



BOLETIN INFORMATIVO N°6–NOVIEMBRE 2023

Comentarios extendidos Encuesta N° 60

Cepa N°1: *Acinetobacter baumannii*

La Cepa N°1 de esta encuesta correspondía a un *Acinetobacter baumannii* aislado de minibal de un paciente con neumonía asociada a ventilación mecánica.

A. baumannii desde hace varias décadas se ha instalado como un importante agente de infecciones hospitalarias severas. Es un agente frecuente de neumonía nosocomial, infecciones del torrente sanguíneo, del tracto urinario, heridas e infecciones de piel y partes blandas en pacientes quemados, entre otras. La capacidad para sobrevivir en ambientes secos y húmedos, y de formar *biofilms* que favorecen su persistencia en superficies y dispositivos médicos, sumada a la resistencia a antibióticos y desinfectantes, lo convierten en una amenaza para pacientes inmunosuprimidos. Una de las principales preocupaciones en la clínica es la capacidad de *A. baumannii* de adquirir resistencia a múltiples antimicrobianos, principalmente a carbapenemes, lo cual complica la elección de un tratamiento efectivo.

El porcentaje de resistencia de *A. baumannii* a carbapenemes en Latinoamérica es uno de los más altos a nivel global. Existen variaciones entre los distintos países (1-90%) con los valores más bajos en América Central y los mayores en Perú, Argentina y Brasil. Datos de RELAVRA (Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos) muestran un incremento en la resistencia a carbapenemes en la Región que fue del 1-

86% en 2011 a 33-98% en 2019. En Argentina, el Informe Anual de la Vigilancia de la RAM-2022 señala 88,8% de resistencia a carbapenemes.

Cuatrocientos ocho laboratorios enviaron respuestas para este aislamiento. El 99% de los participantes contestaron correctamente la identificación de esta cepa. Debido a las dificultades que genera la identificación de este microorganismo a nivel de especie, en esta oportunidad se consideraron correctas las respuestas: *A. baumannii*, Complejo *Acinetobacter calcoaceticus- baumannii* y *Acinetobacter* sp. En la tabla 1.a se muestra la distribución de respuestas recibidas.

Tabla 1.a.Cepa 1: Identificación bacteriana: Respuestas de los participantes (N=408)

Identificación	Número	%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	276	67,7
Complejo <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	49	12
<i>Acinetobacter</i> sp.	79	19,3
Otros: <i>K. oxytoca</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	4	1

La cepa N°1-ENC 60 presenta una **carbapenemasa del tipo metalo-β-lactamasa (MBL)** caracterizada como **New Delhi Metalo-β-lactamasa (*bla*NDM-1)** y una **β-lactamasa de espectro extendido *bla*PER-7**. Presenta resistencia a ampicilina-sulbactam (AMS), ceftazidima (CAZ), meropenem (MER) y amikacina (AKN), y sensibilidad a minociclina (MIN) y colistín (COL) (Tabla 1b).

Tabla 1.b.Cepa 1: Resultados de sensibilidad según distintas metodologías disponibles:

	Difusión discos (mm)	PhoenixM50 (µg/ml)	Vitek2C (µg/ml)	Sensititre (µg/ml)	Interpretación
Ceftazidima	06	>16	>=64	>32	R
Meropenem	06	>32	>=16	>16	R
Ampicilina/sulbactam	06	>16/8	>=32/16	>16/8	R
Amikacina	06	>32	>=64	>32	R
Minociclina	18-26	#ND	#ND	≤4	S
Colistín*	-	≤1**	<=0,5**	≤1	S

#ND: no disponible

* La Cepa 1 presenta CIM a colistín de 2 µg/ml por la metodología de macrodilución en caldo.

****NOTA:** Vitek2C y PhoenixM50 NO son metodologías aceptadas para evaluar la sensibilidad a colistín. Se debe recordar que estos métodos automatizados, así como la difusión con discos y los métodos epsilométricos no son métodos recomendados para informar la sensibilidad a colistín ya que por lo general arrojan resultados de Falsa Sensibilidad (error muy mayor). CLSI y EUCAST recomiendan la microdilución en caldo como método de referencia. Recientemente CLSI recomendó la elusión con discos de colistín y el agar spot como metodologías aceptadas para Enterobacterales y *Pseudomonas* spp. Luego de diversos estudios, el Laboratorio Regional de Referencia (LNR) publicó sus propias recomendaciones agregando otras metodologías como el “Colistín Drop-test” y la “Predifusión con tabletas de colistín” haciendo extensivo su uso a *Acinetobacter* spp. Ver documento en el siguiente link:

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

Cepa 1: Pruebas fenotípicas adicionales:

- Colistín Drop Test: presencia de halo (Sensible a colistín)
- Sinergia IMP-EDTA-MER: Positiva
- Blue-Carba-Test: Positivo (dentro de la primera hora)
- CARBA-NP DIRECT: Positivo (dentro de la primera hora)

La sinergia entre los discos de IMP-EDTA-MER es indicativo de la presencia de una metalo- β -lactamasa. La actividad carbapenemasa fue confirmada con los métodos de **Blue-Carba-Test** (Ensayo colorimétrico rápido para la búsqueda de carbapenemasas basado en la hidrólisis de IMP, adaptado de *Pires J. y col., J Clin Microbiol. 2013; 51: 4281-3. Pasteran F. y col., J Clin Microbiol. 2015; 53:1996-8.* <http://antimicrobianos.com.ar/2014/10/protocolo-de-blue-carba/>) y **CARBA-NP DIRECT** (Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo, adaptado de *Pasteran F. y col. J Clin Microbiol. 2015; 53:3908-11.* <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/12/CARBA-NP-DIRECT-v3-21.pdf>). **Recordar que para la búsqueda de carbapenemasas tipo MBL en *Acinetobacter* spp., los métodos colorimétricos Blue-Carba-Test y CARBA-NP DIRECT deben leerse e interpretarse dentro de la 1era. hora de incubación.**

Los resultados de los estudios de PCR y WGS indican que la **Cepa 1** presenta los genes adquiridos *bla*NDM-1 y *bla*PER-7, las enzimas cromosómicas ADC-24 (AmpC) y *bla*OXA-51 y pertenece al secuenciotipo ST25. Se obtuvieron resultados negativos por PCR y WGS para los genes *bla*VIM, *bla*IMP, *bla*SPM, *bla*KPC, *bla*OXA-23, *bla*OXA-24/40, *bla*OXA-48, *bla*OXA-58, *bla*OXA-143, *bla*CTX-M, *bla*SHV y *bla*TEM.

La resistencia a carbapenemes en esta especie se asocia a la producción de carbapenemasas de naturaleza oxacilinasas. Las más frecuentes son las de clase D (carbapenemasas del tipo OXA) adquiridas (grupo *bla*OXA-23, grupo *bla*OXA-24/40, grupo *bla*OXA-58, grupo *bla*OXA-143 y/o grupo *bla*OXA-235) seguidas por la oxacilinasas cromosómica de la genomoespecie *baumannii* (*bla*OXA-51) y las metalo- β -lactamasas (MBL) como IMP, VIM y NDM. Las carbapenemasas del tipo OXA exhiben débil actividad sobre los carbapenemes, sin embargo pueden conferir resistencia cuando se suma la impermeabilidad (déficit de *opmA* y/o *CarO*) y la presencia de secuencias de inserción (ISAba) río arriba del gen. OXA-51 es una carbapenemasa constitutiva y mayormente cromosómica en *A. baumannii* y es usada como marcador de especie. Sin embargo, el gen *bla*OXA-51, también fue encontrado en plásmidos en *Acinetobacter* no-*baumannii*. OXA-23 es la carbapenemasa adquirida más diseminada a nivel global, incluida Latinoamérica en *A. baumannii* resistentes a los carbapenemes, seguida por OXA-58 y OXA-143 en menor medida.

Las carbapenemasas del tipo MBL fueron inicialmente reportadas de forma esporádica en esta especie. Los primeros aislamientos de la región correspondieron a productores de IMP, pero en los últimos años se ha visto un marcado aumento de NDM. Si bien NDM se ha diseminado globalmente a expensas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, *Acinetobacter* spp. es reconocido como un reservorio de los genes de resistencia *bla*NDM-1 tanto en aislados clínicos, como ambientales, de animales para consumo y alimentos. En Argentina, la diseminación de NDM en *A. baumannii* es un fenómeno reciente, mediado principalmente por la expansión clonal de ST25. La **Cepa1** pertenece a este ST y presenta el gen *bla*NDM-1 localizado en el transpón *Tn125* insertado en el cromosoma. También presenta una isla de genes de resistencia donde se localiza el gen que codifica para la BLEE *bla*PER-7, genes de resistencia a aminoglucósidos (*armA*), a rifampicina (*arr*) y a fosfomicina (*fosA*), entre otros. La coproducción de PER en la mayoría de los miembros

del ST25, comprometerá la actividad de cefiderocol, cuando se halle disponible en la región.

