



# ALERTA EPIDEMIOLOGICA

## EMERGENCIA DE ENTEROBACTERALES DOBLE PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS



### PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD EN BACTERIOLOGIA

INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

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

### BOLETIN INFORMATIVO Nro. 4 – Abril 2021

El Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Laboratorio Nacional de Referencia, LNR) ha confirmado durante la primera ola de la pandemia de COVID-19, la emergencia y diseminación de colonización/infección por Enterobacteriales productores de combinaciones de carbapenemasas en la Argentina.

De los 196 aislamientos bacterianos de bacilos gram negativos recibidos en el LNR durante el período mayo 2020-noviembre 2020 para estudios de referencia, 52/196 (27%) fueron confirmados como doble productores de carbapenemasas resultantes de la combinación de una serino y una metalo enzima. Resulta preocupante que el 60% de estos dobles productores presentaron una combinación de KPC+NDM, que no había sido documentada con anterioridad. El 40% restante de las cepas con combinaciones de carbapenemasas recibidas durante la pandemia de COVID-19, correspondió a las combinaciones de NDM+OXA-163 (36%) y KPC+IMP (4%), ya descriptas en Argentina con anterioridad.

### **1) Genotipos de combinaciones de serino más metalo carbapenemasas detectados**

- **KPC+NDM** en 31/52 (60%) aislados: 30 *Klebsiella pneumoniae*-KPN-, 1 *Citrobacter freundii* provenientes de 8 hospitales.
- **NDM+OXA-163** en 19/52 (36%) aislados: 10 *Serratia marcescens*, 6 KPN, 2 *Escherichia coli* y 1 *Proteus vulgaris*, recuperados de 3 hospitales.
- **KPC+IMP** en 2/52 (4%) aislados: KPN, 2 hospitales.

Aproximadamente la mitad de los aislados con KPC+MBL presentaron además coproducción de beta lactamasa de espectro extendido de la familia CTX-M

### **2) Origen de las cepas en Argentina**

Las cepas con doble carbapenemasa se recuperaron en Instituciones de CABA (29 aislamientos), Provincias de Buenos Aires (22) y Neuquén (1). Tres hospitales concentraron el 71% (37/52) de los aislamientos: 2 en CABA, que contribuyeron con 10 KPN con KPC+NDM cada uno, y 1 de Buenos Aires con 17 aislamientos con NDM+OXA-163 (4 especies). El primer aislado con KPC+NDM fue derivado a fines de mayo 2020 por un hospital del subsector público de CABA.

### **3) Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos**

Los coproductores de KPC+NDM constituyen un doble desafío, para el control de infecciones y para la selección del tratamiento antimicrobiano óptimo. Desde el punto de vista epidemiológico, las pruebas fenotípicas (ver más adelante) pueden no poner de manifiesto la presencia de ambas carbapenemasas, por lo que estos huéspedes bacterianos se podrían convertir en reservorios ocultos de la/las carbapenemasa/s no detectada/s. Desde punto de vista clínico, la co-expresión de NDM confiere resistencia a drogas de última línea como ceftazidima avibactam (CZA) y constituye uno de los motivos de derivación al LNR. Típicamente, los doble productores de KPC+NDM presentan sensibilidad a la combinación de aztreonam-ATM- con (ceftazidima) avibactam (AZA) (ver pruebas de sensibilidad más adelante). Tigeciclina suele ser el segundo antimicrobiano activo en frecuencia, luego de AZA. La sensibilidad a fosfomicina, aminoglucósidos y colistina varía cepa a cepa. *K. pneumoniae* suele ser el principal huésped para esta combinación de KPC+NDM. Ocasionalmente, se ha detectado en *C. freundii*.

Las cepas productoras de KPC+OXA-163 y KPC+IMP, fueron uniformemente sensibles a AZA.

