IV Jornada Nacional
VI Jornada Catalana

ACICI
Associació Catalana d'Infermeres de Control d'Infecció

Lleida 13 junio 2013

Reconocimiento y técnicas microbiológicas de detección de fenotipos de resistencia relevantes en Bacilos Gram Negativos: Enterobacterias productoras de βLEE y carbapenemasas

Dra. Mar Olga Pérez Moreno

Responsable Área de Microbiología

Laboratori Clínic ICS Terres de l'Ebre

(Hospital de Tortosa Verge de la Cinta)

Bacterias multirresistentes: un problema emergente

EL MUNDO, DOMINGO 11 DE MAYO DE 2008
MADRID

Una bacteria afectó a 250 enfermos en el Doce de Octubre

Un total de 18 personas con patologías importantes fallecieron por un germen que ataca a los enfermos, especialmente en la UCI

Review

Cell Press

Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!

Patrice Nordmann, Laurent Dortet and Laurent Poirel

Service de Bactériologie-Virologie, INSERM U914 'Emerging Resistance to Antibiotics', Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique/Hôpitaux de Paris; Faculté de Médecine Paris Sud, K.-Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

The current worldwide emergence of resistance to the powerful antibiotic carbapenem in *Enterobacteriaceae* constitutes an important growing public health threat. Sporadic outbreaks or endemic situations with enterobacterial isolates not susceptible to carbapenems are now reported not only in hospital settings but also in the community. Acquired class A (KPC), class B (IMP, VIM, NDM), or class D (OXA-48, OXA-181) carbapenemases, are the most important determinants sustaining resistance to carbapenems. The corresponding genes are mostly plasmid-located and associated with various mobile genetic structures (insertion sequences, integrons, transposons), further enhancing their spread. This review summarizes the current knowledge on carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*, including activity, distribution, clinical impact, and possible novel antibiotic pathways.

hospital-acquired, infections, such as those linked with transplantations, hospitalizations in intensive care units, and surgery, and the emergence of carbapenem resistance may jeopardize or stop the development of modern techniques in medicine.

In *Enterobacteriaceae*, carbapenem resistance arises from two main mechanisms: (i) acquisition of carbapenemase genes that encode for enzymes capable of degrading carbapenems, or (ii) a decrease in the uptake of antibiotics by a qualitative or/and quantitative deficiency of porin expression in association with overexpression of β-lactamases that possess very weak affinity for carbapenems (Figure 1). Both of these mechanisms are discussed in detail below.

The most important carbapenemases are categorized as three types of enzymes: (i) the KPC type enzymes first described in the US but now found worldwide; (ii) the VIM, IMP, and NDM metallo-β-lactamases; and (iii) the

Importante papel del laboratorio de microbiología

Reconocimiento de mecanismos de resistencia relevantes o emergentes desde el punto de vista terapéutico y epidemiológico.

Detección de brotes

Colaboración con ECIs

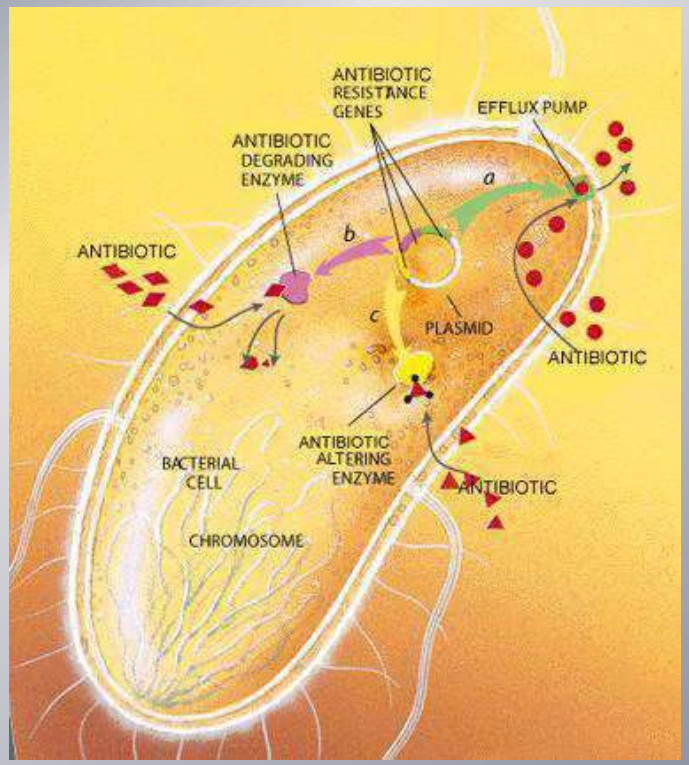
Consecuencias de la infección por microorganismos multirresistentes

- **Individuales**
  - Incremento mortalidad y morbilidad
  - Mayor probabilidad tratamiento empírico inadecuado
  - Retraso instauración tratamiento adecuado
  - Tratamiento alternativo con antibióticos menos potentes o más tóxicos.
  - Aumento de la duración del proceso infeccioso

- **Institucionales**
  - Alargamiento de la estancia hospitalaria
  - Aumento hospitalizaciones en infecciones menos graves por no disponibilidad de tratamientos orales
  - Aumento de la presión antibiótica por uso atb mayor espectro
  - Tratamientos más costosos
  - Aumento de la carga de trabajo y costes del laboratorio
  - Control de la infección más complejo y costoso

