



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesis de Grado

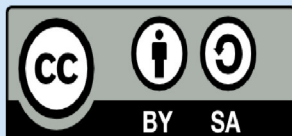
Bartolotta, Vanesa Claudina

Detección fenotípica de Serin- y Metallo-Carbapenemasas en aislamientos clínicos del género *Klebsiella* Spp. Hospital General de Agudos "Evita Pueblo"

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – Compartir igual 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Bartolotta, V. C. (2023). *Detección fenotípica de Serin- y Metallo- Carbapenemasas en aislamientos clínicos del género *Klebsiella* Spp. Hospital General de Agudos "Evita Pueblo"* [Tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ
<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

**DETECCIÓN FENOTÍPICA DE SERIN- Y METALO-
CARBAPENEMASAS EN AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DEL GÉNERO *KLEBSIELLA SPP.*
HOSPITAL GENERAL DE AGUDOS
“EVITA PUEBLO”**



Autor: Bartolotta Vanesa

Director de Trabajo Final: Dr. Faccone Diego

Directora de Campo: Dra. Costa Rosana

Carrera: Licenciatura en Bioquímica, Instituto de Salud

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1-Género <i>Klebsiella</i>	5
2- Antibióticos β -lactámicos	7
3- β -lactamasas y resistencia a los β -lactámicos	9
4- Evaluación de la sensibilidad antibiótica	11
5- Detección de mecanismos de resistencia	13
Herramientas para la detección de mecanismos de resistencia	13
Métodos rápidos de identificación de carbapenemasas.....	14
6- Epidemiología actual de la resistencia a los antimicrobianos en <i>K. pneumoniae</i>	15
IMPORTANCIA DEL TEMA.....	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Obtención de muestras clínicas	18
Muestras de urocultivo	20
Muestras de hemocultivo y retrocultivo	21
Muestras respiratorias bajas	22
Sistema automatizado VITEK®2 para identificación y sensibilidad bacteriana	22
Detección de mecanismos de resistencia mediante antibiograma estratégico.....	22
Detección fenotípica de carbapenemasas por método de difusión.....	24
Métodos rápidos:.....	25
RESULTADOS.....	27
1-Aislamientos de <i>Klebsiella</i> spp. recuperados de urocultivo.....	28
2-Aislamientos recuperados en muestras de Hemocultivos.	31
3-Aislamientos recuperados en muestras de secreciones respiratorias bajas.	34
CONCLUSION	35
ANEXO 1.....	37
ANEXO 2.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un tema alarmante que actualmente se encuentra entre los temas principales a nivel internacional. En el año 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las diez amenazas principales de salud pública a las que se enfrenta la humanidad. El excesivo y mal uso de los antimicrobianos selecciona patógenos resistentes a múltiples drogas limitando las opciones terapéuticas. Las infecciones bacterianas en pacientes internados son causadas principalmente por estos patógenos resistentes, que además tienen la capacidad de persistir en el ambiente nosocomial y/o de ser diseminados por las fómites y el personal sanitario. Entre estos microorganismos oportunistas, el género *Klebsiella* tiene un gran impacto gracias a la propiedad de presentar diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, incluidos los carbapenemes. Los carbapenemes son antibióticos de amplio espectro con una fuerte actividad bactericida. Las β -lactamasas con actividad carbapenemasa tienen la capacidad de hidrolizar a este grupo de drogas. Por lo tanto, los aislamientos de *Klebsiella* productores de carbapenemasas son una entidad de alto impacto clínico debido a las reducidas opciones terapéuticas disponibles para tratar al paciente infectado. En este estudio fueron analizadas muestras de urocultivo, hemocultivo y secreciones respiratorias bajas de pacientes internados en terapia intensiva de adultos del Hospital General de Agudos Evita Pueblo de Berazategui en el periodo de enero – mayo de 2023, con el fin de detectar la presencia de carbapenemasas epidemiológicamente significativas en el género *Klebsiella*. La búsqueda de carbapenemasas se realizó mediante antibiogramas con disposición estratégica de discos de antibióticos β -lactámicos e inhibidores. Las muestras se analizaron siguiendo un algoritmo diferencial dependiendo del tipo de origen de cada muestra. La sensibilidad de los 8 aislamientos de *Klebsiella* recuperados de las muestras de urocultivo se realizó mediante un antibiograma reducido que permitió detectar 3 sospechosos de ser productores de una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) o una carbapenemasa. Las muestras de hemocultivo y de origen respiratorio se analizaron con el sistema automatizado Vitek®2 para determinar la identificación bacteriana y la sensibilidad a los antibióticos. Ocho de las nueve cepas de *Klebsiella* recuperadas de hemocultivo y 6 de las 15 muestras respiratorias fueron sospechosas de ser productoras de BLEE o carbapenemasa. Del análisis del