#### 4) Detección de doble producción de carbapenemasas KPC+MBL

##### a) Tamizaje fenotípico:

Los Laboratorios de Argentina cuentan con las herramientas para la detección fenotípica de estos dobles productores de carbapenemasas mediante el empleo de los algoritmos diseñados por el LNR. Todas las metodologías fueron capaces de capturar estas cepas productoras de KPC+NDM como “sospechosa de carbapenemasa” con las señales de alarma de cada una de las técnicas propuestas en el algoritmo (Tabla 1)

Tabla 1	Difusión (mm)	Microscan	Sensititre	Phoenix	Vitek 2C AST-N368
Señal de sospecha según algoritmo del LNR	Imipenem $\leq 22$	Imipenem $\geq 2.0$	Imipenem $\geq 2.0$	Imipenem $\geq 2.0$	Imipenem $\geq 2.0$
KPC+NDM (Argentina)	97% de los casos*	SI	SI	SI	SI

\* Solo una cepa coproductora de KPC+NDM presentó halos a imipenem en la categoría sensible, sin embargo, se acompañó de resistencia a CZA.

##### b) Confirmación fenotípica:

Los mayores desafíos fenotípicos resultan a la hora de clasificar el tipo de carbapenemasa. Los resultados de las pruebas de inhibición (sinergia) con monodiscos de ácido borónico (APB) y EDTA pueden presentar resultados inusuales, subestimando la presencia de alguna de las carbapenemasas o incluso presentar resultados negativos para ambos inhibidores.

Tabla 2 - Resultados obtenidos con los inhibidores en el LNR:

Sinergia positiva	Proporción (%)	Inferencia fenotípica	Señal de alarma de coproducción KPC+MBL
EDTA Y APB	27%	KPC+MBL	
Solo APB	19%	KPC	Resistencia a CZA (requiere pruebas de diferenciación con mutantes de KPC, ver más adelante)
Solo EDTA	27%	MBL	Resistencia a ATM Y sinergia ATM-CLA negativa
Sin sinergia	27%	Probable clase D (OXA)	Resistencia a CZA Y Blue Carba Test -BCT- (o similares) positivo con resultado en <15 min.

Pese a que en el 73% de los casos los inhibidores clasificaron de manera incompleta o incorrecta la presencia de KPC+NDM, **todas estas cepas presentaron alguna señal de alarma fenotípica indicadora de una posible coproducción de carbapenemasas (Tabla 2).**

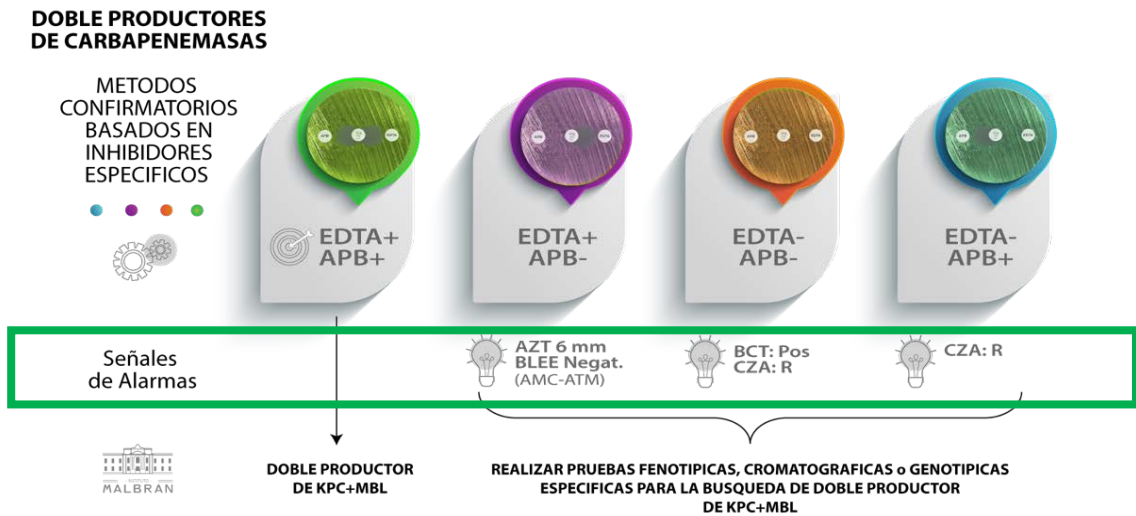
Merece destacarse que estos porcentajes obtenidos con los inhibidores podrían no ser reproducidos en los laboratorios derivantes dado que de estos ensayos participan múltiples variables como la distancia de colocación de discos y una interpretación subjetiva de las mismas.