Características particulares de la resistencia antibiótica en Gram negativos

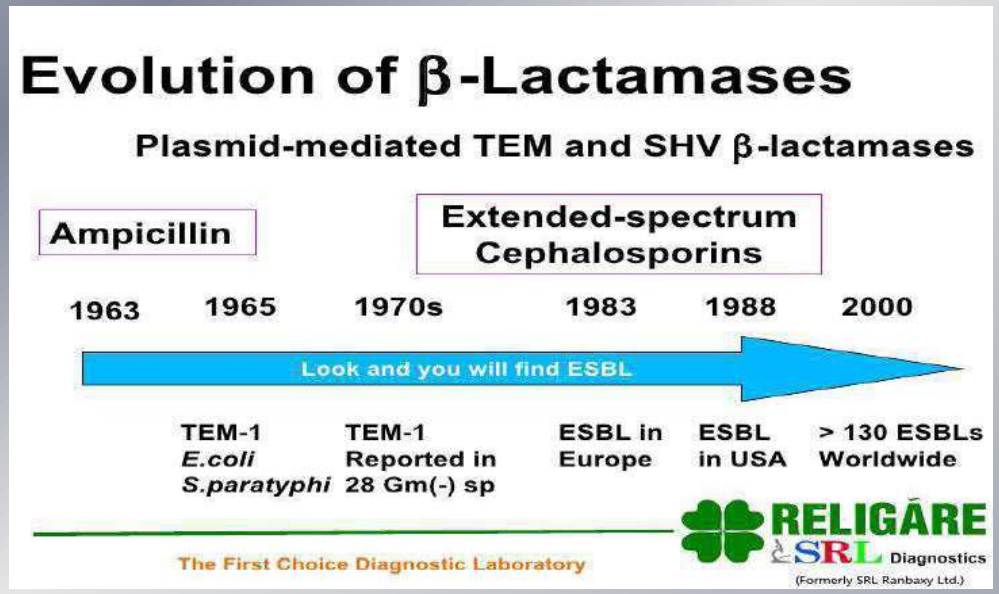
- Mayor facilidad para adquirir o desarrollar resistencia a los antibióticos.
- Determinantes de resistencia ubicados en elementos genéticos movilizables (plásmidos, transposones, integrones) que facilitan su diseminación horizontal.
- Múltiples mecanismos de resistencia a un mismo antibiótico.
- Resistencia a múltiples antibióticos no relacionados e incluso "pan-resistencia"
  - mecanismos pleiotrópicos (bombas expulsión)
  - Genes de resistencia a diferentes antibióticos ubicados en un mismo elemento genético.
- No desarrollo de nuevas moléculas antibióticas con actividad frente a Gramnegativos.



- *Pseudomonas aeruginosa* MR
- *Acinetobacter baumanii*
- *Stenotrophomonas maltophila*
- **Enterobacterias productoras de βLEE y carbapenemasas adquiridas**

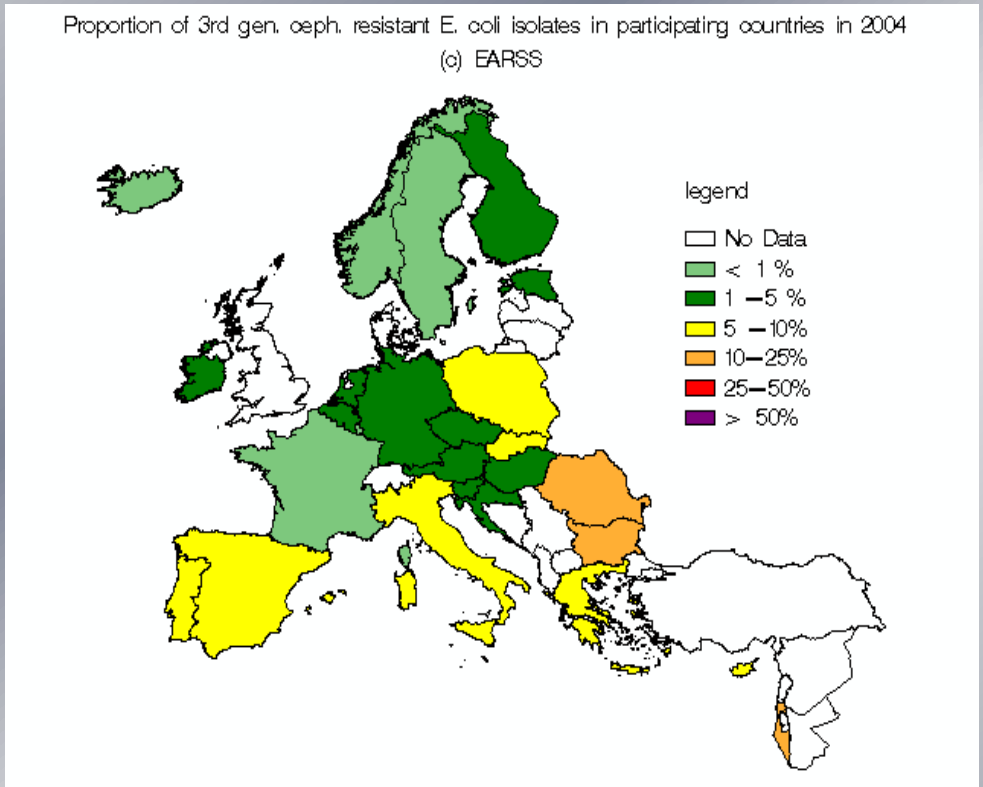
β-lactamasas de espectro extendido

- Enzimas de codificación plasmídica producidos por BGN que inactivan cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y aztreonam, pero no carbapenémicos.
- Las primeras descritas procedían de β-lactamasas plasmídicas clásicas de clase A de espectro antibacteriano más reducido (TEM-1 y SHV-1).

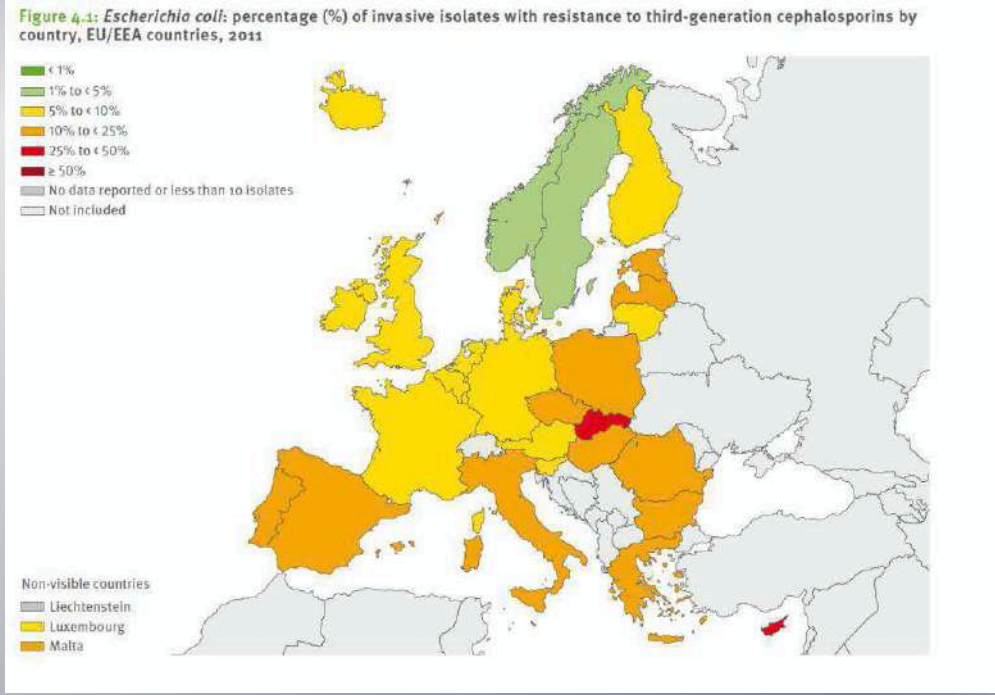


- Principios década de los 90: se identifican en *E. coli* y *Salmonella spp.* las primeras BLEEs no derivadas de TEM ni SHV, las CTX-M (hidrolizan sobre todo cefotaxima) y proceden de la βL cromosómica de *Kluyvera.* Actualmente las más prevalentes (CTX-M-15 distribución universal).
- Bacterias portadoras generalmente multirresistentes (AMG, T/S, quinolonas).
- Algunas implicadas frecuentemente en brotes nosocomiales.