La presencia de NDM (a diferencia de las OXAs y otras MBLs como IMP) confiere a aproximadamente el 95% de los aislados que la portan un alto nivel de resistencia a sulbactam (CIM \geq 64 mg/L), lo cual afecta a una de las principales opciones terapéuticas propuestas recientemente por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA). La capacidad de distinguir entre aislados intermedios (CIM 8 mg/L) y resistentes (CIM \geq 16 mg/L) a sulbactam podría resultar especialmente valiosa en aquellos productores de carbapenemasas diferentes a NDM, ya que permitiría ajustar las dosis de manera acorde al nivel de resistencia del aislado.

La búsqueda de carbapenemasas del tipo MBL en *A. baumannii*, debe ser un punto importante en el diagnóstico del laboratorio, debido a su aumento exponencial y la oportunidad de contener su diseminación tanto en *Acinetobacter* spp. como en otras especies. La implementación de la sinergia con EDTA y el Blue CARBA o el CARBA NP direct (leídos entre 30 y 60 minutos) son una herramienta importante para diferenciar los productores de MBL de los productores de carbapenemasas del tipo OXA (que por lo general dan resultados positivos a partir de los 60 minutos). El uso simultáneo de EDTA y métodos colorímetros, además de potenciar la detección de cepas productoras de MBL, permite identificar la emergencia de dobles productores de carbapenemasas en *Acinetobacter* spp., un fenómeno reciente ocurrido durante la pandemia de COVID-19.

Respecto al “Mecanismo de resistencia inferido”, la respuesta que se consideró totalmente correcta es **“CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)”** ya que en esta cepa, la BLEE no era fácil de distinguir fenotípicamente. También se consideraron válidos los mecanismos “CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE”, “CARBAPENEMASA” y “CARBAPENEMASA + BLEE”. El 89% (355/400) de los laboratorios informó “CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)” y el 6% (22/400) reportó “CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE”. Diez participantes informaron “CARBAPENEMASA” y dos “CARBAPENEMASA + BLEE”. En términos generales podemos concluir que el 97,3% infirió correctamente el mecanismo presente en la Cepa 1.

Tabla 1c. Cepa 1: Mecanismo de resistencia inferido.

Mecanismo de resistencia inferido: Respuestas de los participantes (N:400)		
Identificación	Número	%
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)	355	88,8
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE	22	5,5
CARBAPENEMASA	10	2,5
CARBAPENEMASA + BLEE	2	0,5
CARBAPENEMASA tipo OXA	5	1,3
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR APB (KPC) + CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)	2	0,5
AMPC+ IMPERMEABILIDAD	1	0,3
BLEE+ IMPERMEABILIDAD	1	0,3
MLSb CONSTITUTIVO	1	0,3
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + R a Azitromicina	1	0,3

En color se resaltan los mecanismos considerados correctos por el LNR.

Análisis de concordancia entre los laboratorios participantes y el LNR

En la Tabla 1.d. se muestran los rangos de referencia establecidos por el método de difusión y la interpretación correspondientes a los antibióticos evaluados en la Cepa 1 (excepto colistín).

Tabla 1d. Cepa1. Rangos de referencia establecidos por el LNR e interpretación. Método de difusión con discos.

Antibiótico	Rango de referencia (mm)	Interpretación
Ampicilina/sulbactam	06-06	Resistente
Ceftacidima	06-06	Resistente
Meropenem	06-06	Resistente
Amikacina	06-06	Resistente
Minociclina	18-26	Sensible

Concordancia en la Interpretación de las pruebas de Sensibilidad.

La Cepa 1 no presentó dificultades en la interpretación (categorización del aislamiento S/I/R). Se obtuvo una concordancia con el LNR >95%, para todos los antibióticos

evaluados. Los errores en la categoría de interpretación fueron < 1% en todos los casos: errores muy graves 0,3%, graves 0,7% y menores 0,7%. Los errores muy graves estuvieron asociados a AMS, MER y AKN y los errores graves a MIN y COL (Tabla 1.e). En el caso de COL, desde el LNR seguimos utilizando la normativa EUCAST. Los aislamientos de Enterobacterales y *Acinetobacter* spp. se informan según los puntos de corte Sensible $\leq 2\mu\text{g/ml}$, Resistente $\geq 4\mu\text{g/ml}$. Para el caso de *Pseudomonas* spp. Sensible $\leq 4\mu\text{g/ml}$, Resistente $\geq 8\mu\text{g/ml}$. Es importante resaltar que el informe de los polipéptidos debe ir acompañado de una nota donde se indique: “Colistín no debe ser utilizado como monoterapia excepto en casos de infección del tracto urinario no complicada. Para infecciones sistémicas debe usarse en tratamiento combinado. Por otra parte, hay que tener en consideración que el uso de colistín para el tratamiento de infecciones respiratorias es controvertido y podría no ser eficaz, por lo que esta droga no está recomendada para el tratamiento de neumonía ya que su actividad en el líquido de revestimiento epitelial pulmonar es subóptima y, por lo general, no produce una eliminación bacteriana adecuada en los pulmones” (Pogue J. M. et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2020 64(2):e01495-19.). Según las últimas recomendaciones de IDSA, los agentes polipeptídicos (preferentemente polimixina B) podrían considerarse en combinación con al menos otro agente para el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* resistente a carbapenemes.

Tabla 1.e. Cepa 1: Concordancia en la interpretación de las pruebas de sensibilidad

Antibiótico	Nº respuestas	S		I		R	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ampicilina/sulbactam	407	4	1	2	0,5	401	98,5
Ceftacidima	406	---	---	1	0,25	405	99,75
Meropenem	400	2	0,5	1	0,25	397	99,25
Amikacina	406	2	0,5	1	0,25	403	99,25
Minociclina	396	381	96,2	4	1	11	2,8
Colistin	363	350	96,4	7	1,9	6	1,7

- Resultado correcto
- Errores menores
- Errores graves
- Errores muy graves

Concordancia de los halos de inhibición con el Rango de Referencia

Teniendo en cuenta los Rangos de Referencia obtenidos por el LNR, la concordancia obtenida fue excelente, >95%, para CAZ y AMK, y muy buena, >85%, para el resto de los antibióticos evaluados: AMS: 85,5%, MER: 89,4% y MIN: 89,3%. Tabla1.f.

Tabla 1 f. Cepa 1: Rangos de Referencia y concordancia de las zonas de inhibición entre los laboratorios participantes y el LNR.

Antibiótico	Rango de referencia (mm)	Nº respuestas	Concordancia con el Rango de Referencia	
			Nº	(%)
Ampicilina/sulbactam	06-06	269	230	85,5
Ceftacidima	06-06	265	257	97
Meropenem	06-06	264	236	89,4
Amikacina	06-06	276	263	95,3
Minociclina	18-26	355	317	89,3

Resumen de resultados Cepa 1.

Concordancia global entre los laboratorios participantes y el LNR

Parámetro Evaluado	Concordancia Global (%)
Identificación bioquímica	99%
Interpretación de pruebas de sensibilidad	98,3
Halos de inhibición	91,2
Inferencia de mecanismo	97,3%

Bibliografía:

- Adams MD, Pasteran F, Traglia GM, Martinez J, Huang F, Liu C, et al. Distinct mechanisms of dissemination of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp. In Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e00324–20.
- Rodriguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50:327–33.
- Ramirez MS, Bonomo RA, Tolmasky ME. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules* 2020; 10, 720.
- Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. *Clin Infect Dis*. 2023 Jul 18:ciad428. doi: 10.1093/cid/ciad428. Epub ahead of print. PMID: 37463564.

Cepa N°2: *Staphylococcus epidermidis*

La Cepa N° 2 de esta encuesta correspondía a ***Staphylococcus epidermidis*** aislado de hemocultivo de un paciente con bacteriemia.

S. epidermidis forma parte de la flora de la piel humana, pero también puede causar infecciones nosocomiales, como infecciones asociadas a dispositivos, especialmente en grupos de pacientes críticos. *S. epidermidis* presenta resistencia a diversos antibióticos, y entre el 60% y el 70% de los aislados de *S. epidermidis* presenta resistencia a los antibióticos de primera línea comúnmente utilizados, incluidos los β -lactámicos.

Linezolid es una de las opciones de tratamiento para infecciones producidas por bacterias Gram-positivas multirresistentes, incluyendo *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *E. faecium* resistente a la vancomicina (VRE), por lo que la emergencia de resistencia es preocupante. Si bien la resistencia a linezolid a nivel global es baja tanto en estafilococos como en enterococos, en los últimos años se describieron varios brotes y casos de transmisión nosocomial de *S. epidermidis* resistente a linezolid.

La resistencia a linezolid puede deberse a mutaciones en el ARNr 23S y/o en las proteínas ribosómicas L3 y/o L4, y también a la adquisición de genes de resistencia (*cfr*, *cfr-like*, *optrA* y *poxtA*) que se diseminan mediante elementos genéticos móviles).