En base a estos resultados se recomienda la actualización del algoritmo para el tamizaje de sospecha de productores de carbapenemasas en Enterobacterales mediante la **técnica de difusión con la inclusión de discos de CZA (14 µg), a saber:**



Aquellos usuarios de sistemas automatizados que ya cuenten con la prueba de sensibilidad a CZA en sus paneles/tarjetas, podrán capitalizar estos resultados del mismo modo que los usuarios de la difusión por discos. Toda resistencia a CZA requiere de seguimiento con pruebas adicionales para identificar la/s causa/s de dicho fenotipo.

Si la cepa resultara sospechosa de producir carbapenemasa en base a este algoritmo, se sugiere realizar las pruebas clasificatorias del tipo de carbapenemasas utilizando pruebas de inhibición con APB y EDTA y teniendo en consideración las señales de alarma de posible combinación de carbapenemasas:



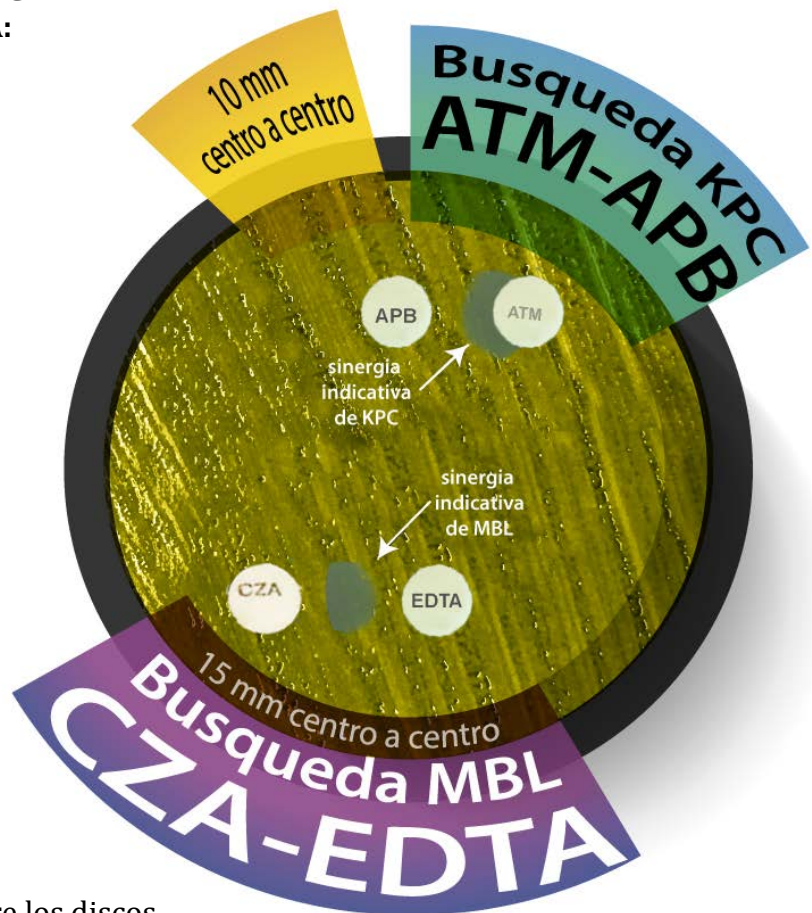
### C) Métodos ad hoc para confirmación fenotípica de KPC+MBL

#### C.1) COLOCACION ESTRATEGICA DE MONODISCOS DE APB y EDTA:

Se sugiere ubicar los inhibidores frente a sustratos donde sólo se manifieste la actividad hidrolítica de una sola de las carbapenemasas de la combinación.