Evolución prevalencia de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro en aislados invasivos de *E. coli* en Europa



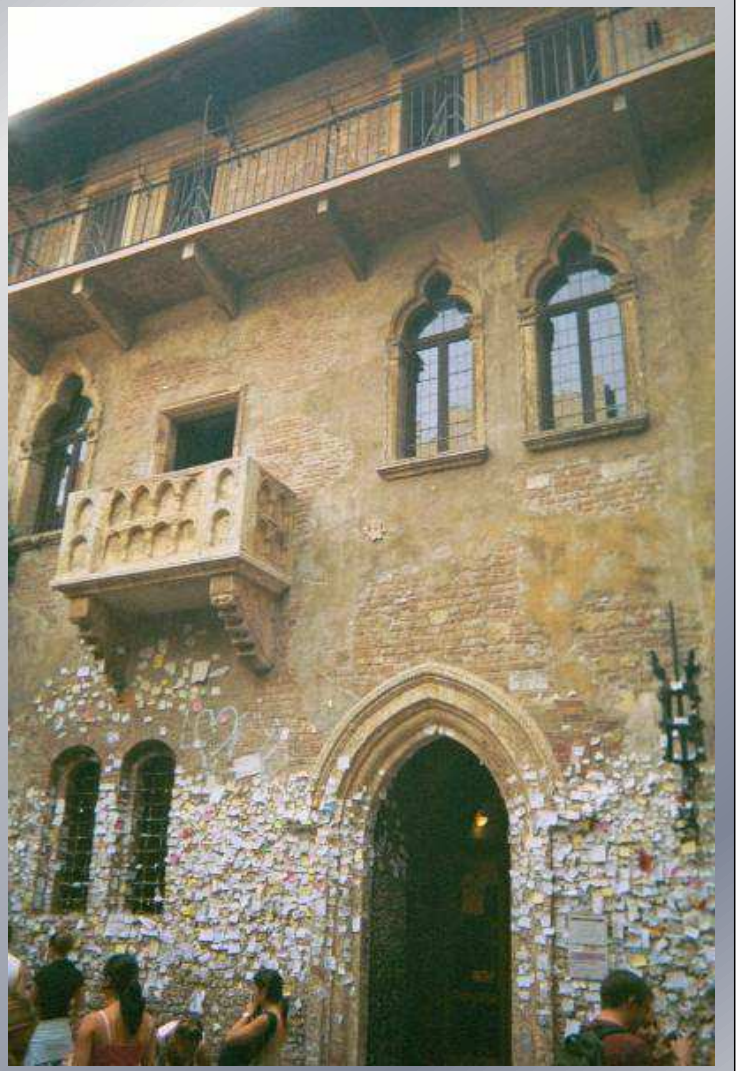
EARS-NET 2004



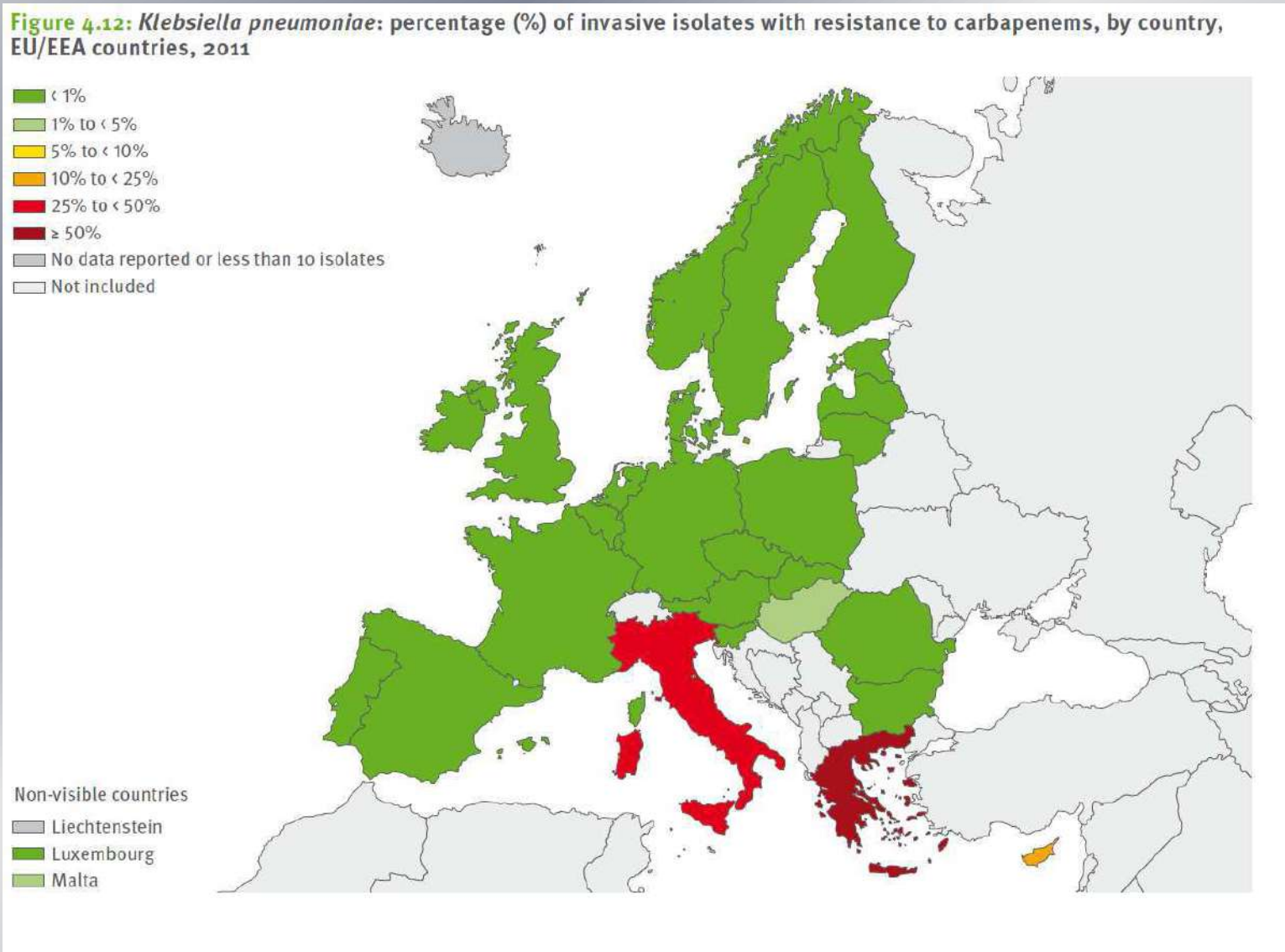
EARS-NET 2011

Carbapenemasas adquiridas

- Enzimas capaces de hidrolizar carbapenémicos, generalmente codificados por genes vehiculados por elementos genéticos transferibles (plásmidos o integrones).
- Se detectaron inicialmente en *Pseudomonas* (VIM e IMP).
- Diseminación en Europa a partir de 2000 y detección en Enterobacterias
  - VIM (Verona-integron-mediated MBL) en Italia e IMP en Grecia →metalobetalactamasas clase B
  - KPC también en Grecia →β-lactamasa clase A
  - NDM-1 importada desde el subcontienente indio
  - OXA-48 en países mediterráneos con una rápida diseminación (¿situación comparable a BLEE CTX-M?) → β-lactamasa clase D
- Problema de gran transcendencia
  - Afectan a los carbapenémicos, hasta hace poco tratamiento de reserva y eficacia asegurada en infecciones por Gram negativos.
  - Bacterias portadoras generalmente multirresistentes
  - Comunicación creciente de brotes nosocomiales en Europa, incluida España

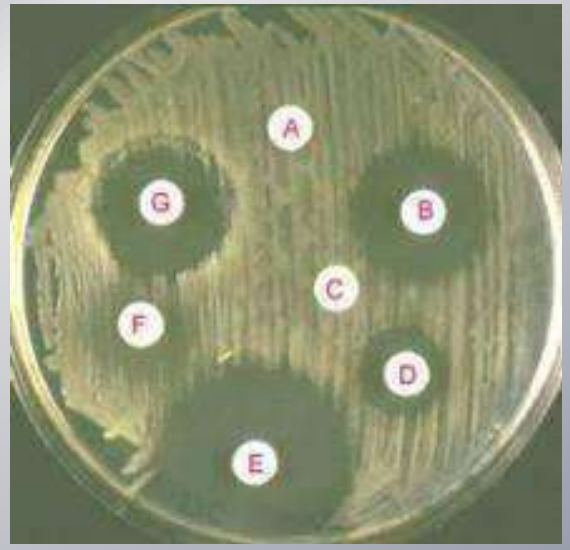


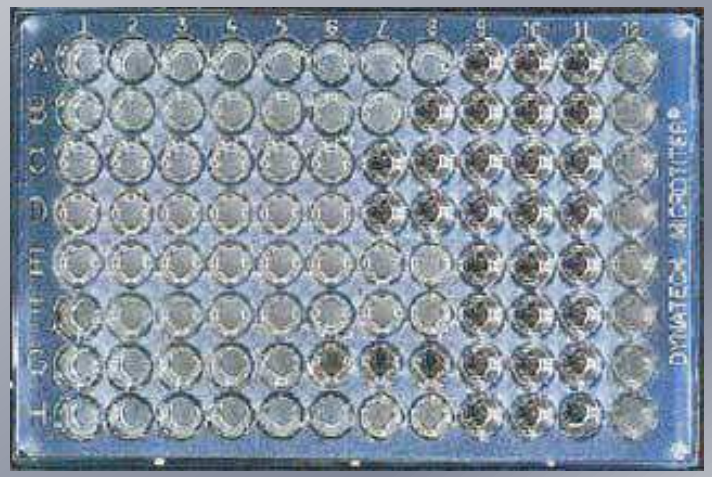
Prevalencia de resistencia a carbapenémicos en aislados invasivos de *K. pneumoniae* (EARS-Net 2011)



Limitaciones del antibiograma en el reconocimiento de βLEE y carbapenemasas

- Diferentes niveles de expresión, diferentes propiedades bioquímicas, diferente perfil de actividad, frecuente asociación con otros mecanismos de resistencia (otras β-lactamasas, bombas de flujo, alteración permeabilidad) → Variedad fenotipos resistencia en BGN productores de βLEE y carbapenemasas.
