistín se administra como el profármaco colisitín-metanosulfonato (CMS), y que *in vivo* parte de éste se elimina sin metabolizar a colistina, su forma activa. La velocidad y eficiencia de conversión de CMS a colistina es individuo-dependiente (varía persona a persona). Esta limitación no se aplica a la polimixina B, ya que se administra en su forma activa. Sin embargo, a la fecha la mayoría de los estudios PK/PD se han realizado utilizando CMS y no polimixina B, por lo que se dificulta poder establecer la correlación clínica de esta droga.

Los puntos de corte actuales CLSI y EUCAST se muestran en la Tabla 1. CLSI dispone de puntos de corte para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, pero no para Enterobacteriaceae. Para un grupo de Enterobacterias, CLSI ha publicado “epidemiological cutt-off values” (ECV) o valores de corte epidemiológicos e incluyen a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Raoutella ornithinolytica*, *E. cloacae* y *E. aerogenes*. La recomendación es no proveer de la interpretación “Sensible”, “Intermedio” y “Resistente” sino categorizar los aislamientos como wild-type (WT o salvajes) o no-wild-type (no-WT o no-salvajes). Mientras que los puntos de corte del EUCAST permiten categorizar los aislamientos de Enterobacterias, *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp* como S o R. Por esta razón, en el LNR (Serv. Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. C. Malbrán”) hemos adoptado los puntos de corte del EUCAST ($S \leq 2$ ug/ml, $R \geq 4$ ug/ml) para categorizar la sensibilidad a colistina.

Tabla 1. PUNTOS DE CORTE DE POLIMIXINAS CLSI Y EUCAST 2017

Organismo	CLSI BP (ug/ml)			EUCAST BP (ug/ml)		
	S	I	R	S	I	R
<i>Acinetobacter baumannii</i>						
<i>(CLSI) y A. especies (EUCAST)</i>						
COL	≤ 2	--	≥ 4	≤ 2	--	≥ 4
POL B	≤ 2	--	≥ 4	--	--	--
<i>P. aeruginosa (CLSI) y P. especies (EUCAST)</i>						
COL	≤ 2	--	≥ 4	≤ 2	--	≥ 4
POL B	≤ 2	4	≥ 8	--	--	--
Enterobacterias*	WT		No-WT	S	I	R
COL	≤ 2	--	≥ 4	≤ 2	--	≥ 4
POL B	--	--	--	--	--	--
* <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Raoutella ornithinolytica</i> , <i>E. cloacae</i> y <i>E. aerogenes</i> .						
WT: salvaje, No-WT: no-salvaje, BP: break point						

DIFICULTADES EN LA EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS POLIMIXINAS

La naturaleza anfipática de las polimixinas y su alto peso molecular obstaculiza su difusión en el agar, dando zonas de inhibición típicamente pequeñas. Por lo tanto, la diferenciación entre aislamientos resistentes y sensibles basados en las zonas, se dificulta ya que un valor de halo de inhibición por disco, puede corresponder con valores de CIM en las distintas categorías de interpretación. Por tal motivo no se recomienda usar el método de difusión para evaluar la sensibilidad a las polimixinas.

La propiedad catiónica de las polimixinas genera por efecto electrostático la adsorción a superficies con carga negativa como la de los plásticos, este fenómeno no ocurre de manera tan marcada con las superficies de vidrio. Específicamente, la adsorción de polimixinas a las microplacas de plástico (donde se realiza la CIM por el método de microdilución en caldo), podría producir valores de CIMs falsamente elevados, debido a la unión del antibiótico a la superficie. Debido a que la adsorción de las polimixinas al plástico resulta saturable, se ven afectados con mayor grado aquellos valores de CIM $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, más que los de $> 2 \mu\text{g/ml}$.