- APB: se sugiere colocar este monodisco a 10 mm centro a centro del disco de aztreonam (ATM). La resistencia a ATM se debe a la presencia de KPC o eventualmente BLEEs acompañantes. Solo KPC será inhibible por APB.

-EDTA: se sugiere colocar este monodisco a 15 mm centro a centro del disco de CZA. La resistencia a CZA debido a la presencia de MBL, será inhibible por EDTA manifestándose la sinergia entre los discos.



Otros potenciales mecanismos de resistencia sobre ATM como AmpC plasmídico difícilmente generan el alto nivel de resistencia que se observa en las cepas productoras de KPC, por lo que se espera poca interferencia en este esquema de detección. Además, a la fecha, solo una cepa de las coproductoras de KPC+NDM presentó adicionalmente CMY.

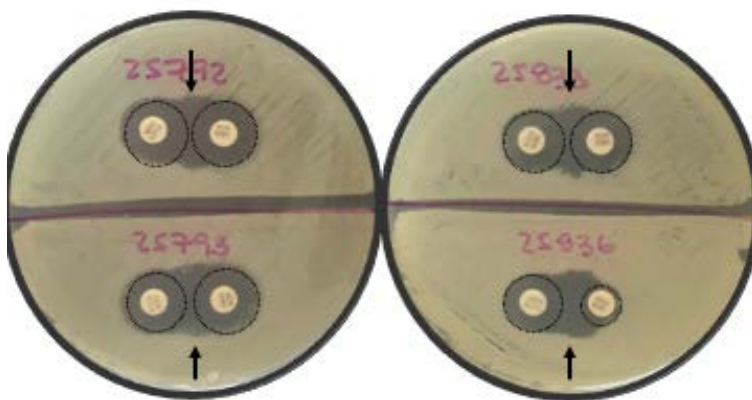
Una cepa con coproducción de KPC+MBL que se presenta fenotípicamente con sinergia positiva solo para APB (19% de los casos, Tabla 2) podría ser diferenciada de las mutantes de KPC mediante una sinergia entre EDTA-CZA. Las coproductoras de KPC+MBL presentarán un resultado positivo a diferencia de las mutantes de KPC.

## C.2) COLOCACIÓN ESTRATÉGICA DE DISCOS DCMBrit ® (Discos combinados de meropenem, Britania)

Este kit de detección y confirmación de carbapenemasas incluye 5 discos: meropenem (MER), MER + fenil borónico (PB), MER+ cloxacilina, MER + EDTA y MER+ tazobactam. Frente a 30 cepas dobles productoras de carbapenemasas, DCM Brit categorizó a los aislados mayoritariamente como productores de Clase D (según puntos de corte modificados por el LNR, 2017):

- Clase D: 94%
- Clase B: 3%
- Clase A: 3%

Se reevaluó el ensayo, pero con la particularidad de ubicar estratégicamente los discos para potenciar su capacidad diagnóstica y extender su uso a la búsqueda de doble productoras de carbapenemasas



La sinergia entre MER+PB y MERO-EDTA, sugiere coproducción de carbapenemasas KPC+MBL

**En caso de obtener un resultado para Clase D con DCM Brit**, se sugiere repetir el ensayo, enfrentando los discos de MERO+PB y MERO+EDTA (distancia sugerida: 15 mm de centro a centro).

Previo a la repetición del DCM Brit, los laboratorios podrán tamizar con un BCT de tal forma de acelerar el resultado y/o preservar el DCM Brit.