- CMI a veces < a las diluciones más bajas de los paneles comerciales o de los puntos de corte.
- En Enterobacterias productoras de BLEE o AmpC + disminución de la permeabilidad → Disminución sensibilidad a los carbapenémicos.
- Necesidad de pruebas fenotípicas o moleculares para su detección.





Nuevas recomendaciones y puntos de corte clínicos EUCAST y CLSI

Table 1. Testing guidance and breakpoints (mg/L) for Enterobacteriaceae

	Guidance		Breakpoints (mg/L)									
			to 2011					from 2011				
Organization	to 2011	from 2011	CTX/ CRO	FEP	CAZ	IPM/ MEM	ETP	CTX	FEP	CAZ	IPM/ MEM	ETP
EUCAST	for ESBL producers, edit cephalosporin S to I and I to R	report as found	S≤1 R>2	S≤1 R>8	S≤1 R>8	S≤2 R>8	S≤0.5 R>1	S≤1 R>2	S≤1 R>4	S≤1 R>4	S≤1 R>4	S≤0.5 R>1
CLSI	test for ESBL by clavulanate synergy or carbapenemases by Hodge test; report ESBL producers as cephalosporin resistant	no test for ESBL or carbapenemase; report as found	S≤8 R≥64	S≤8 R≥32	S≤8 R≥32	S≤4 R≥16	S≤2 R≥8	S≤1 R≥4	S≤8 R≥32	S≤4 R≥16	S≤1 R≥4	S≤0.25 R≥1

S≤2
R>8 ← EUCAST 2013

CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

- Puntos de corte más cercanos al cut-off ecológico
- Muchos aislados CTX-M-9 y CTX-M-14 “sensibles” a CAZ.
- Muchos aislados TEM-10 y TEM-26 “sensibles” a CTX y FEP
- Muchos aislados productores de carbapenemasas (part OXA-48) “sensibles” IMI y MER.
- Es posible obtener concentraciones séricas > CMI de los puntos de corte en 40-50% intervalo dosificación, al menos empleando dosis máximas .
- Es la CMI y no el mecanismo de resistencia el mejor predictor de la respuesta clínica.