En estafilococos coagulasa negativos, el mecanismo de resistencia más frecuente es la adquisición del gen *cfr*, que codifica una metiltransferasa que metila el ARNr 23S y confiere resistencia combinada a cinco familias de antibióticos. El fenotipo resultante se denomina PhLOPS_A y presenta resistencia a fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas A.

En la presente encuesta 409/459 laboratorios (89,1%) enviaron respuesta para este aislamiento.

El 86,7% de los participantes respondieron correctamente la identificación de género y especie: *Staphylococcus epidermidis* (Tabla 2.a).

Tabla 2.a. Cepa 2. Identificación bacteriana: Respuestas de los participantes (N=407)

Identificación	Número	%
Género y especie correcto	353	86,7
Género correcto y especie incorrecta	46	11,3
Género incorrecto	8	2

Con respecto a la sensibilidad, esta cepa presentaba **Resistencia transferible a Linezolid mediada por el gen *cfr* y Resistencia a Meticilina mediada por el gen *mecA*** (Tabla 2.b)

Tabla 2.b. Cepa 2. Resultados de la secuenciación completa del genoma de la Cepa 2: genes relacionados a mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

Gen	Resistencia asociada
<i>blaZ</i>	Penicilina
<i>mecA</i>	Meticilina
<i>cfr</i>	Linezolid, cloranfenicol, florfenicol, clindamicina, lincomicina
<i>dfr</i>	Trimetoprima

<i>folP</i>	Sulfonamidas
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina)
<i>aadD</i>	Aminoglucósidos (amicakina, tobramicina)
<i>erm(T)</i>	Eritromicina, clindamicina, lincomicina
<i>lsa(B)</i>	Clindamicina, lincomicina
<i>fusB</i>	Acido fusídico
<i>fosB</i>	Fosfomicina
<i>bleO</i>	Bleomicina
<i>mupA</i>	Mupirocina

La Cepa 2 presentaba resistencia a linezolid, oxacilina, gentamicina y trimetoprima/sulfametoxazol y sensibilidad a vancomicina. Se observó correlación total entre el fenotipo de resistencia y los genes detectados.

En la Tabla 2.c se detallan los valores de las pruebas de sensibilidad por las diferentes metodologías ensayadas.

Tabla 2.c. Cepa 2. Resultados de sensibilidad según las distintas metodologías disponibles

Antibiótico	Difusión discos (mm)	Phoenix (mg/L)	Vitek-2 (mg/L)	Interpretación
Oxacilina	6	>2	≥4	R
Cefoxitina	6	>4	Pos	OXA R
Linezolid	20	8	≥8	R
Gentamicina	6	>8	≥16	R
Trimetoprima/sulfametoxazol	6	>2	8	R
Vancomicina	--	2	1	S

La CIM a linezolid también fue evaluada por Epsilometría 4 mg/L y Sensititre 8 mg/L. Adicionalmente, el aislado presentaba sensibilidad a daptomicina CIM 0,5 mg/L y minociclina CIM ≤0,5 mg/L, y resistencia a cloranfenicol CIM >16 mg/L, rifampicina CIM ≥32 mg/L, ciprofloxacina CIM >2 mg/L, eritromicina CIM ≥8 mg/L y clindamicina CIM ≥4 mg/L, con fenotipo MLS_B constitutivo.

Concordancia en la categoría de interpretación.

La totalidad de los participantes informaron correctamente la resistencia a oxacilina. Cefoxitina fue ensayada por 386 participantes, 379 (99,5%) informaron correctamente la resistencia a oxacilina, 2 informaron sensible a oxacilina y 5 laboratorios informaron resistencia a cefoxitina (a pesar que en el desplegable solo figuraban las opciones OXA-R y OXA-S), opción que se consideró incorrecta.

Recomendamos fuertemente no informar opciones que no están disponibles en el desplegable porque el programa no las puede analizar.

Gentamicina y trimetoprima/sulfametoxazol fueron informadas correctamente como resistentes por el 98,5% de los participantes y vancomicina como sensible por 97% de los laboratorios (Tabla 2.d). Cabe destacar que tratándose de una cepa aislada de bacteriemia, es relevante realizar la CIM a vancomicina. Recordamos que en *Staphylococcus* spp no se debe informar la sensibilidad a vancomicina por el método de difusión.

La detección de la resistencia a linezolid presentó dificultades, ya que solo el 46% de los participantes informó la cepa como resistente, 0,5% intermedio y 53,5% como sensible. El rango de las zonas de inhibición para linezolid determinado en el LNR fue 17-24 mm. El CLSI establece que las zonas de inhibición de linezolid deben leerse con luz transmitida, y deben considerarse las colonias o zona difusa dentro del halo de inhibición, si las hubiera.

Algunos autores sugieren que la lectura del halo de inhibición de linezolid a las 48h puede mejorar la detección de la resistencia en cepas con sensibilidad borderline.

En el LNR se evaluó la prueba de difusión de linezolid en la Cepa 2 con dos marcas de MH y se realizó la lectura a dos tiempos de incubación: (i) 16-18 horas, tiempo sugerido por CLSI, y (ii) 48 horas. El promedio de las zonas de inhibición a linezolid obtenidas de 13 determinaciones leídas entre las 16-18 horas fue de 20,4 mm, mientras que el promedio de 14 determinaciones leídas a las 48 horas fue de 16,3 mm, ambos correspondientes a la categoría resistente.

Por lo expuesto previamente sugerimos desde el LNR que en los aislamientos de *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. con sensibilidad borderline a linezolid se inspeccionen detenidamente las zonas de inhibición en búsqueda de microcolonias o

pátina, y se extienda el tiempo de incubación a 48 horas para detectar los mecanismos de resistencia de bajo nivel y evitar errores muy mayores de falsa sensibilidad.

Tabla 2.d. Cepa 2. Resultados de la categoría de interpretación

Antibiótico	Nº de respuestas	Resistente		Intermedio		Sensible	
		N	%	N	%	N	%
Oxacilina	384	384	100	-	-	-	-
Cefoxitina	381	379	99,5	-	-	2	0,5
Linezolid	385	177	46	2	0,5	206	53,5
Gentamicina	403	397	98,5	-	-	6	1,5
Trimetoprima/sulfametoxazol	403	397	98,5	-	-	6	1,5
Vancomicina	372	8	2,2	3	0,8	361	97

- Resultado correcto
- Errores menores
- Errores graves
- Errores muy graves

Concordancia en el mecanismo de resistencia inferido

En cuanto al mecanismo de resistencia inferido, la respuesta totalmente correcta fue “RESISTENCIA A LINEZOLID + METICILINO RESISTENCIA”, reportada por 127/391 (32,5%) participantes, seguida por “METICILINO RESISTENCIA + MLSb CONSTITUTIVO” reportado por 109/391 (27,9%) participantes y “METICILINO RESISTENCIA” reportada por 146/391 (37,3%), respuestas que en esta oportunidad también se consideraron correctas (Tabla 2.e)

Tabla 2.e. Cepa 2. Mecanismo de resistencia inferido: respuestas de los participantes (N: 391)

Mecanismo de resistencia inferido	Número	%
RESISTENCIA A LINEZOLID + METICILINO RESISTENCIA	127	32,5
METICILINO RESISTENCIA + MLSb CONSTITUTIVO	109	27,9
METICILINO RESISTENCIA	146	37,3
METICILINO RESISTENCIA + EFLUJO DE MACROLIDOS	4	1

METICILINO RESISTENCIA + MLSb INDUCIBLE	3	0,8
MLSb CONSTITUTIVO	1	0,3
VISA	1	0,3

Concordancia con el diámetro de los halos de inhibición

En la Tabla 2.f se muestran los rangos de referencia establecidos para el método de difusión y el porcentaje de concordancia con el Rango de Referencia para los antibióticos evaluados.

Tabla 2.f. Cepa 2. Concordancia de los halos de inhibición con los Rangos de Referencia establecidos por el LNR

Antibiótico	Rango de Referencia (mm)	Concordancia (%)
Oxacilina	06-06	96,8
Cefoxitina	06-09	85,2
Linezolid	17-24	42,3
Gentamicina	06-06	93,8
Trimetoprima/sulfametoxazol	06-06	96,2

Debido a la dispersión observada en los resultados de la prueba de difusión con discos de linezolid, en esta oportunidad no se evaluó la interpretación ni la concordancia con las zonas de inhibición. Ciento cuarenta y dos laboratorios informaron halos de inhibición por arriba del rango de referencia. Se evaluó la distribución de zonas de inhibición a linezolid informados por los laboratorios participantes de acuerdo a la marca de discos utilizada (Britania, Difco, Liofilchem, Oxoid y Rosco) y no se encontraron diferencias significativas entre las distintas marcas sugiriendo que el motivo de la dispersión de resultados se debió a la dificultad en la lectura de los halos de inhibición. La concordancia con los Rangos de Referencia para el resto de las drogas evaluadas fue >85%.