En un momento CLSI propuso incorporar polisorbato 80 (P-80) (directamente en el caldo Mueller-Hinton o al inóculo del organismo) para evitar la unión de las polimixinas a la superficie plásticas. El P-80, un agente dispersante, que desplaza y limita la interacción electrostática entre la colistina y las paredes de la placa. Sin embargo, poco tiempo después, CLSI descartó el uso de este aditivo, ya que observó que en presencia de colistin, P-80 actuaba sinérgicamente produciendo valores de CIMs menores a los esperados.

La emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas, *Acinetobacter* y *P. aeruginosa* XDR y la falta de nuevas opciones terapéuticas, ha llevado a la creciente utilización de colistín y consecuente emergencia de resistencia. La evaluación de la sensibilidad a ésta droga se ha vuelto crítica ya que probablemente sea integrante de la antibiótico-terapia definitiva. Esto lleva a la necesidad de recurrir a métodos de diagnóstico que rápidamente permitan dar respuesta en el laboratorio clínico.

Cuando se comparan un método de diagnóstico frente a un método que se considera de referencia, se espera que la concordancia en la **categoría de interpretación (CA, categorical**

agreement) y la **categoría esencial (EA, essential agreement, concordancia con la CIM +/- 1 dil)** entre ambos, sea **>= 90%**. Como también, que los errores no superen lo máximo permitido en cada tipo. En la Tabla 2 se describen los tipos de errores que se pueden observar cuando se comparan metodologías para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos contra un método de referencia.

Tabla 2. TIPOS DE ERRORES Y MÁXIMOS PERMITIDOS SEGÚN ISO Y FDA

Tipo de Error			Máximo permitido (ISO 20776) ¹	Máximo permitido (FDA) ²
VM	“very major” o muy mayor	Falsa sensibilidad R => S	$\leq 3.0\%$	Depende del número de cepas R incluida en la validación (típicamente $\leq 1.5\%$)
M	“major” o mayor	Falsa resistencia S => R	$\leq 3.0\%$	$\leq 3.0\%$
mi	“minor” o menor	S => I, I => S R => I, I => R	La suma de VM+M+mi debe ser $\leq 10\%$	La suma de VM+M+mi debe ser $\leq 10\%$

Ref. 1 ISO-20776. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. International Organization for Standardization, 2007.

Ref. 2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health. Guidance for Industry and FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems, August 28, 2009.

Se sugiere el uso de la EA por sobre los valores de VM y M, para aquellas evaluaciones en donde no se dispone de una categoría intermedia para el agente antimicrobiano (como por ejemplo colistín).

Varios estudios han observado que para colistín, tanto el método de difusión con discos como las tiras de gradiente (E-test, Liofilchem) presentan EA y tasas de errores VM (very major, muy

mayores, o de falsa sensibilidad) inaceptables cuando se los compara con los métodos de referencia. Esto ha llevado a que se desaconseje la utilización de estas técnicas en la rutina.

A esta dificultad se le suma que recientemente, se ha documentado que los **métodos automatizados Vitek2 y Phoenix**, también presentan un porcentaje de **errores superiores a lo permitido para colistín, en su mayoría VM o de falsa sensibilidad.**

Debido a que la determinación de la CIM a colistín está asociada con diversos problemas metodológicos que conllevan a porcentajes CA y EA no aceptables respecto los métodos de referencia, el **Grupo de Trabajo CLSI-EUCAST** en 2016 acuerdan que:

- El método de referencia para Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. es el de **microdilución en caldo**, según estándar ISO (20776-1).
 - a. Se debe usar caldo Mueller-Hinton ajustado a cationes.
 - b. No se deben incluir aditivos en ninguna parte del proceso de ensayo (en particular, polisorbato-80 u otro tensioactivo)
 - c. Las policubetas deben ser de poliestireno sin tratamiento.
 - d. Se debe utilizar sulfato de polimixina (no el derivado metansulfonato de colistina – que es la prodroga inactiva)

A partir de lo cual, se recomienda la **microdilución en caldo** como único método para evaluar la sensibilidad a colistín, excluyendo la posibilidad de realizar las pruebas de sensibilidad mediante otros métodos, incluida la dilución en agar, la difusión en disco, las tiras de gradiente y los automatizados, hasta que no se hayan revisado los datos históricos o se genere nueva información al respecto.