J Antimicrob Chemother 2012; **67**: 1569–1577
doi:10.1093/jac/dks088 Advance Access publication 29 March 2012

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?

David M. Livermore[1,2]*, Jenny M. Andrews[3], Peter M. Hawkey[4], Pak-Leung Ho[5], Yoram Keness[6], Yohei Doi[7], David Paterson[8] and Neil Woodford[2]

- Resultados discordantes respecto a la eficacia de cefalosporinas y carbapenems en el tratamiento de infecciones producidas por enterobacterias BLEE o carbapenemasas + con CMI inferiores a puntos de corte.
- Problemas de reproducibilidad en los valores de CMI inherentes a las técnicas de susceptibilidad in vitro (diferente categoría clínica en diferentes ensayos intra e interlaboratorio).
- Imposibilidad de reproducir en el laboratorio las condiciones “in vivo” (alto inóculo bacteriano en el foco de infección).
- Pérdida de información epidemiológica relevante si no se conocen los mecanismos de resistencia subyacentes.
- CONCLUSIÓN: Es prudente continuar buscando activamente las βLEE y carbapenemasas y cuando estén presentes informarlo y explorar alternativas al tratamiento con cefalosporinas o carbapenémicos e instaurar medidas de control de infección.

Respuesta al tratamiento con cefalosporinas vs. CMI en infecciones por Enterobacterias productoras de βLEE

Table 3. Outcome of cephalosporin therapy versus MIC for various infections due to Enterobacteriaceae with ESBLs: literature review by Paterson *et al.*[8]

Sex/age (years)/underlying disease	Type of infection	Bacteraemia	Organism	Antibiotic[a]	MIC (mg/L)	Outcome
M/72/oesophageal surgery	mediastinitis	+	*K. pneumoniae*	cefepime+	16	**failure**
F/58/biliary surgery	nosocomial pneumonia	+	*K. pneumoniae*	cefepime+	8	**failure**
M/68/colon cancer surgery	nosocomial UTI	+	*E. coli*	cefepime+	8	**failure**
Infant/low birth weight	meningitis	+	*Klebsiella oxytoca*	cefotaxime	8	**failure**
Infant/omphalocele repair	nosocomial pneumonia		*K. oxytoca*	cefotaxime	8	**failure**
M/75	UTI	+	*E. coli*	ceftizoxime+	8	**failure**
F/48/kidney–pancreas transplant	UTI	+	*E. coli*	ceftizoxime	4	cure
F/82/from nursing home	UTI	+	*E. coli*	ceftizoxime	4	**failure**
F/14/Ewing's sarcoma	CVL related	+	*K. pneumoniae*	cefmetazole + aztreonam	1	cure
F/21/multiorgan failure	primary bacteraemia	+	*E. coli*	ceftizoxime	1	cure
NS	meningitis		*K. pneumoniae*	cefotaxime	1	cure
NS	nosocomial pneumonia		*K. pneumoniae*	ceftriaxone	<1	**failure**; died
Unknown/pancreatitis	peritonitis		*K. pneumoniae* and *E. coli*	ceftazidime	≤1	died within 24 h
M/14/multiple bowel fistulae	CVL infection	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime	0.75 (=1)	**failure**
F/61/liver transplant	UTI	+	*E. coli*	ceftizoxime	0.5	cure
M/45/liver transplant	primary	+	*K. pneumoniae*	ceftizoxime	0.5	partial response
NS	NS	+	*E. coli*	cefotaxime	0.5–1	cure
M/44/multiple trauma	meningitis	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime+	≤0.5–1	cure
M/53/liver transplant	peritonitis	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime	<0.12	cure
Child/leukaemia	NS	+	*E. coli*	cefotaxime	<8	died within 24 h
NS	UTI	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime or ceftriaxone	0.5–4	cure
NS	UTI	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime or ceftriaxone+	0.5–4	cure
NS	empyema	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime or ceftriaxone+	0.5–4	**failure**; **relapse**
NS	empyema		*K. pneumoniae*	cefotaxime or ceftriaxone+	0.5–4	**failure**; **relapse**
NS	mediastinitis	+	*K. pneumoniae*	cefotaxime or ceftriaxone+	0.5–4	**failure**; **relapse**

Paterson et al; J Clin Microbiol 2001; 39:2206.

Variabilidad resultados de las pruebas de difusión con disco

Table 6. Disc tests by the BSAC method on *E. coli* NCTC 13352 (TEM-10 β-lactamase), performed 10 times in four laboratories

	Mean zone (mm)	Standard deviation (mm)	Susceptible	Intermediate	Resistant
Ceftazidime					
laboratory 1	8.1	0.57	0	0	10
laboratory 2	6.8	1.75	0	0	10
laboratory 3	6.0	0	0	0	10
laboratory 4	6.0	0	0	0	10
Cefotaxime					
laboratory 1	28.7	0.82	1	9	0
laboratory 2	29.4	0.97	6	4	0
laboratory 3	25.9	1.29	0	10	0
laboratory 4	31.3	1.06	10	0	0
Cefepime					
laboratory 1	26.4	0.52	0	4	6
laboratory 2	28.1	0.74	0	10	0
laboratory 3	23.0	1.55	0	0	10
laboratory 4	29.1	1.00	0	10	0

Data of J. M. A.

It is important to identify ESBL isolates?
No!
Particularly if there is no indication of such organisms in the hospital in question.

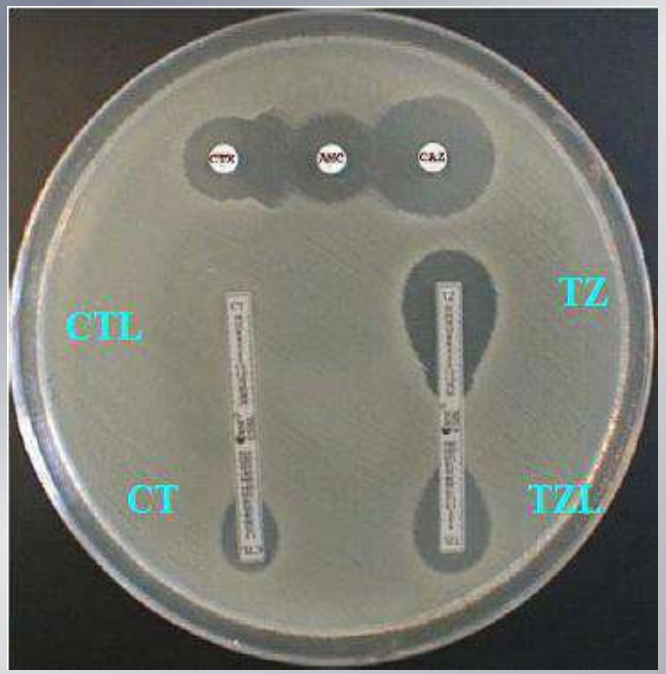
K Bush: Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996