**En caso de obtener un BCT positivo (en general dentro de los 15 min), se procede a la repetición el DCM Brit con los considerandos mencionados.** Si BCT resulta negativo, se interpreta el aislado como productor de Clase D.

**La presencia de sinergia (huevo) entre los discos de MERO+PB y MERO+EDTA (15 mm de centro a centro) indicará la coproducción de KPC+MBL.** En caso de no observarse sinergia, se confirma la presencia de una carbapenemasa Clase D. Todos los aislados de KPC+NDM clasificados como carbapenemasa de Clase D, presentaron huevo entre MERO+PB y MERO+EDTA en la reevaluación (sensibilidad final del ensayo: 96%)

Para aquellos usuarios que opten por colocar estratégicamente los discos de DCM Brit en el primer ensayo, se recomienda:

- En primer lugar, observar e interpretar los deltas entre MERO y MERO+PB o MERO+EDTA,
- En caso de ser alguno de ellos positivo, es decir inhibición por MERO+PB o inhibición por MERO+EDTA, interpretar al aislado como productor de carbapenemasa Clase A (requiere MERO+CLOX negativo) o productor de carbapenemasa Clase B, respectivamente.
- En caso de no observar deltas con MERO+PB, MERO+EDTA; MERO+TAZ, MERO+CLOX, indicativo de posible carbapenemasa Clase D, observar la presencia de sinergia entre los discos de MERO+PB Y MERO+EDTA. En caso de resultar positiva, interpretar el aislado como posible coproductor de KPC+MBL.

Aquellos que opten por este ensayo directo del DCM Brit, con los discos de MERO+PB y MERO+EDTA enfrentados a 15 mm de centro a centro, deberán tener en cuenta que la impredecibilidad de los halos que se pudieran obtener podría dificultar la lectura del ensayo.

#### ***D) Confirmación por inmuno-cromatografías o métodos molecular (PCR)***

Los K-SeT quintuples (NG-Biotech, MedicaTec, Targets KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48like) o séxtuples (Coris, Britania próximamente, KPC, NDM, VIM, IMP, subflia OXA-48-like y subflia OXA-163-like) permiten detectar con 100% de sensibilidad y especificidad la combinación de NDM+KPC, entre otras. Se sugiere realizar la inoculación seleccionando 3 a 4 colonias. En el caso del test NG, se sugiere dejar reposar la suspensión bacteriana con el buffer de extracción unos 15 min previo a la siembra del test.



**ALERTA EPIDEMIOLÓGICO: Emergencia de DOBLES PRODUCTORES DE CARBAPENEMASA KPC+MBL. LNR, INEI-ANLIS Malbrán. 2021**

Para las técnicas moleculares, se podrán emplear sistemas comerciales o desarrollados in-house. El LNR desarrolló y validó un sistema de PCR multiplex para la detección simultánea de los genes codificantes de carbapenemasas de mayor relevancia clínica de Argentina (<http://antimicrobianos.com.ar/2019/10/protocolo-de-pcr-multiplex-para-la-deteccion-de-carbapenemasas/>)

En base a lo expuesto, se sugiere realizar la búsqueda de KPC+MBL mediante alguna de las metodologías fenotípicas recomendadas o pruebas genotípicas/inmuno-cromatográficas frente a alguna de las sigs. **señales de alarma:**

- **aislamientos sospechados de KPC con resistencia a CZA,**
- **cepas sospechadas de MBL (EDTA positivas), resistentes a ATM y BLEE negativa (sinergia ATM-CLA negativa)**
- **aislamientos con sospecha de carbapenemasa que resultan negativas para ambas sinergias (EDTA/APB) (sugestivo de OXA) y con resistencia a CZA y con un BCT (o similares) positivo**