RECOMENDACIONES DEL LNR PARA LA EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS POLIMIXINAS

Como se mencionó previamente, para categorizar la sensibilidad a colistín en el LNR se adoptan los puntos de corte: **$S \leq 2 \text{ ug/ml}$, $R \geq 4 \text{ ug/ml}$** (EUCAST para **enterobacterias** y CLSI/EUCAST para ***P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.**)

En la Tabla 3 se listan los **Métodos de Evaluación de Sensibilidad a COLISTIN**, que hemos clasificado en las siguientes categorías: **Métodos de Referencia (MR)**, **Aceptados (MA)** y **Cuestionados (MC)**. Estos métodos se encuentran disponibles comercialmente, se pueden poner a

punto en el laboratorio o están próximos de aprobación para su comercialización por ANMAT, como el COLTEST (Britania) o el Rapid Polymyxin NPtest (Rosco).

Como **referencia (MR)** hemos adoptado los siguientes métodos: **microdilución en caldo, macrodilución en caldo, dilución en agar y PCR de los genes *mcr*-like** (para la resistencia transferible).

Las únicas diferencias entre la microdilución y la macrodilución en caldo son el volumen final (100ul vs 1 ml) de reacción y el tipo de material del recipiente (placas de poliestireno vs tubo de vidrio).

Se ha sugerido que el método de dilución en agar y la macrodilución en caldo para determinar la susceptibilidad antimicrobiana a colistina podrían evitar el problema de "pegado" de moléculas poli-catiónicas como colistina a materiales poliestirénicos como los que componen las microplacas. Aunque ambas técnicas resultan laboriosas y no se encuentran disponibles en los laboratorios clínicos, estudios publicados han demostrado muy buena concordancia entre éstos métodos y la microdilución en caldo. En el LNR ambos métodos han resultado comparables con la microdilución en caldo, por lo que se han adoptado también como métodos de referencia.

Se debe tener presente que para evaluar la sensibilidad a colistín por **microdilución o macrodilución en caldo**, siempre se debe usar:

- a) Sulfato de colistín y no la droga comercial CMS, porque ésta última es una prodroga.
- b) Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes, según lo recomendado por CLSI.

La técnica de **PCR del gen *mcr-1***, se utiliza como método de referencia sólo cuando se evalúa la resistencia transferible a polimixinas.

Entre los **métodos aceptados (MA)**, se encuentran **SENSITITRE** y el método automatizado

MICROSCAN, en los que la bibliografía ha demostrado CA y EA aceptables.

Los otros métodos listados en la categoría MA incluyen: Predifusión con Tabletas COL*, COL-Agar Spot*, COLTEST* y Elución Discos COL* han sido recientemente evaluados y validados en el LNR con excelentes CA y/o EA.

TABLA 3. MÉTODOS PARA EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD A COLISTIN Y CRITERIOS DE INFORME

MÉTODOS PARA EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD A COLISTIN		
REFERENCIA (MR)	ACEPTADOS (MA)	CUESTIONADOS (MC)
<ul style="list-style-type: none"> . Microdilución en caldo* . Macrodilución en caldo . Dilución en agar . PCR MCR-1 (sólo para R transferible) (*) 	<ul style="list-style-type: none"> . SENSITITRE . WALKAWAY MICROSCAN . Predifusión con Tabletas COL(*) . COL-Agar Spot(*) . COLTEST (*) . Elución Discos COL(*) . Rapid Polymyxin NP test 	<ul style="list-style-type: none"> . Difusión con discos (DD) . Tiras de gradiente . VITEK2 . PHOENIX
CRITERIOS DE INFORME DE PRUEBAS FENOTÍPICAS		
<p>RESULTADO DE S</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>REPORTAR S (**)</p>	<p>RESULTADO DE S</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>REPORTAR S</p>	<p>RESULTADO DE S (***)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>CONFIRMAR CON OTRO MR O MA (NO aplica para DD)</p>
<p>RESULTADO DE R</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>REPORTAR R</p>	<p>RESULTADO DE R</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>REPORTAR R</p>	<p>RESULTADO DE R (***)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>REPORTAR R (NO aplica para DD)</p>