β-lactamasas de espectro extendido: fenotipos de resistencia

	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	64->256	R
Piper/Tazo (PI+TZ)	2-8	S
Amox/clav (AMC)	4-8	S
Cefalotina (CEP)	>256	R
Cefoxitina (CFO)	2-4	S
Cefuroxima (CXM)	16->256	R
Cefotaxima (CTX)	0,12->256	S/R
Ceftazidima (CAZ)	0,25->256	S/R
Cefepima (FEP)	0,12->256	S/R
Aztreonam (AZT)	0,12->256	S/R
Imipenem (IMI)	0,06-0,12	S

- Hidrolizan penicilinas, cefalosporinas 1ª y 2ªgeneración y en grado variable, dependiendo tipo de enzima, a AZT, CTX, CAZ y CFP.
- βLEE derivadas de TEM o SHV > actividad frente a CTZ.
- βLEE tipo CTX-M > actividad frente a CTX.
- No actividad frente a cefoxitina ni carbapenémicos.
- Inhibidas por clavulánico, sulbactam y tazobactam.
- R a cefoxitina y AMC si coexisten con AmpC (*Enterobacter, Citroacter, Serratia, Morganella…)*

Detección fenotípica de producción de βLEE

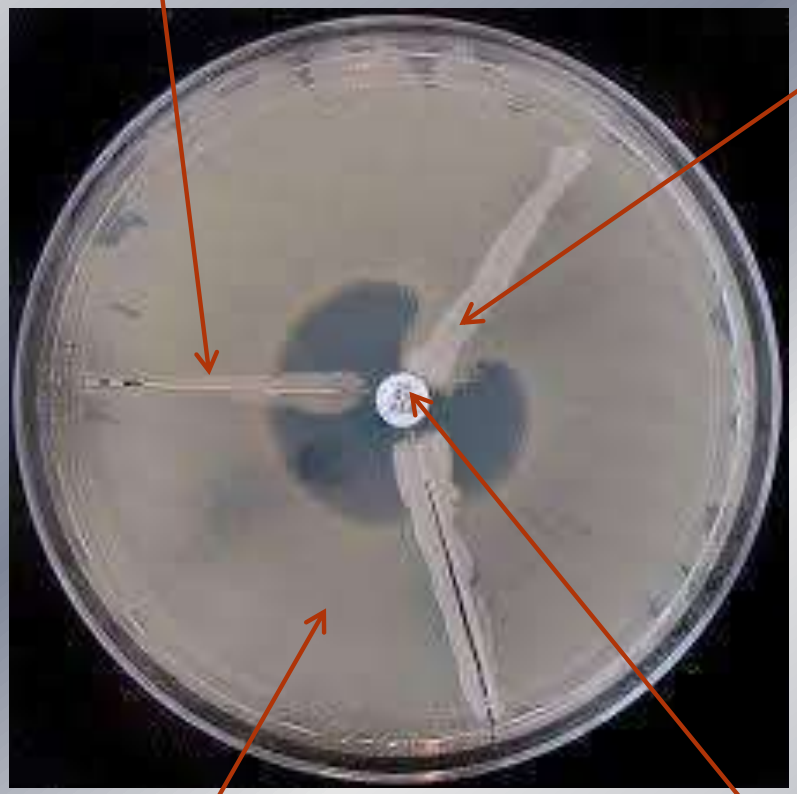


- Efectuar en todos los aislados de Enterobacterias con CMI de AZT, CTX, CAZ o CFP >1.
- Se basan en la inhibición de estos enzimas por clavulánico y usan AZT, CTX, CAZ o CFP como indicadores.
- Prueba de discos combinados con inhibidor: Ampliación >5 mm del diámetro del halo de inhibición de discos de AZT, CTX, CTZ o CFP combinados con clavulánico respecto a los discos sin clavulánico.
- E-test: CMI de CTZ o CTX >8 veces que CMI CTZ+CLA o CTX+CLA.
- Paneles de microdilución: CMI de CTZ o CTX >8 veces que CMI CTZ+CLA o CTX+CLA (sólo dos pocillos de CF+CLA)
- Prueba de sinergia con doble disco (ampliación o distorsión del halo en la proximidad del disco de AMC).
- En Enterobacterias productoras AmpC mayor sensibilidad con CFP.
- Falsos positivos: Cepas productoras de OXA-1 o *K. oxytoca* hiperproductoras de K1.