##### **5) Determinación de la sensibilidad a AZTREONAM-AVIBACTAM (AZA)**

Recientemente, la IDSA ha emitido recomendaciones para el tratamiento de infecciones provocadas por gérmenes difíciles de tratar, como las CPE. En el caso de las MBLs, esta normativa sugiere utilizar CZA 3gr q8h junto con ATM 2gr q8h, ambos infundidos simultáneamente y en 3 hs de infusión (Tamma PD, CID 2020). Se debe mencionar que, a la fecha, no existen puntos de corte para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a AZA. CLSI y EUCAST han emitido recomendaciones respectivas para ATM sólo. El estudio de fase 2 de AZA (Rejuvenate, Pfizer®, Cornely O, JAC 2019) ha propuesto puntos de corte para esta combinación, pero asociado a una dosificación de ATM y AVI que resulta imposible de lograr con las presentaciones farmacéuticas de ATM y CZA disponibles actualmente.

Dada la falta de armonización para los puntos de corte de ATM entre estándares, la ausencia (o imposibilidad de adaptar) puntos de corte específicos para la dosificación propuesta por IDSA y la imposibilidad de reproducir la dosis del estudio Rejuvenate, el LNR validó puntos de corte epidemiológicos utilizando una colección de 696 aislamientos de CRE (Pasteran F y cols., ECCMID 2020). **En base a este estudio, se estableció como cepa salvaje aquella que presente una CIM a AZA  $\leq 1.0$   $\mu\text{g/ml}$ .**

La infusión continua de ATM podría alcanza concentraciones en el estado estacionario cercanos a 40  $\mu\text{g/ml}$  y podría ser utilizada esta modalidad para el tratamiento de cepas con CIMes  $> 1.0$   $\mu\text{g/ml}$  (\*Ramsey C, JAC 2016). Sin embargo, en Argentina, cepas con CIMes  $> 1.0$   $\mu\text{g/ml}$  pueden presentar subpoblaciones resistentes (CIM hasta 32-64  $\mu\text{g/ml}$ ), en especial los aislados de *Enterobacter* spp y *K. oxytoca*. Esto resulta crítico particularmente en infecciones severas o potencialmente con alto inóculo.



**El punto de corte epidemiológico recomendado por el LNR permite asegurar ausencia de subpoblaciones resistentes en cepas con CIM  $\leq 1.0$   $\mu\text{g/ml}$  de AZA.**

***Pre-difusión rápida para la sensibilidad a AZTREONAM AVIBACTAM (AZA)***

En el LNR, se validaron distintas estrategias cualitativas o cuantitativas para el tamizaje de la sensibilidad a AZA. Los métodos cuantitativos fueron estandarizados utilizando el punto de corte epidemiológico (WT CIM  $\leq 1.0$   $\mu\text{g/ml}$ ) para los estudios de correlación.

La pre-difusión rápida consiste en exponer brevemente (15 minutos) y a temperatura ambiente al inóculo bacteriano, previamente hisopado en una placa de Mueller Hinton, frente al inhibidor, avibactam en este caso. Luego el reservorio del inhibidor es removido y se expone la bacteria al agente beta lactámico, aztreonam en este caso, siguiendo la incubación tradicional (16-18 hs a 35°C).

Se detalla a continuación el procedimiento.

Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2021/02/protocolo-predifusion-rapida-aztreonam-avibactam/>

# **AZTREONAM-AVIBACTAM**

## **PREDIFUSION RAPIDA**

(Actualización Febrero 2021)

### **ALCANCE DE LA PRUEBA**

Dirigida a Enterobacterales productores de:

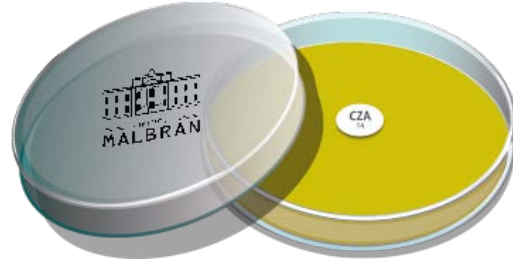
- MBL ATM<sup>R</sup>
- Mutantes KPC CZA<sup>R</sup>
- Búsqueda de co-producción de PER en KPC (la R a ATM-AVI es el mejor predictor)