MR: Método de Referencia, MA: Método Aceptado, MC: Método Cuestionado

(*) Se pueden descargar los Protocolos del LNR en los siguientes links:

Microdilución en caldo: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-CIM-microdiluci%C3%B3n-COL-version2-Agosto-2017.pdf>

PCR MCR-1 (sólo para R transferible): <http://antimicrobianos.com.ar/2016/01/deteccion-de-resistencia-transferible-a-colistin-gen-mcr-1/>

Predifusión con Tabletas COL: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Predifusion-Tabletas-COL-Rosco-version2-Agosto2017.pdf>

COL-Agar Spot y COLTEST®: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>

COLTEST ®Britania en proceso de aprobación por ANMAT.

Elución Discos COL: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version2-Agosto2017.pdf>

(**) Tener presente que, aunque en muy baja frecuencia, en el LNR hemos detectado aislamientos de *E. coli* productores de *mcr-1* con CIM =2 ug/ml a colistina por el método de (EUCAST MIC distributions and ECOFFs). Ese fenotipo también se ha descrito en otras series, sin embargo por el momento se desconoce su relevancia clínica. Sugerimos confirmar los aislamientos de *E. coli* con CIM por microdilución de 2.0 ug/ml con otro método MR/MA y derivar al LNR para realización de PCR para *mcr*-like.

(***) Este criterio **NO** aplica al método de difusión con discos (DD). En el LNR hemos evaluado la correlación entre la DD versus la microdilución en caldo obteniendo los siguientes resultados:

- a) ***E. coli***: Halos de **COL <= 10mm** correlacionan con **CIMs >=4 ug/ml**. Halos de **COL >=14mm** correlacionan con **CIMs <=1ug/ml**. En cepas MDR con halos de COL entre **11 y 13mm**, evaluar su actividad por un **método de referencia** u otro método recomendado por el LNR, si se lo va a usar como tratamiento.
- b) **Enterobacterias distintas de *E. coli***: Halos de **COL <= 10mm** correlacionan con **CIMs >=4 ug/ml**. En cepas MDR de ETB (no *E.coli*) con halos de **COL >= 11**, evaluar su actividad por método un **método de referencia** u otro método recomendado por el LNR, si se lo va a usar como tratamiento.
- c) ***P. aeruginosa***: Halos de **COL = 06 mm** correlacionan con **CIMs >=4 ug/ml**. Halos de **COL > = 15 mm** correlacionan con **CIMs <=2 ug/ml**. En cepas MDR con halos de COL entre **07 y 14mm**, evaluar su actividad por un **método de referencia** u otro método recomendado por el LNR, si se lo va a usar como tratamiento.
- d) ***A. baumannii*** (exclusivamente): Halos de **COL <= 11mm** correlacionan con **CIMs >=4 ug/ml**. Halos de **COL >=14mm** correlacionan con **CIMs <=1ug/ml**. En cepas MDR con halos de COL entre **12-13mm**, evaluar su actividad por un **método de referencia** u otro método recomendado por el LNR, si se lo va a usar como tratamiento.

- e) ***Acinetobacter spp distintos de la genomsp baumannii***: deberán evaluarse por un **método de referencia** u otro método recomendado por el LNR, si se lo va a usar como tratamiento. No se ha podido establecer correlación debido a la escasez de aislamientos resistentes.