Test Hodge modificado

Cepa problema no productora de carbapenemasa

Cepa problema productora de carbapenemasa



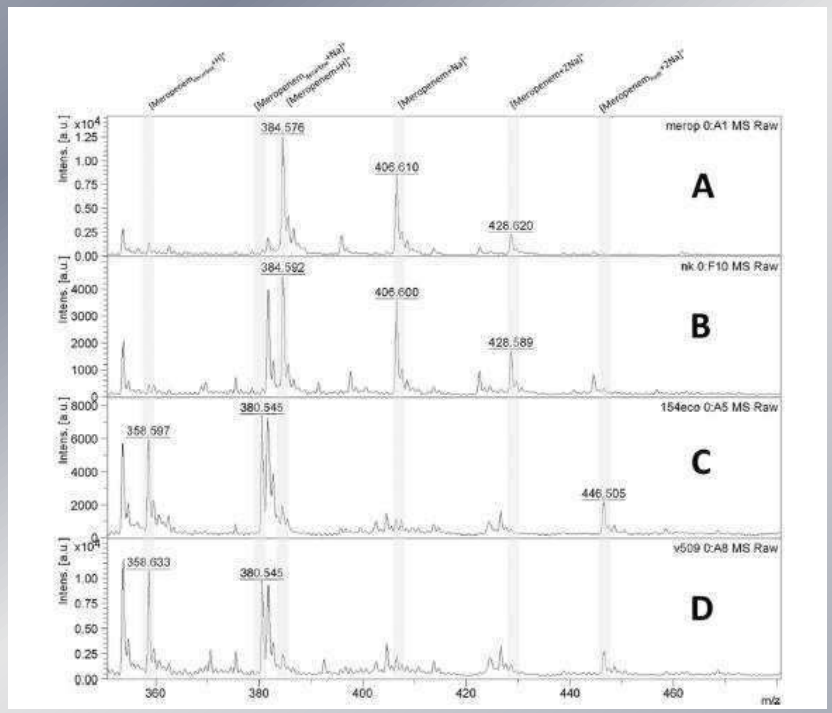
Cepa *E. coli* ATCC 25922

Disco MER o ERT

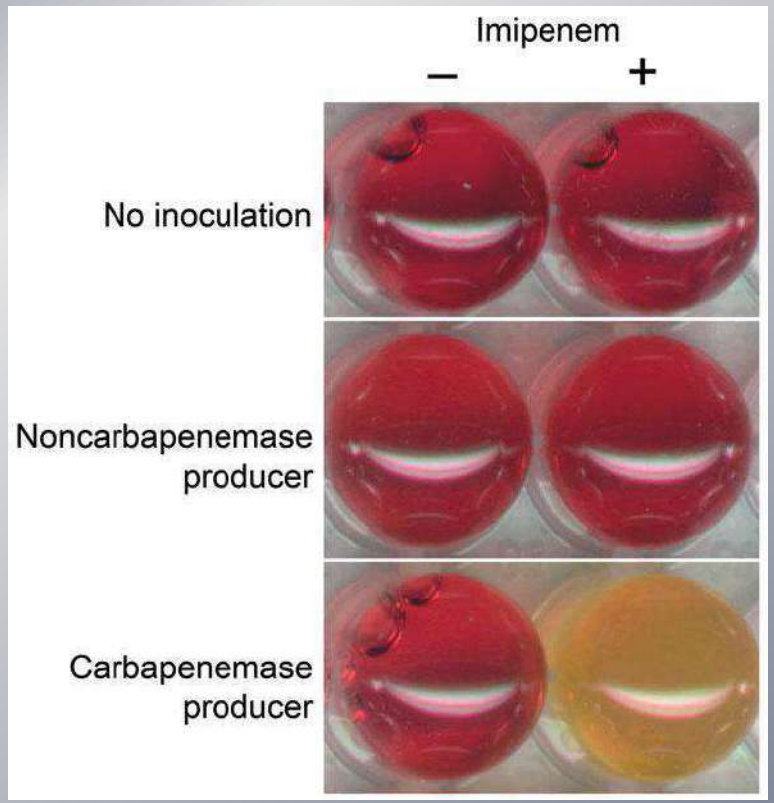
- Recomendado por CLSI y EUCAST para detección presuntiva carbapenemasas.
- Realizar en Enterobacterias con CMI de MER o ERT ≥0,5 o IMP ≥1.
- La inactivación del carbapenem (meropenem o ertapenem) por la carbapenemasa producida por la cepa problema permitir el crecimiento de *E. coli* sensible (ATCC 25922) a los lados de la estría efectuada con la cepa problema.
- No permite diferenciar entre diferentes tipos de carbapenemasas.
- Buena S en KPC, menor en OXA-48 y VIM.
- Falsos positivos en cepas CTX-M-15 o AmpC + con pérdida de porinas.

Tests rápidos para detección de carbapenemasas

Espectometría de masas MALDI-TOF



Carba NP test (indicador rojo fenol)



Aproximadamente tres horas
Poca experiencia sobre su rendimiento

Metalobectalamasas: VIM, IMP, NDM

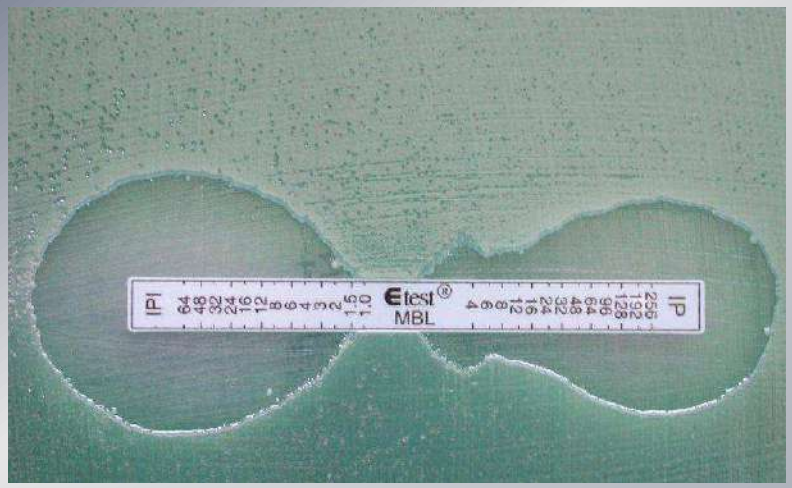
	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	4->256	R
Piper/Tazo (PI+TZ)	4->256	R
Amox/clav (AMC)	32->64	R
Cefalotina (CEP)	>128	R
Cefoxitina (CFO)	128->256	R
Cefuroxima (CXM)	>256	R
Cefotaxima (CTX)	8->64	R
Ceftazidima (CAZ)	16->256	R
Cefepima (FEP)	0,06-32	S/R
Aztreonam (AZT)	0,12-2	S
Imipenem (IMI)	0,25-8	r/R

- Metalobetalactamasas (grupo B de Ambler): Dependientes de Zn++
- Codificación plasmídica (VIM generalmente en integrones clase 1).
- Enterobacterias, *Pseudomonas,* GNNF.
- Resistencia a pencilinas, Blac+InBLac, cefalosporinas de amplio espectro, pero no aztreonam (si no coexistencia de βLEE o AmpC).
- Se inhiben con EDTA y ácido dipicolínico.