Resumen de resultados Cepa 2

Concordancia global entre los laboratorios participantes y el LNR

Parámetro Evaluado	Concordancia Global (%)
Identificación bioquímica	86,7%
Interpretación de pruebas de sensibilidad	90 %
Halos de inhibición	82,3 %
Inferencia de mecanismo "Resistencia a Linezolid"	46 %
Inferencia de mecanismo "Meticilino resistencia"	99.5 %

Bibliografía:

Campmann, F.; Tönnies, H.; Böing, C.; Schuler, F.; Mellmann, A.; Schwierzeck, V. Molecular Characterization of Clinical Linezolid-Resistant *Staphylococcus epidermidis* in a Tertiary Care Hospital. *Microorganisms* 2023, 11, 1805. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071805>

Brenciani A, Morroni G, Schwarz S, Giovanetti E. Oxazolidinones: mechanisms of resistance and mobile genetic elements involved. *J Antimicrob Chemother.* 2022 Sep 30; 77(10):2596-2621. doi: 10.1093/jac/dkac263

Jiang F, Kong Z, Liu K, Cheng C, Jiang T, Ma P, Li R. Phenotypic and genotypic characterisation of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci possessing cfr-carrying plasmid. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022 Mar; 28:226-232. doi: 10.1016/j.jgar.2022.01.008.

Cepa N°3: *Klebsiella pneumoniae*

La Cepa N°3 de esta encuesta correspondía a *K. pneumoniae* aislada de una muestra de urocultivo de un paciente con infección urinaria alta. Cuatrocientos ocho laboratorios de 459 (89,1%) enviaron respuesta para este aislamiento.

98,8% de los participantes (403 laboratorios) contestaron correctamente la identificación de género y especie: *Klebsiella pneumoniae*. Solo 1 participante informó

género correcto (sin especie), 2 informaron género correcto pero especie incorrecta (*K. aerogenes* y *K. oxytoca*) y 2 laboratorios informaron género y especie incorrectos (*Enterococcus* spp.) debiéndose probablemente a una contaminación. (Tabla 3a).

Tabla 3a. Cepa 3: Concordancia en la Identificación bioquímica.

Respuestas de los participantes (N:408)		
Identificación	Número	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	403	98,8
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,2
<i>Enterococcus</i> spp.	2	0,5

Con respecto a la sensibilidad, esta cepa presentaba resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aztreonam, carbapenemes y ceftazidima-avibactam mediada por la co-producción de una **carbapenemasa del tipo metalo- β -lactamasa (MBL) caracterizada como New Delhi Metalo-beta-lactamasa-5 (NDM-5)** y una **β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) del tipo CTX-M-15.**

En la Tabla 3b se muestra el perfil de sensibilidad obtenido por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) y los resultados de interpretación considerados como válidos para los antimicrobianos requeridos en la encuesta.

Tabla 3b. Cepa3: Resultados de sensibilidad con distintas metodologías obtenidos por el LNR.

Antibiótico	Difusión discos (mm)	Vitek 2C (μg/ml)	Phoenix M50 (μg/ml)	Microdilución (Sensititre) (μg/ml)	Método Epsilométrico (μg/ml)	Interpretación
Meropenem	20	≥ 16	4/ 8/16	2	1	Apto para terapia combinada
Ceftazidima/ Avibactam (AVI)	06	-	>8	-	-	R
Amikacina	06	≥ 64	>32	>32	-	R
Aztreonam (ATM)	15	-	>16	>16	-	R
Fosfomicina	20	-	≤ 16	-	-	S

Predifusión ATM- AVI	27	-	-	-	-	Sinergia positiva/cepa salvaje
ATM-AVI (CIM)	-	-	-	≤0,12 (Dilución en agar)	-	S
Imipenem según algoritmo LNR ¹	18	≥16	>8	2		Sospecha de carbapenemasa

¹ <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/11/ALGORITMO-ETB-2021.pdf>

Dependiendo de la CIM a meropenem obtenida, un aislamiento puede considerarse **“Apto para terapia combinada” (CIM ≤ 8ug/ml)** o **“NO Apto para terapia combinada” (CIM ≥ 32ug/ml)**. Esta interpretación también se puede aplicar a la difusión con discos utilizando los puntos de corte del LNR de: **halos ≥ 14mm “Apto para terapia combinada” y halos ≤ 13mm “NO Apto para terapia combinada”**.

La interpretación correcta de meropenem para la Cepa 3 es “Apto para terapia combinada” basándonos en los resultados obtenidos con microdilución. Este punto será retomado en profundidad más adelante cuando se discutan los resultados de los laboratorios.

Mediante WGS se determinó que el aislamiento pertenece al ST307 y se detectaron los genes de resistencia que figuran en la Tabla 3c. Se observó concordancia entre el fenotipo y los genes de resistencia a los antimicrobianos asociados.

Tabla 3c. Cepa 3: Resultados de secuenciación de genoma completo de la Cepa 3. Genes relacionados a mecanismos de resistencia a los antimicrobianos:

Clasificación	Genes de resistencia antimicrobiana	Resistencia asociada
Carbapenemasa Clase B:	blaNDM-5	Beta-lactámicos = carbapenemes
Beta-lactamasa de espectro extendido Clase A:	blaSHV-28, blaCTX-M-15	Beta-lactámicos = cefalosporinas de espectro extendido (cefotaximasas)
Beta-lactamasa de espectro ampliado Clase A:	blaTEM-1, blaOXA-1	Beta-lactámicos = cefalosporinas de espectro ampliado
Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQR)	qnrS1, aac(6')-Ib-cr5	Quinolonas
Mecanismos cromosómicos de resistencia a quinolonas	Mutaciones en <i>gyrA</i> (S83I) y <i>parC</i> (S80I)	Quinolonas (resistencia de alto nivel)

Dihidrofolato reductasa (mutada)	<i>dfrA12</i>	Trimetroprima
Macrólido 2'-phosphotransferasa	<i>mph(A)</i>	Macrólidos
Metilasa	<i>rmtB1</i>	Aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina)
Fosforilasas	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	Aminoglucósidos (estreptomicina)
Nucleotidil transferasa	<i>aadA2</i>	Aminoglucósidos (estreptomicina)

Antecedentes

En 2013, se describe la emergencia de MBL de tipo NDM en Argentina en aislamientos de *Providencia rettgeri* (Pasteran F. y col. 2014., Journal of Global Antimicrobial Resistance 2:344–345). En esos primeros años la diseminación de NDM en Argentina fue a expensas de la tribu Proteeae (principalmente *P. stuartii*, *P. mirabilis* y *P. rettgerii*) pero a partir de 2018 se observó un aumento de aislamientos de *K. pneumoniae* productora de NDM que se potenció a partir de la pandemia COVID-19 (60 aislamientos derivados al LNR en 2019 vs 170 en 2021). Más recientemente, datos del Proyecto RECAPTAR (LNR. Estudio Multicéntrico Argentino de Prevalencia de Enterobacteriales Productores de Carbapenemasas – el desafío de la RAM Post pandemia COVID-19- RECAPTAR, <http://antimicrobianos.com.ar/2023/01/estudio-multicentrico-argentino-de-prevalencia-de-enterobacteriales-productores-de-carbapenemasas-el-desafio-de-la-ram-post-pandemia-covid-19-recaptar/>) muestran que, en 2021, los productores de NDM superaron a los productores de KPC entre los Enterobacteriales resistentes a carbapenemes (41% vs 39.5%).

La presencia de enzimas de tipo MBL tiene impacto directo en la elección correcta del tratamiento antimicrobiano y en las acciones referidas al control de infecciones para evitar su diseminación. La ausencia de inhibidores activos contra las MBL y la resistencia a múltiples familias de antimicrobianos que presentan estos aislamientos limitan las opciones terapéuticas. Por lo tanto, es importante detectar estos mecanismos de manera temprana y precisa.

Aztreonam muestra eficacia contra las carbapenemasas de clase B o MBL, pero carece de actividad frente a las BLEE o carbapenemasas de clase A y D, comúnmente presentes en los aislamientos que producen NDM. Por ende, se recomienda la combinación de aztreonam con un inhibidor del tipo DBO (diazobiciclo octano) como avibactam para

abordar estos aislamientos. Dado que aún no existe una formulación farmacéutica que contenga ambas drogas, se recurre al tratamiento combinado de aztreonam con ceftazidima/avibactam.¹

¹ Ceftazidima /avibactam 2.5gr IV cada 8 hs en infusión de 3 hs + Aztreonam 2gr IV cada 6-8hs (se prefiere cada 6hs si es posible), en infusión de 3 hs (<https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/practice-guidelines/amr-guidance/1.0/idsa-amr-guidance-v3.0-supplemental-material.pdf>)

Detección de carbapenemasa

El desafío de la presente cepa consistía en detectar la presencia de la MBL con resistencia a aztreonam y evaluar mediante los métodos disponibles, la actividad de la combinación de aztreonam- avibactam.

En la Cepa 3 se pudo sospechar la producción de MBL con todas las metodologías empleadas y utilizando los criterios diagnósticos establecidos por el LNR (ver Tabla 3b, 3c, 3d y Foto 3a) y se pudo evidenciar la coproducción de BLEE realizando la sinergia entre aztreonam y amoxicilina/clavulánico (ver Foto 3.b).