Rapid Polymyxin NP® (Elitech, Rosco) test es un método rápido colorimétrico para evaluar la sensibilidad a colistina. El método evalúa la utilización de D-glucosa (como fuente de carbono) por el microorganismo, en presencia de colistina, mediante el indicador de pH rojo fenol. Los aislamientos bacterianos resistentes a colistina serán capaces de fermentar glucosa con la consiguiente producción de metabolitos ácidos que producen un viraje del indicador del naranja al amarillo. Por el contrario, en los organismos sensibles a colistina, ésta inhibe el desarrollo bacteriano, impidiéndose la fermentación de la glucosa y por ende el viraje del indicador. La ventaja de esta técnica es que produce resultados dentro de las 2.30 horas. Como limitación se puede mencionar que: 1) los sub-cultivos bacterianos deben proceder de medios de cultivos sin fermentación de azúcares y 2) por el momento el kit comercial disponible aplica solo para Enterobacterias. Estudios internacionales y preliminares realizados en el LNR han demostrado una performance de este método comparable a los de referencia.

La comparación entre las distintas publicaciones se ve dificultada debido a, la falta de armonización entre las diversas metodologías, la composición de los paneles, en especial el número de cepas resistentes incluidas, los criterios de aceptabilidad empleados y demás factores previamente mencionados. Sin embargo, podríamos concluir que para las **tiras de gradiente, Vitek2 y Phoenix**:

- Las discrepancias con los métodos de referencia se encuentran **primariamente** asociadas a **errores VM** o de falsa sensibilidad. Por lo tanto, todo aislamiento que sea categorizado como sensible por alguno de estos métodos deberá evaluarse por algún otro método alternativo (referencia o aceptado, ver Tabla 3). La falsa sensibilidad ha sido asociada a los mecanismos de resistencia distintos de mcr. Esto resulta coincidente con la experiencia del LNR, donde todos los aislamientos de *E. coli* productores de mcr resultaron categorizados correctamente como R por ambos métodos automatizados.
- La ausencia de una categoría intermedia genera que el propio error del método evaluado (generalmente +/- 1 dil.) provoque cambios en la interpretación del resultado, generando

CA por debajo del rango aceptable. Esto se ve agravado porque una considerable proporción de las poblaciones salvajes de algunos bacilos gram negativos como *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* presentan valores de **CIM próximos a los valores de corte de colistín: 2 y 4 ug/ml**. Se ha sugerido que la incorporación de una categoría intermedia p. ej. S \leq 1, Intermedio = 2, R \geq 4ug/ml, resolvería parte de este conflicto. Del mismo modo, se recomienda el uso de la EA por sobre los valores de VM y M, para las evaluaciones metodológicas en estos casos donde no se dispone de una categoría intermedia de interpretación.

- La **hetero-resistencia** descrita en especies de *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y *K. pneumoniae*, podrían también justificar parte de las discrepancias.

El LNR recomienda: Cuando se requiera el uso de colistín como opción de tratamiento y se obtenga un resultado de sensibilidad por los métodos automatizados cuestionados, evaluar la sensibilidad a colistín por algún MR o MA.

Recientemente Vasso S, en JCM de Julio de 2017, publica un resumen donde se muestra la actividad comparativa de varios métodos de evaluación de sensibilidad a polimixina B y colistín entre 2001 -2017. Los que requieran información mas detallada de la performance de cada una de las metodologías discutidas en el presente Boletín Nro. 5, podrán recurrir a ésta publicación y otras relevantes que formarán parte del material bibliográfico incluido en el Boletín Nro. 6 del PCC-NAC, Septiembre 2017.

Seguimos trabajando en la puesta a punto de otros Protocolos para evaluación de sensibilidad a polimixinas, que se los haremos llegar a medida que se vayan validando.