Detección fenotípica de metalobetalactamasas

Demostración sinergia con EDTA o ácido dipicolínico

CMI IMP/CMI IMP+ EDTA >8



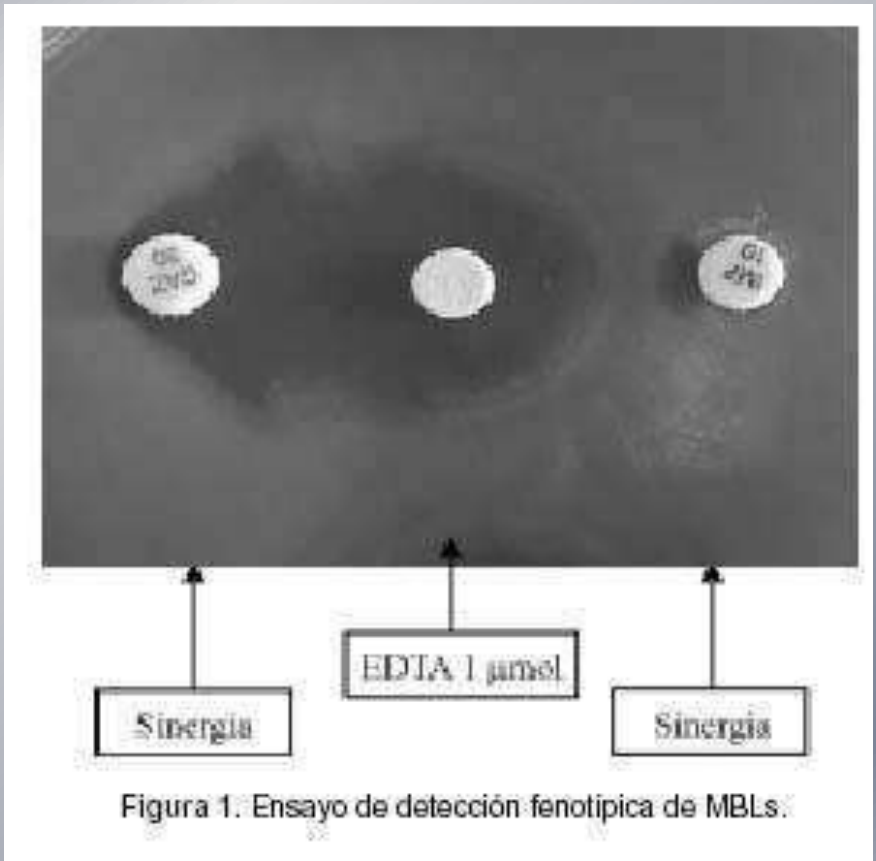


Figura 1. Ensayo de detección fenotípica de MBLs.

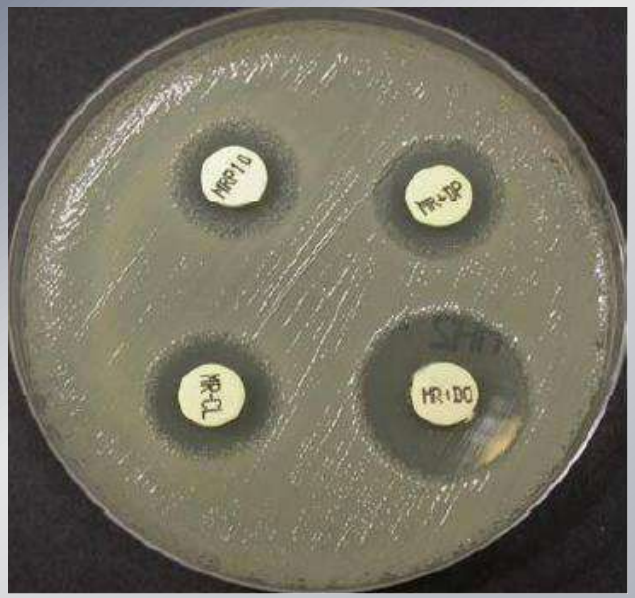
Distorsión halo inhibición o elipse o aparición zona fantasma

Carbapenemasas clase A: KPC

	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	16->256	r/R
Piper/Tazo (PI+TZ)	16-128	r/R
Amox/clav (AMC)	64-128	r/R
Cefalotina (CEP)	>256	R
Cefoxitina (CFO)	16->128	r/R
Cefuroxima (CXM)	>256	R
Cefotaxima (CTX)	0,25-64	r/R
Ceftazidima (CAZ)	0,5-32	S/r/R
Cefepima (FEP)	0,5->32	S/r/R
Aztreonam (AZT)	0,5->64	S/r/R
Imipenem (IMI)	1->32	r/R

- β-lactamasas clase A de Ambler ¿ βLEE con actividad carbapenemasa?
- Detectadas inicialmente en USA en 1996.
- Distribución mundial (USA, Sudamérica, Asia, Europa, Israel).
- Enterobacterias (sobre todo *K. pneumoniae* –ST258- y más raramente en *E. coli*), pero también *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*.
- Hidrolizan efectivamente penicilinas, carbapenémicos, CXM y generalmente cefalosporinas amplio espectro y AZT.
- Discretamente inhibidas por ácido clavulánico.
- Inhibidas por ácido borónico (al igual que AmpC) pero no por cloxacilina (a diferencia de AmpC).

Detección fenotípica carbapenemasas KPC



Demostración inhibición por borónico pero no con cloxacilina

- Demostración sinergia entre IMP, MER o ERT con ácido borónico en prueba doble disco (*K. pneumoniae* KPC positiva).

- Ampliación > 5mm halo inhibición de MER con borónico respecto disco sólo MER, pero no con cloxacilina ni dipicolínico en prueba con discos combinados (*K. pneumoniae* KPC positiva).

Carbapenemasas clase D: OXA-48 like

Antibiótico	CMI (mg/L)	Interpr
Amoxicilina	>128	R
ACL	>128	R
Ticarcilina	>128	R
Piperacilina	64	R
PTZ	64	R
Cefazolina	8	R
Cefoxitina	4	R
Cefotaxima	0,25	S
Ceftazidima	0,12	S
Cefepime	0,25	S
Aztreonam	0,06	S
Imipenem	2	S
Meropenem	0,25	S
Ertapenem	0,5	R

- OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 y 143 en *Acinetobacter*
- OXA-48 y su derivada OX-181 descritos en Enterobacterias en la cuenca mediterránea.
- Detección fenotípica complicada si no se asocia con otros mecanismos de resistencia.
- No existen inhibidores disponibles.
- Hidrólisis poco eficiente de carbapenémicos (>ERT) y cefalosporinas 3ª y 4ª generción.
- CMI de Temocilina > 32 mg/L.
- Resistencia a combinaciones BL+InBL
- A menudo se asocia a CTX-M-15 (sospechar si R a CFP y PTZ).

El laboratorio de microbiología en la vigilancia y control de la infección nosocomial

- Gestión de la información generada en el laboratorio de microbiología (primer eslabón en la detección de transmisión nosocomial)
  - Análisis evolución de las resistencias: informes periódicos de sensibilidad agregados.
  - Monitorización periódica microorganismos centinelas con mecanismos de resistencia relevantes.

- Capacidad para reconocer y detectar precozmente bacterias con mecanismos de resistencia relevantes o emergentes (validación e implantación pruebas rápidas) → adopción de medidas de control de la infección que impidan su diseminación.
- En centros de mayor tamaño estudios de tipificación molecular
- Estudio de portadores
- Comunicación estrecha, diaria y "a tiempo real" con los ECI.
- Participación en el diseño de intervenciones y programas de prevención: control microbiológico de su impacto.
- Colaboración en los programas de formación relacionados con la Infección nosocomial y el uso de antibióticos.

La utopía es el principio de todo progreso y el diseño de un futuro mejor.
Anatole France