Tabla 3d. Cepa 3. Criterios para sospecha y confirmación de MBL en Enterobacterales

Prueba	Resultado	Mecanismo inferido
Sinergia IMI/MER- EDTA*	Positiva	Carbapenemasa de clase B (MBL)
Sinergia IMI/MER-APB	Negativa	Carbapenemasa de Clase A negativa
Sinergia AZT-AMC	Positiva	BLEE
THT MER ¹	Positivo	Actividad enzimática sobre carbapenemes
Δ mCIM /eCIM ²	Positivo (6 / 20 mm)	Carbapenemasa de clase B (MBL)
Blue Carba Test ³	Positivo	Carbapenemasa
Carba NP direct ⁴	Positivo	Carbapenemasa
NG TEST CARBA 5 (Inmunocromatografía)	NDM Positiva	NDM
PCR Multiplex (OXA-48 like, KPC, VIM, IMP, NDM)	NDM Positiva	NDM
WGS (Illumina)	NDM-5	NDM-5

*NOTA: En medios con déficit de Zn⁺², se podrían observar resultados de “falsa sensibilidad” frente a los carbapenemes y no observarse la sinergia característica con EDTA. Recomendamos realizar un control con la *E. coli* VIM-1 (Cepa 1-Encuesta N°49-2014) cada vez que se cambie de marca o lote del agar Mueller Hinton utilizado.

¹<http://antimicrobianos.com.ar/2016/03/triton-hodge-test-tht-deteccion-de-carbapenemasas-mediante-test-de-hodge-mejorado/>.

² Método modificado de Inactivación de Carbapenemes para sospecha de producción de carbapenemasas en Enterobacterales y *Pseudomonas aeruginosa*, Tabla 3C - CLSI-M100 Ed33.

³ Ensayo colorimétrico rápido para la búsqueda de carbapenemasas basado en la hidrólisis de IMP, adaptado de Pires J. y col., *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 4281-3. Pasteran F. y col., *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1996-8- <http://antimicrobianos.com.ar/2014/10/protocolo-de-blue-carba/>).

⁴ Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo, adaptado de Pasteran F. y col. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(12): 3908-11.2. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/12/CARBA-NP-DIRECT-v3-21.pdf>.

Foto 3a. Cepa 3. Sinergia entre imipenem/meropenem con EDTA

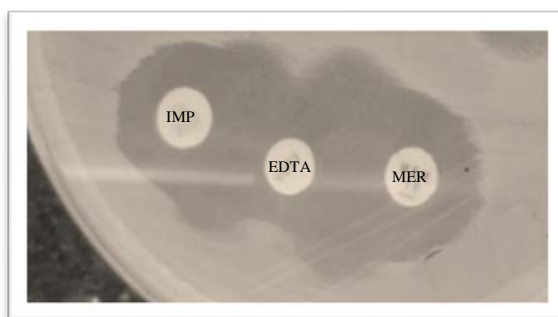
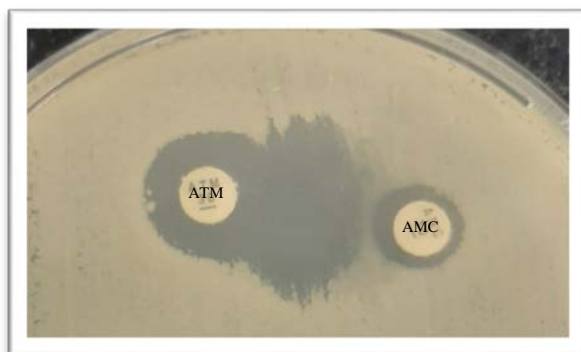


Foto 3b. Cepa 3. Sinergia entre aztreonam y amoxicilina/clavulánico



El **97%** (392/404) de los laboratorios informaron alguno de los mecanismos de resistencia considerados como correcto por el LNR (CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE; CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL); CARBAPENEMASA + BLEE; y CARBAPENEMASA), lo cual indica un desempeño excelente de los laboratorios en la detección de este mecanismo. Se consideró como totalmente válido el mecanismo de resistencia inferido: **“CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE”** el cual fue informado por el **80,7%** (326/404) de los laboratorios (Tabla 3e).

Tabla 3e. Cepa 3: Respuestas de los laboratorios según el Mecanismo de Resistencia Inferido

Mecanismo de resistencia inferido: Respuestas de los participantes (N:404)		
Identificación	Número	%
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL) + BLEE	326	80,7
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)	59	14,6
CARBAPENEMASA + BLEE	5	1,2
CARBAPENEMASA	2	0,5
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR APB (KPC) + CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR EDTA (MBL)	7	1,7
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR APB (KPC) R a cefta/avibactam (Mut. de KPC)	2	0,5
BLEE+ IMPERMEABILIDAD	1	0,25
CARBAPENEMASA INHIBIBLE POR APB (KPC, otras)	1	0,25
CARBAPENEMASA tipo OXA	1	0,25

Siete laboratorios reportaron el aislamiento como un doble productor de MBL y KPC. Los aislamientos dobles productores dan sinergias variables entre carbapenemes-EDTA/APB, por lo que podrían mostrar inhibición con EDTA sin inhibición por APB sumado al CarbaNPd, Blue Carba Test y THT positivos, como se observa en la Cepa 3. Sin embargo, en los dobles productores se esperaría ausencia de sinergia entre aztreonam-AMC, sinergia positiva entre AZT-APB, que no se evidenciaba en este aislamiento y resultados de mCIM/eCIM sin delta (fenotipo serincarbapenemasa), ya que solo un 3% presenta un delta mCIM/ eCIM ≥ 5 mm.

Análisis de concordancia entre los laboratorios participantes y el LNR.

Concordancia en la Interpretación de las pruebas de Sensibilidad.

Respecto a la concordancia en la interpretación (categorización del aislamiento S/I/R), se obtuvieron resultados excelentes para todos los antibióticos ensayados con valores $\geq 94\%$ para meropenem, ceftazidima/avibactam, amikacina, fosfomicina y predifusión rápida aztreonam/avibactam, y 89% para aztreonam (Tabla 3f).

Tabla 3f. Cepa 3. Concordancia en la interpretación de las pruebas de sensibilidad

Antibiótico	Nº respuestas	S		I		R	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Meropenem	363	10	2,8	9	2,5	344	94,8
Ceftazidima /Avibactam	388	1	0,3	-	-	387	99,7
Amikacina	403	5	1,2	10	2,5	388	96,3
Aztreonam (ATM)	394	15	3,8	29	7,4	350	88,8
Fosfomicina	396	372	93,9	5	1,3	19	4,8
Predifusión ATM- AVI	360	355*	98,6*	-	-	5*	1,4*

*Interpretación: S= Salvaje (sinergia positiva) $\geq 17\text{mm}$ o R=No salvaje (sinergia negativa) $< 16\text{mm}$.

 Resultado correcto
 Errores menores
 Errores graves
 Errores muy graves

Los resultados de interpretación de meropenem en los productores de carbapenemasa no corresponde informarlos según CLSI como S, I o R; sino que se debe informar el mecanismo de resistencia y si es Apto / NO Apto para tratamiento combinado utilizando los puntos de corte de CIM o disco. Como comentamos anteriormente, **la interpretación correcta para la Cepa 3 es “Apto para tratamiento combinado”** basándonos en los valores de microdilución. Los métodos automatizados como Vitek 2C o Phoenix pueden arrojar valores de CIM de “falsa resistencia” a los carbapenemes cuando se los compara con los métodos de referencia como pueden ser la dilución en caldo o en agar, la microdilución en caldo (Sensititre) e inclusive con los métodos epsilométricos. A modo de ejemplo, en el caso de la Cepa 3, 46/132 laboratorios (34,85%) informaron valores de CIM de meropenem “Aptos para terapia combinada” ($\leq 8\mu\text{g/ml}$). Si estratificamos según la metodología utilizada, los métodos epsilométricos aportan el mayor porcentaje de interpretaciones de “Aptos para terapia combinada” (73,5% -25/34), seguidos por Phoenix, (50%, 19/38) y por último Vitek con 3,4% (2/60).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en aquellos casos en que se vaya a **utilizar el meropenem en un tratamiento combinado recomendamos realizar la CIM por un método de referencia o un método epsilométrico.**

En cuanto a la difusión con discos, los puntos de corte del LNR para la difusión con discos (“Apto” $\geq 14\text{mm}$ y “NO Apto” $\leq 13\text{mm}$) correlacionan muy bien con los métodos de referencia para la interpretación de meropenem. En el caso de la Cepa 3, de 249 laboratorios que informaron halos de disco, el 91,6% (228/249) resultaron Aptos para tratamiento combinado.

NOTA: Debido a que las opciones de interpretación del Programa aún no permiten contestar Apto o no Apto (sino S, I y R) en esta oportunidad no le asignamos puntaje a la interpretación de meropenem.