**SOLO PARA UTILIZAR CON DISCOS DE CZA 14ug**

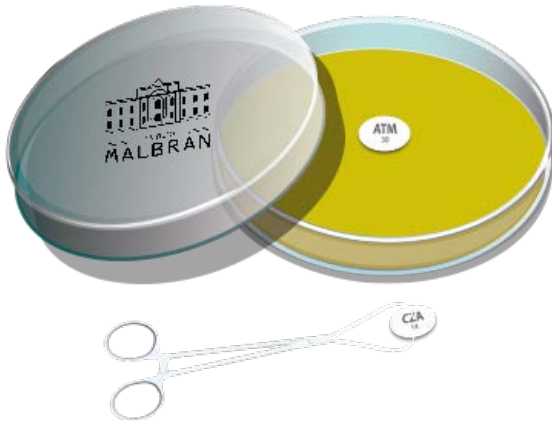
1) Hisope una placa de MHA con una suspensión de la cepa en estudio ajustada al 0,5 McFarland



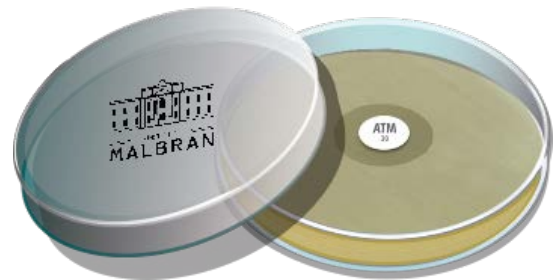
2) Coloque un disco de ceftazidima avibactam (CZA 14 ug).  
Deje reposar a T° ambiente por 15 minutos  
(predifusión rápida)



3) Retire el disco de CZA de manera aséptica,  
y coloque en su lugar un disco de Aztreonam (ATM 30ug)



4) Incubar a 35 - 37° C por 16-18 hs.  
Medir el halo de inhibición.



### 5) INTERPRETACIÓN y REPORTE

Se define un punto de corte epidemiológico (ECOFF) para ATM-AVI (CIM  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) y su halo equivalente mediante la predifusión rápida que permite diferenciar las poblaciones salvajes o wild-type de las no-salvajes. El ECOFF es independiente de las distintas dosificaciones que pudieran emplearse.

Las colonias dentro de la zona de inhibición deberán ser consideradas en la lectura (hetero-resistencia)

**Halo  $\geq 17$  mm, equivalente a CIM  $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ :  
Reportar como cepa SALVAJE  
o sinergia positiva para ATM-AVI**

**Halo  $\leq 15$  mm, equivalente a CIM  $> 1.0 \mu\text{g/ml}$ :  
Reportar como cepa NO-SALVAJE o  
sinergia negativa para ATM-AVI**

**Halos de 16 mm: se sugiere realizar búsqueda de  
OXA-163 (inmuno-cromatografía/PCR preferente):**

✓ Si OXA negativa: controlar discos de CZA (#6) y repetir ensayo

✓ Si OXA positiva: derivar al LNR

### 6) VALIDACION y CONTROL DE CALIDAD

Controlar rutinariamente los discos de CZA 14  $\mu\text{g}$  con alguna de las siguientes cepas:

**K. pneumoniae ATCC 700603 (BLEE+):  
Rango EUCAST: 18 - 24 mm. Target: 21 mm**

**K. pneumoniae ATCC BAA-1705 (KPC+)\*:  
Rango PCC-Malbrán: 15 - 21 mm. Target: 18 mm**

El ensayo requiere discos de CZA con potencia dentro del rango, idealmente en el target o más

Controlar rutinariamente los discos de ATM 30  $\mu\text{g}$  según lineamientos de CLSI

\*Cepa 3 - Encuesta 57 (año 2020) del Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología

## **CONSIDERACIONES FINALES**

El hallazgo de cepas productoras de KPC+MBL debe ser considerado de alto riesgo epidemiológico. Por ello, se requiere del máximo esfuerzo de todos los integrantes de los equipos de salud, en especial del Comité de Control de Infecciones, para la RÁPIDA DETECCIÓN y CONTENCIÓN del mecanismo.