CONSIDERACIONES FINALES

Hasta que el CLSI/EUCAST se expidan con métodos alternativos para evaluar la sensibilidad a polimixinas en los laboratorios clínicos, los MA han demostrado ser una excelente opción para dar respuesta a la necesidad de tratamiento con estas drogas.

Los **PROTOCOLOS** para la realización de los **Métodos** indicados en la **Tabla 3** con (*) pueden descargarse directamente de la página web del LNR:

<http://antimicrobianos.com.ar/2017/09/protocolos-colistin/>

Predifusión con Tabletas COL: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Predifusion-Tabletas-COL-Rosco-version2-Agosto2017.pdf>

COL-Agar Spot y COLTEST®: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>

Elución Discos COL: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-de-Eluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version2-Agosto2017.pdf>

Microdilución en caldo: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-CIM-microdiluci%C3%B3n-COL-version2-Agosto-2017.pdf>

PCR MCR-1 (sólo para R transferible): <http://antimicrobianos.com.ar/2016/01/deteccion-de-resistencia-transferible-a-colistin-gen-mcr-1/>

Servicio ANTIMICROBIANOS- LNR en Resistencia a los Antimicrobianos
INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"- MSAL Argentina
acorso@anlis.gov.ar, fpasteran@gmail.com,
www.antimicrobianos.com.ar

REFERENCIAS

Las referencias resaltadas en “negrita”, por una cuestión de espacio, se enviarán en el Boletín Informativo Nro. 6 del PCC-NAC en Septiembre de 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **2015** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. CLSI Document M07-A010, Wayne, PA.

CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. **2016**. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI271 EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Available at:
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf. Accessed 4 August **2017**

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **2017**. Performance standards for antimicrobial testing. CLSI document M100-S27, Wayne, PA.

Humphries RM. Susceptibility Testing of the Polymyxins:Where Are We Now? **2015**. Pharmacotherapy. 35:22-27.

EUCAST. **2017**. Clinical Breakpoints version 7.1 (Update 2017-03-13). Available at:
http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Accessed 4 August 2017.

Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. 2017. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr* -positive *Enterobacteriaceae*: Comparison of Sensititre, Microscan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol*.doi:10.1128/JCM.00268-17.

EUCAST. **2017**. Warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - problems detected with several commercially available products. Available at:http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. Accessed 4 August 2017.

Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, Kalayjian RC, Watkins RR, Marshall S, Rudin SD, Domitrovic TN, Hujer AM, Hujer KM, Doi Y, Kaye KS, Evans S, Fowler VG Jr, Bonomo RA, van Duin D; Antibacterial Resistance Leadership Group. 2017. Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality. *Clin Infect Dis*. **64:711-718**

Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. **2015**. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. Aug;59(8):4625-30.

Vasoo S. 2017. Susceptibility Testing for the Polymyxins: Two Steps Back, Three Steps Forward?. *J Clin Microbiol*. Sep;55(9):2573-2582. doi: 10.1128/JCM.00888-17.

Jerke K., Lee M., Romney M. Humphries R. **2016**. Polymyxin Susceptibility Testing: a Cold Case Reopened. *Clinical Microbiology Newsletter* 38:69-77.

Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. **2017**. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* Sep 1;72(9):2528-2530

Poirel L, Jayol A, Nordmann P. 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017;30:557-596.

Liu Y, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. **2016**. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China : a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 16:161-168.

Tijet N, Faccone D, Rapoport M, Seah C, Pasterán F, Ceriana P, Albornoz E, Corso A, Petroni A, Melano RG. 2017. Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical Escherichia coli from Argentina and Canada. PLoS One. Jul 5;12(7):e0180347.

Insert for Kit for Detection of COLISTIN resistance in Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa* and *Acinetobacter* (98018). <http://www.rosco.dk/> Accessed 12 June **2017**

Dominguez JE, Figueroa Espinosa RA, Redondo LM, Cejas D, Gutkind GO, Chacana PA, Di Conza JA, Fernández-Miyakawa ME. **2017**. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* recovered from healthy poultry. *Rev Argent Microbiol.* 49(3):297-298.

Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J. **2016**. The colistin resistance mcr-1 gene is going wild. *J Antimicrob Chemother.* 1(8):2335-6. doi: 10.1093/jac/dkw262.

Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A; MCR Group, Corso A. **2016**. First Description of mcr-1-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 60(7):4412-3.

Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. 2017. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. J Clin Microbiol. Sep;55(9):2609-2616.

Hindler J, Humphries RM. **2013**. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Clin Microbiol.* Jun;51(6):1678-84

Giamarellou H. **2016**. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents.* 48:614-621

Nordmann P, Jayol A., Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae **2016**. *Emerging Infectious Diseases.* 22: 1038-43.

Jayol A, Nordmann P, Lehours P, Poirel L, Dubois V. **2017**. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 17:30291-4. doi: 10.1016.

Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J1, Wang Y. **2017**. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. MBio. Jun 27;8(3). pii: e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17.

Al-Tawfiq J., Laxminarayan R, Mendelson M. **2016**. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin-resistance in humans and animals? IJID. doi:10.1016

Jeannot K, Bolard A., Plesiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **2017**. Int J Antimicrob Agents.;49:526-535.

ASM Microbe 2017, 01 al 05 de Junio, New Orleans, EEUU

- **Epidemiology of *mcr-1*-producing Enterobacteriaceae clinical isolates from Argentina. Faccone D., M. Rapoport, E. Albornoz, P. Ceriana, C. Lucero, P. Gagetti, A. Petroni, MCR-Group, F. Pasteran, A. Corso. S-135/2799**

- **Screening of Emerging Resistant Mechanisms (KPC, NDM, OXA-48-Like and *mcr*) in Enterobacteriaceae with MicroScan Automated System. F. Pasteran, P. Ceriana, M. Rapoport, E. Albornoz, C. Lucero, P. Gagetti, G. Baldoni, A. Corso. F- 421/3734.**

- **Rapid Polymyxin NP Test for Rapid Detection of Polymyxin-Resistant *Enterobacteriaceae*. N. Kieffer, L. Poirel, P. Nordmann. S- 68/2117**

- **Underestimation of Colistin Resistance among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates by Two Automated Systems Compared with Agar and Microbroth Dilution Methods .S. Vourli, M. Beredaki, K. Dafopoulou, J. Meletiadiis, A. Vasilakopoulou, A. Tsakris, S. Pournaras. S- 144/4500**

- **Comparison of Agar Dilution and Broth Microdilution for Colistin with a Diverse Set of Gram-Negative Isolates. F. Basit, C. Shubert, S. Messina-Powell, M. F- CPHM LB1/6602**

- **Comparison of Etest and Broth Microdilution Methods for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates. S. Simar, D. Sibley, D. Ashcraft, G. Pankey; F- 398/5341**

- **Testing of USA *mcr-1* Colistin-Resistant *E. coli* on MicroScan Panels. B. Zimmer, E. Fernandez, F. Popoola, R. Kwong; FRIDAY - 406/ 3478**

- **Evaluation of a Broth Microdilution Plate for Determining the Susceptibility of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* to Polymyxins . J. Karichu¹, J. Otiso¹, H. Van Heule¹, G. Keller¹, E. Cober¹, L. J. Rojas², A. M. Hujer², K. M. Hujer², S. Marshall², F. Perez², S. D. Rudin², T. N. Domitrovic², K. S. Kaye³, R. S. Salata⁴, D. van Duin⁵, R. A. Bonomo², S. S. Richter. F- 432/4643**

- **Comparison of Different Commercial Methods for Polymyxin Susceptibility Testing. P. C. M. Koga, A. M. Doi, K. Santiago, T. B. Melo, J. Pasternak, M. D. V. Martino. F - 430/ 4737**