Respecto a aztreonam, 89% de los laboratorios informaron correctamente la categoría resistente. 15 laboratorios informaron sensible a aztreonam, pero llama la atención que 7/15 laboratorios obtuvieron halos entre 16 y 20 mm, en la categoría de intermedio o resistente. Los 8 laboratorios restantes obtuvieron halos de 21-26mm que están dentro de la categoría sensible, pero cabe destacar que a pesar de la aparente sensibilidad “*in vitro*”, en los Enterobacterales productores de MBL antes de informar un halo de sensibilidad a aztreonam se debe descartar la coproducción de BLEE estudiando la sinergia aztreonam–amoxicilina/clavulánico, como es el caso de la Cepa 3. En el caso de producción de BLEE, aztreonam debe informarse resistente independientemente de su sensibilidad “*in vitro*”.

En esta oportunidad incluimos por primera vez en el panel de antibióticos a ensayar a la **predifusión rápida aztreonam-avibactam** para evaluar la actividad sinérgica entre ambas drogas (ver protocolo en <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/03/Predifusion-rapida-ATM-AVI.pdf>). Un total de 345 laboratorios informaron un valor para la prueba, el valor promedio fue de 28mm con un rango entre 18 y 36mm. Sólo un laboratorio informó un halo de 6mm. 98,6% de los laboratorios interpretaron correctamente la prueba como: fenotipo “Salvaje” (sinergia positiva). 5 laboratorios informaron fenotipo “No Salvaje” (sinergia negativa) pero 4 de ellos seleccionaron la interpretación incorrecta a pesar de informar halos mayores al punto de corte ($\geq 17\text{mm}$). A esta determinación no se le asignó puntaje por ser una metodología incorporada recientemente al diagnóstico, pero observamos un excelente

desempeño con todas las marcas de discos de ceftazidima/avibactam (211 de Britania, 121 de Liofilchem y 2 de Biorad) con un promedio de valores de 28mm (IC: 22-34m) que coincidieron con los valores de referencia del LNR (28, IC: 24-33mm). Los halos obtenidos en la predifusión rápida de ATM / AVI en la Cepa 3 están alejados del punto de corte, por lo que no presentaron dificultad en la interpretación. Sin embargo, cabe aclarar que en valores cercanos al punto de corte pueden encontrarse diferencias (falsas sinergias negativas) en los resultados según las marcas de discos de ceftazidima/avibactam, por lo que los resultados “no salvajes” deberían confirmarse con otras metodologías (disco o tira de gradiente de aztreonam en placa de Mueller Hinton con una concentración de avibactam de 4ug/ml).

Concordancia en los halos de inhibición

Teniendo en cuenta los Rangos de Referencia obtenidos por el LNR, la concordancia obtenida fue muy buena para amikacina y fosfomicina (>90%), para ceftazidima/avibactam y aztreonam (85 y 88%, respectivamente) y 76,5% para meropenem (Tabla 3g).

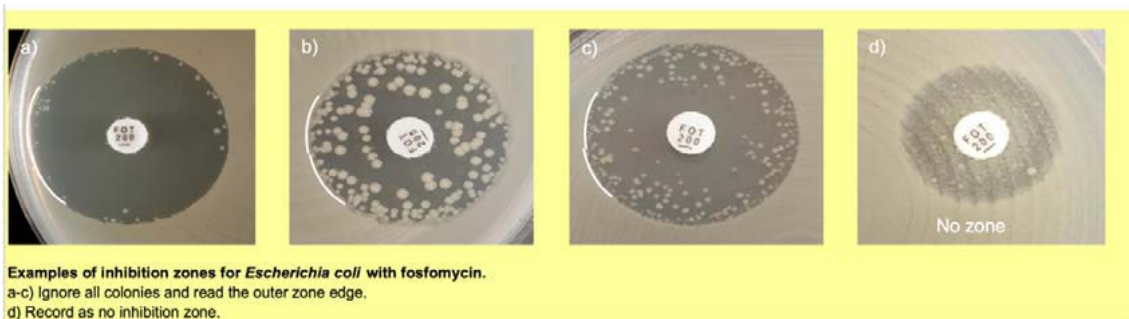
Tabla 3g. Cepa 3. Rangos de Referencia y concordancia de las zonas de inhibición entre los laboratorios participantes y el LNR.

Antibiótico	Rango de referencia (mm)	Concordancia con el Rango de Referencia (%)
Meropenem	16-22	76,5
Ceftazidima /Avibactam	6-8	84,5
Amikacina	6	91,8
Aztreonam (ATM)	11-19	88,3
Fosfomicina	16-23	93,9

Cabe recordar que para fosfomicina, halos ≥ 17 mm para discos con carga de 200 μ g o ≥ 15 mm para discos con carga de 50 μ g se asocian con valores de CIM categorizados

como sensible de acuerdo al EUCAST. Esta correlación es válida cuando fosfomicina se administra por vía parenteral, no por vía oral. (Tigecycline and intravenous fosfomycin zone breakpoints equivalent to the EUCAST MIC criteria for Enterobacteriaceae. F. Pasteran, y col. J Infect Dev Ctries 2012; 6(5):452). Es importante aclarar, que si bien en esta cepa no hubo dificultades con fosfomicina, se debe tener especial cuidado en la lectura de las zonas de inhibición de los discos, por lo que no deben considerarse las colonias dentro del halo de inhibición sino que debe leerse sólo el crecimiento que genera un halo definido (Foto 3c).

Foto 3.c. Ejemplo de lectura de discos de fosfomicina según EUCAST



En resumen, en la Tabla 3.h se muestran los resultados de concordancia globales entre los laboratorios participantes y el LNR.

Tabla 3.h. Cepa 3: Concordancia global entre los laboratorios participantes y el LNR

Parámetro Evaluado	Concordancia Global (%)
Identificación bioquímica	98,8
Interpretación de pruebas de sensibilidad	95,4
Mecanismo de resistencia inferido	97,0
Halos de inhibición	87,4

Cepa N°4 *Elizabethkingia anophelis*

La Cepa 4 de esta encuesta corresponde a *Elizabethkingia anophelis* aislada de LCR. Doscientos ochenta y cuatro laboratorios informaron la identificación de esta cepa y ciento dieciséis reportaron “cepa no viable”. Aun no pudimos atribuir la causa de no viabilidad a algún factor en particular. En esta oportunidad, el LNR consideró correctas las respuestas: *Elizabethkingia anophelis*, *Elizabethkingia meningoseptica* y *Elizabethkingia* sp. En la Tabla 4.a. se muestra la distribución de respuestas recibidas.

Tabla 4.a.Cepa 4: Identificación bacteriana: Respuestas de los participantes (N=284)

Identificación	Número	%
<i>Elizabethkingia anophelis</i>	38	13,4
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	173	61
<i>Elizabethkingia</i> sp.	45	15,9
Otros: <i>C. meningoseptica</i> , <i>Bacilo gramnegativo no fermentador</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>S. paucimobilis</i> , <i>Haemophilus</i> sp., <i>B. mallei</i> , <i>F. mizutaii</i> , <i>A. xylooxidans</i> , <i>Burkholderia</i> sp, <i>E. faecalis</i> , <i>E. tarda</i> , <i>Listeria</i> sp. <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. multocida</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i> sp	28	9,8

En el Anexo: “*Elizabethkingia* bajo la lupa: nuevos hallazgos sobre este género bacteriano” encontrarán una actualización sobre el género del aislamiento enviado en la presente encuesta. (Cipolla L, Prieto M. Bacteriología Especial. INEI-ANLIS. “Dr. Carlos G. Malbran”. 2023)

ANEXO CEPA 4.

“*Elizabethkingia* bajo la lupa: nuevos hallazgos sobre este género bacteriano”

Cipolla L, Prieto M. Bacteriología Especial. INEI-ANLIS. “Dr. Carlos G. Malbran”

ASPECTOS DESTACADOS

- *Elizabethkingia* es un género de bacterias que se encuentran comúnmente en el medio ambiente.
- Se asocian principalmente a meningitis en recién nacidos y meningitis o infecciones del torrente sanguíneo y respiratorias en personas con sistemas inmunitarios debilitados.
- Son resistentes a múltiples antibióticos de uso común en las terapias empíricas.
- Elevada mortalidad 20-50%. En neonatos 20-30%.
- Generalmente causan brotes pequeños y localizados, sin embargo existe el antecedente de un brote multi-estado en EEUU en 2015-2016.
- Está documentado que una de las fuentes de transmisión es el agua, debido a la formación de biofilms en grifos y lavabos.
- En Argentina la especie prevalente es *Elizabethkingia anophelis*
- En Argentina fueron analizados hasta la fecha dos clusters de infecciones por *E. anophelis* en dos centros de salud. Las fuentes de infección no fueron identificadas.
- En Argentina, el aislamiento de esta bacteria fue registrado en cuadros de exacerbación pulmonar de pacientes con fibrosis quística.