La experiencia del LNR sugiere que la combinación de aztreonam con avibactam resulta la más efectiva in vitro. Sin embargo, a la fecha, no existe consenso internacional sobre la combinación óptima (ni dosificación) para el tratamiento para este tipo de mecanismos. Por la complejidad del tratamiento, éste ha de ser prescrito por especialistas en enfermedades infecciosas.

Las cepas fenotípicamente identificadas como co-productoras KPC+MBL deben ser confirmadas por métodos moleculares o inmuno-cromatográficos (métodos de referencia). Para tal fin, las cepas pueden ser enviadas al Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán", para su inmediata confirmación fenotípica y molecular.

Descargue la planilla de derivación en  
<http://antimicrobianos.com.ar/derivaciones/>

**Fernando Pasteran**  
**Alejandra Corso**  
**Servicio ANTIMICROBIANOS**  
**INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"**  
fpasteran@gmail.com  
[www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar)



## Bibliografía:

1. Emergence of Enterobacterales with co-expression of two carbapenemases during COVID-19 pandemic in Argentina: KPC+NDM, NDM+OXA-48 and KPC+IMP. Fernando Pasteran , Paola Ceriana , Celeste Lucero , Diego Faccone , Sonia Gomez, Denise De Belder , Belen Sanz, Juan Manuel De Mendieta, Florencia Martino, Alejandra Corso. Servicio Antimicrobianos, INEI ANLIS "Dr. C. Malbrán" - Buenos Aires (Argentina). ECCMID 2021.  
**Disponible en:** <http://antimicrobianos.com.ar/2021/04/emergence-of-enterobacterales-with-co-expression-of-two-carbapenemases-during-covid-19-pandemic-in-argentina/>
2. Validation of a rapid prediffusion disk assay to determine aztreonam plus avibactam (ATM-AVI) susceptibility for carbapenemase producing Enterobacterales (CPE), Fernando Pasteran, Magali Chavez, Paola Ceriana, Celeste Lucero, Alejandra Menocal, Sonia Gomez , Alejandra Corso. Servicio Antimicrobianos, INEI ANLIS "Dr. C. Malbrán" - Buenos Aires (Argentina). ECCMID 2021.  
**Disponible en:** <http://antimicrobianos.com.ar/2021/04/validation-of-a-rapid-prediffusion-disk-assay-to-determine-aztreonam-plus-avibactam-atm-avi-susceptibility-for-carbapenemase-producing-enterobacterales-cpe/>
3. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and Pseudomonas aeruginosa with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. aeruginosa). Pranita D Tamma , Samuel L Aitken, Robert A Bonomo , Amy J Mathers, David van Duin, Cornelius J Clancy. Clin Infect Dis. 2021 Apr 8;72(7):1109-1116. doi: 10.1093/cid/ciab295.  
**Disponible en:** <https://academic.oup.com/cid/article/72/7/1109/6217047>
4. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. Antimicrob Chemother. 2016 Oct;71(10):2704-12. doi: 10.1093/jac/dkw231.  
**Disponible en:** <https://academic.oup.com/jac/article/71/10/2704/2198366>



RED WHONET  
ARGENTINA  
RED NACIONAL DE VIGILANCIA DE LA  
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS



ANLIS  
MALBRÁN  
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS  
EMITIDORES DE SALUD "DR. CARLOS G. MALBRÁN"



Ministerio de Salud  
Argentina