ANTECEDENTES

El género *Elizabethkingia* es un bacilo gramnegativo no fermentador y un reconocido patógeno oportunista, asociado a meningitis en neonatos y a bacteriemia, sepsis e infecciones respiratorias en individuos inmunocomprometidos. Las infecciones causadas por esta bacteria pueden tener mal pronóstico debido a su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos de uso común en las terapias empíricas. Son resistentes a todos los β -lactámicos, carbapenemes, aminoglucósidos y colistin. La sensibilidad a piperaciclina, piperacilina-tazobactam, fluoroquinolonas y trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SXT) es variable.

El género *Elizabethkingia* comprende 7 especies, de las cuales, hasta el momento, tres tienen importancia médica: *E. meningoseptica*, *E. anophelis* y *E. miricola*.

EPIDEMIOLOGÍA

La especie *E. anophelis* fue descrita en el año 2011. Poco después de su descubrimiento, fue identificada como agente etiológico de un caso de meningitis en la República Centroafricana (Frank y col. 2013) y asociada a un brote nosocomial en una

unidad de cuidados intensivos (UCI) en Singapur. Este evento involucró 5 pacientes de esa unidad que estuvieron colonizados con *E. anophelis* durante 3 semanas y luego la bacteria fue aislada en esputo (2) y sangre (1). Dos de los pacientes presentaron un cuadro de sepsis y fallecieron. El estudio epidemiológico y ambiental permitió recuperar *Elizabethkingia* de los aireadores de grifos y demostrar la relación genética con los tres aislamientos clínicos. (Teo y col. 2013).

Desde el 1 de noviembre de 2015 hasta el 30 de marzo de 2016, se produjo el mayor brote documentado por *E. anophelis*. Ocurrió en los estados de Wisconsin, Michigan e Illinois, EEUU, con 65 casos y 20 muertes. La mayoría de los pacientes era mayor de 65 años y con patologías de base. Notablemente, el 89% de estos casos fueron infecciones de la comunidad. El brote disminuyó en julio de 2016 y, a pesar de una intensa investigación epidemiológica en la cual fueron evaluadas muchas fuentes potenciales de infección, incluidas fuentes de agua, centros de salud, medicamentos y productos de cuidado personal, no se pudo identificar una fuente común. (Castro y col. 2017). El punto focal de EEUU para el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), notificó este brote a OPS y OMS. En 2016, la OMS alentó a las autoridades nacionales de Salud Pública a informar sobre cualquier cluster de infección por *E. anophelis* y la posible fuente asociada utilizando los canales de comunicación establecidos en virtud del RSI (<https://www.who.int/csr/don/21-april-2016-elizabethkingia-usa/en/>). Desde 1990 hasta agosto 2022 se han reportado 14 cohortes confirmadas y 21 cohortes sospechosas de brotes por *E. anophelis*. La mayoría de los brotes ocurrieron en Taiwán, India y Estados Unidos (Mallinckrodt y col. 2023). También han sido descritos brotes intrahospitalarios en Inglaterra (Moore y col. 2016), Taiwán (Tai y col. 2017), Camboya (Reed y col. 2020), Brasil (Pereira y col., 2013) y Argentina (Nievas y col. 2022).

Actualmente, *E. anophelis* se ha establecido como un patógeno bacteriano oportunista peligroso, que puede causar meningitis, neumonía, artritis séptica, osteomielitis, endocarditis, conjuntivitis, colangitis, infección del tracto urinario, celulitis, infecciones abdominales, epididimitis, bronquitis hospitalaria prolongada, sinusitis, peritonitis asociada a diálisis peritoneal e infección articular asociada a prótesis en humanos (Seong y col., 2020).

No existe un régimen antimicrobiano de elección para el tratamiento empírico de las infecciones por *Elizabethkingia* spp., ya que la susceptibilidad a los

antimicrobianos ha sido inconsistente en los informes en la literatura. *Elizabethkingia* es a menudo sensible a los antibióticos que generalmente se usan para tratar infecciones causadas por bacterias grampositivas como rifampicina, clindamicina, eritromicina, trimetoprima/sulfametoxazol, quinolonas y vancomicina.

TRANSMISIÓN

Elizabethkingia spp. no forma parte de la microbiota humana, aunque puede colonizar tejidos y mucosas a través de lavabos, dispositivos médicos como tubos de intubación, humidificadores, incubadoras neonatales, respiradores e incluso soluciones antisépticas y salinas. También pueden **sobrevivir en suministros de agua municipal tratados con cloro**. Las lavabos y grifos colonizados son reservorios potenciales de *Elizabethkingia* spp. en el entorno hospitalario. *Elizabethkingia* spp. se puede propagar por materiales húmedos y secos y superficies, incluidas las manos del personal del hospital.

Si bien la ruta de transmisión de *E. anophelis* no está completamente dilucidada, varios investigadores demostraron asociación de aislamientos clínicos con aislamientos ambientales, recuperados principalmente de grifos, aireadores de grifos y lavabos. (Yung y col. 2018, Choi y col. 2019, Nievas y col. 2022). Otras fuentes de transmisión incluyen transmisión de paciente a paciente, equipos médicos contaminados y tejidos de donantes (Mallinkrodt y col. 2023).

Uno de los estudios más amplios de muestreo ambiental fue el de Choi y col. en el cual fueron investigadas múltiples superficies (hisopados de equipamiento y superficies dentro de las habitaciones de los pacientes, baños, estaciones de enfermería, aparatos electrónicos, muebles, dispositivos para el cuidado del paciente, camas, carritos de transporte de pacientes, lavabos y grifos de agua), y realizaron una profunda limpieza de esas superficies; erradicando al microorganismo. Sin embargo, alertaron que otros hospitales han hecho lo mismo y han tenido fallas y casos adicionales por lo que concluyeron: **"El monitoreo continuo, incluidos los sistemas de cultivo de vigilancia y la educación del personal médico, puede ser más importante que la descontaminación para reducir la adquisición e infección por *Elizabethkingia*".**

Las estrategias para prevenir y reducir la propagación de *Elizabethkingia* sp. incluyen:

- Habitaciones sin grifos de agua.
- Prácticas adecuadas de higiene y desinfección.
- Técnicas optimizadas de diagnóstico para detección, identificación y tipificación molecular.

Para la investigación de casos asociados a cuidados de la salud por *Elizabethkingia* sp. se recomienda el uso de técnicas moleculares como secuenciación de genoma completo para identificar transmisión clonal y facilitar el intercambio y la comparación de datos genéticos con otras instituciones.

Las medidas de control incluyen investigar la fuente, aumentar la desinfección, restringir el intercambio de personal, eliminar fuentes contaminadas y aislar a los pacientes positivos.

¿TRANSMISIÓN VECTORIAL DE *E. anophelis*?

En marzo de 2020, Onyango y col. adelantaron los resultados del estudio de microbioma de la saliva de mosquitos del género *Aedes* donde demuestran la presencia de *E. anophelis* en saliva de mosquitos infectados y no infectados. También demostraron que la presencia de la bacteria confiere un efecto inhibitor de la colonización del intestino del mosquito por el virus Zika. Estos resultados, alertan sobre la **potencial capacidad de transmisión vectorial de *E. anophelis*.**

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Varios investigadores realizaron estudios retrospectivos, concluyendo que la mayoría de los aislamientos identificados como *E. meningoseptica*, en realidad corresponden a *E. anophelis*, transformándose en la especie clínicamente dominante del género.

La bacteriemia por *Elizabethkingia*, especialmente por *E. anophelis* está asociada a una morbi-mortalidad significativa y debe considerarse clínicamente relevante. Por lo tanto, la identificación precisa es esencial para establecer los regímenes antibióticos apropiados. A partir del año 2010, numerosos laboratorios de microbiología clínica comenzaron con la incorporación la espectrometría de masas MALDITOF-MS como herramienta de identificación, lo cual ha permitido la rápida identificación de este

género, el cual generalmente presenta dificultades para su identificación cuando se utilizan pruebas bioquímicas manuales, por lo cual suelen informarse simplemente como: bacilo no fermentador.

Cuando se utilizan métodos fenotípicos manuales o comerciales con bases de datos desactualizadas, los aislamientos de todas las especies del género *Elizabethkingia* pueden ser identificados como *Flavobacterium meningosepticum* o *Chryseobacterium meningosepticum*.

Algunos laboratorios pueden confundir *Elizabethkingia* con otros bacilos no fermentadores oxidasa positiva multirresistentes como: *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia*. Los sistemas de identificación automatizados como VITEK 2 y Phoenix, son capaces de identificar correctamente al género *Elizabethkingia*, aunque se han documentado errores en la identificación (Rahim y col. 2018).

En un análisis sobre la evolución del desempeño de Laboratorios de Referencia de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos del Programa Latinoamericano de Aseguramiento de la Calidad en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (LA-EQAS) entre 2000 y 2018, la concordancia en la identificación bacteriana de *Elizabethkingia* fue menor al 70%. (Gagetti y col. 2020).

Es importante que los microbiólogos clínicos estén actualizados con respecto a este patógeno emergente. Para laboratorios de microbiología de baja complejidad, el aislamiento a partir de un líquido estéril de un bacilo gramnegativo no fermentador multirresistente que es oxidasa positivo, resistente al colistín y que no presenta pigmento o con pigmento amarillo muy pálido, puede ser confirmado fácilmente como probable *Elizabethkingia* sp. si produce una prueba positiva de indol y es inmóvil.

Existe una gran variabilidad fenotípica entre las cepas de *Elizabethkingia*, incluso aquellas pertenecientes a la misma especie. Cuando se publicó por primera vez el género *Elizabethkingia*, la ureasa era la única prueba bioquímica que distinguía consistentemente entre las cepas de *E. meningoseptica* (negativas) y la cepa tipo de *E. miricola* (positiva), pero actualmente se ha demostrado que todas las cepas de *E. anophelis* y algunas de las cepas de *E. bruuniana* y *E. occulta* también fueron positivas para ureasa, mientras que algunas cepas de *E. miricola* pueden ser negativas (Nicholson y col. 2019).

Nicholson y col. realizaron una serie de pruebas fenotípicas convencionales en todas las cepas de la colección del laboratorio de referencia de bacterias especiales del CDC, EE.UU para intentar descubrir alguna diferencia fenotípica consistente entre los tres grupos (*E. meningoseptica*, *E. anophelis* y todos los demás) mostrando que **no pueden distinguirse de manera confiable solo por el fenotipo** (Cuadro 1).

La especie *E. anophelis* no estaba representada en las bases de datos de las plataformas comerciales MALDITOF-MS. Los aislamientos eran identificados como *E. meningoseptica*, hasta el año 2019 cuando las empresas actualizaron las bases de datos e incorporaron espectros de referencia de esta nueva especie. Sin embargo, en algunas ocasiones, aún no permite discriminar entre las especies *E. meningoseptica* y *E. anophelis*. En estos casos, los aislados deben ser confirmados por un laboratorio de referencia mediante secuenciación completa de los genes *16srARN* y *rpoB*.

Cuadro 1: Diferencias fenotípicas entre especies del género *Elizabethkingia* (Nicholson y col. 2019)

	Prueba	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	<i>E. miricola</i> , <i>E. bruuniana</i> , <i>E. ursingii</i> , <i>E. occulta</i>	<i>E. anophelis</i>
Producción de ácido a partir de	D-glucosa	100%	94%	99%
	D-xylosa	0%	0%	1%
	D-manitol	100%	94%	92%
	Lactosa	100%	19%	31%
	Sacarosa	0%	0%	2%
	Maltosa	100%	94%	99 %
Producción de:	Esculina	100%	100%	99%
	Catalasa	100%	100%	100%
	Oxidasa	100%	100%	99%
	Ureasa	7%	47%	39%
	Indol	100%	100%	100%
	Gelatinasa	100%	85%	97%

Crecimiento en:	Agar MacConkey	93%	88%	92 %
	Agar			
	Citrato de simmons	60%	47%	26%
Reducción de nitratos		0%	0%	6%

SITUACIÓN EN ARGENTINA

El Servicio Bacteriología Especial (BE) del Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS “Dr. Carlos Malbrán” posee una colección de cultivos bacterianos con una considerable diversidad taxonómica. En el año 2019, se realizó un estudio retrospectivo con el objetivo de identificar por medio de secuenciación de genes constitutivos, todos los aislamientos clínicos que habían sido identificados previamente como *E. meningoseptica* durante el período 2006-2018. Se analizaron 21 aislamientos clínicamente significativos de los cuales el 77% (17/22) fueron reclasificados como *E. anophelis*. Todas las cepas presentaron el perfil de resistencia correspondiente al género *Elizabethkingia*. El porcentaje de sensibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *E. anophelis* fue: 100% para minociclina, 100% para trimetoprima/sulfametoxazol, 88% para piperacilina-tazobactam, 88% para rifampicina y 12% para ciprofloxacina. Los aislamientos de *E. meningoseptica*, presentaron 100% de sensibilidad a minociclina, TMP-SXT y rifampicina, 80% de sensibilidad a piperacilina-tazobactam y 60% de sensibilidad a ciprofloxacina. Todos los aislamientos fueron resistentes a vancomicina (datos no publicados).

Durante el año 2019 se recibieron dos aislamientos de *Elizabethkingia* sp. de esputo de pacientes con fibrosis quística, que fueron identificados como *E. meningoseptica* (1) y *E. anophelis* (1). En 2020, se produjo un brote en sala de neonatología de un efector de salud que fue investigado encontrándose la fuente de infección en el aireador de uno de los grifos. (Nievas y col., 2022).

REFERENCIAS

Castro, C. E. F., Johnson, C., Williams, M., VanDerSlik, A., Graham, M. B., Letzer, D., Munoz-Price, L. S. (2017). *Elizabethkingia anophelis*: Clinical Experience of an Academic Health System in Southeastern Wisconsin. Open Forum Infectious Diseases, 4(4), ofx251. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFX251>

Choi M, Kim M, Jeong S, Choi J, Lee I, Yong T, et al. Risk Factors for *Elizabethkingia* Acquisition and Clinical Characteristics of Patients, South Korea. Emerg Infect Dis. 2019; 25(1):42-51. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2501.171985>

Frank, T., Gody, J. C., Nguyen, L. B. L., Berthet, N., Fleche-Mateos, A. Le, Bata, P. Breurec, S. (2013). First case of *Elizabethkingia anophelis* meningitis in the Central African Republic. The Lancet, 381(9880), 1876. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60318-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60318-9)

Gagetti P, Pasteran F, Ceriana P, Prieto M, Cipolla L, Tuduri E, et al. Evolución del desempeño de América Latina en la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Rev Panam Salud Pública. 2020; 44:e42. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.42>

Nicholson AC, Gulvik CA, Whitney AM, Humrighouse BW, Graziano J, Emery B, Bell M, Loparev V, Juieng P, Gartin J, Bizet C, Clermont D, Criscuolo A, Brisse S, McQuiston JR. Revisiting the taxonomy of the genus *Elizabethkingia* using whole-genome sequencing, optical mapping, and MALDI-TOF, along with proposal of three novel *Elizabethkingia* species: *Elizabethkingia bruuniana* sp. nov., *Elizabethkingia ursingii* sp. nov., and *Elizabethkingia occulta* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek. 2018 Jan; 111(1):55-72. doi: 10.1007/s10482-017-0926-3.

Nievas J, M. Luz Ibañez, L. Allende, J. Altclas, G. Antezana, J. Campos, F. Lorenzo, L. Cipolla, M. Prieto. Emergence of *Elizabethkingia anophelis*. First case of *E. anophelis* outbreak in a neonatal unit of a Hospital in Argentina, Clinical Infection in Practice, 2022, 13, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.clinpr.2021.100122>

Moore LS, Owens DS, Jepson A, Turton JF, Ashworth S, Donaldson H, Holmes AH. Waterborne *Elizabethkingia meningoseptica* in Adult Critical Care. Emerg Infect Dis. 2016 Jan; 22(1):9-17.

Onyango y col (2020) Potential for transmission of *Elizabethkingia anophelis* by *Aedes albopictus* and the role of microbial interactions in Zika virus competence. bioRxiv 702464; doi: <https://doi.org/10.1101/702464>

Pereira GH, Garcia DDO, Abboud CS, Barbosa VLDB, Da Silva PSL. Nosocomial infections caused by *Elizabethkingia meningoseptica*: an emergent pathogen. Braz J Infect Dis. 2013; 17:606–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.011>

Rahim GR, Gupta N, Aggarwal G. Diagnostic Pitfalls in Identification of *Elizabethkingia* Meningoseptica. J Crit Care Med (Targu Mures). 2018;4(4):149-150. Published 2018 Oct 1. doi:10.2478/jccm-2018-0021

Reed TAN, Watson G, Kheng C, et al. *Elizabethkingia anophelis* Infection in Infants, Cambodia, 2012-2018. Emerg Infect Dis. 2020; 26(2):320-322. doi:10.3201/eid2602.190345

Seong H, Kim JH, Kim JH, et al. Risk Factors for Mortality in Patients with *Elizabethkingia* Infection and the Clinical Impact of the Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Elizabethkingia* Species. J Clin Med. 2020;9(5):1431. Published 2020 May 12. doi:10.3390/jcm9051431

Tai IC, Liu TP, Chen YJ, Lien RI, Lee CY, Huang YC. Outbreak of *Elizabethkingia* meningoseptica sepsis with meningitis in a well-baby nursery. J Hosp Infect. 2017; 96(2):168–171. doi:10.1016/j.jhin.2016.11.018

Teo, J., Tan, S. Y.Y., Tay, M., Ding, Y., Kjelleberg, S., Givskov, M. Yang, L. (2013). First case of *E anophelis* outbreak in an intensive-care unit. The Lancet, 382(9895), 855–856. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61858-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61858-9)

Yung, C.F., Maiwald, M., Loo, L. H., Soong, H. Y., Tan, C. B., Lim, P. K., Chan, Y. H.(2018). *Elizabethkingia anophelis* and Association with Tap Water and Handwashing, Singapore. Emerging Infectious Diseases, 24(9), 1730–1733. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171843>