antibiograma estratégico de los 17 aislamientos sospechosos de producir BLEE o carbapenemasa, se confirmaron 1 cepa productora de BLEE, 14 cepas productoras de una carbapenemasa, con o sin BLEE, y dos aislamientos productores de dos carbapenemasas simultaneas, KPC + metalo- β -lactamasa. Por lo tanto, la aplicación de un antibiograma estratégico permitió identificar en forma certera la presencia de β -lactamasa con actividad carbapenemasa. Esta información es fundamental para la toma de decisiones dado que permite ajustar el tratamiento antibiótico del paciente infectado en salas críticas como la unidad de cuidados intensivos.

INTRODUCCIÓN

1-Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* fue descrito por primera vez en 1882 por Von Frisch quien observó un bacilo encapsulado en un paciente con rinoscleroma, y posteriormente, en 1885 se le asignó el nombre en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs (1834-1913) (1,2,5,10). *Klebsiella* pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, al orden *Enterobacteriales* y a la familia *Enterobacteriaceae*, recientemente renombrada como *Enterobacterales* (5). Son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, inmóviles, no esporulados, y la mayoría presenta una cápsula de polisacáridos. Bioquímicamente se caracterizan por ser fermentadores de lactosa, catalasa positiva, oxidasa negativa, lisina descarboxilasa (LDC) positiva y ornitina descarboxilasa (ODC) negativa (1, 5) Una clasificación muy conveniente en la práctica microbiológica diaria es la agrupación bajo el acrónimo “KES” compuesta por los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, quienes comparten ciertas características metabólicas identificables con las baterías bioquímicas utilizadas normalmente (2). La clasificación taxonómica del género *Klebsiella* es sumamente compleja dado que ésta depende tanto del criterio como de la metodología utilizada para tal fin. Mediante análisis por secuenciación de los genes ARNr *16S* y *rpoB* (gen codificante de la subunidad B de la RNA polimerasa) en el año 2001 se evidenció que el género *Klebsiella* es un género muy heterogéneo en cuanto a especies y subespecies, y hasta el 2021 fueron reportadas públicamente 21 especies (1,2,3). Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente (suelo, agua, superficies), como colonizante asintomático del intestino, piel, nariz y fauces, como así también un agente causal de distintos tipos de infecciones que abarcan el tracto respiratorio, urinario, septicemias, entre otros (1,4,5,6). Los aislamientos de *Klebsiella* spp. causantes de infecciones humanas presentan distintos mecanismos de virulencia entre los cuales cabe destacar:

- Lipopolisacarido (LPS): es la monocapa externa de la membrana externa de todas las bacterias gram-negativas, está formada por una parte lipídica que se ancla a la capa interna de la membrana externa denominada lípido A, y la zona central denominada core formado por oligosacáridos. Al core de oligosacáridos se unen cadenas ramificadas de polisacáridos denominadas antígeno O que varían entre especies, y esta propiedad es utilizada para identificar grupos dentro de las especies bacterianas.

El lípido A posee una estructura altamente conservada y es el principal responsable de la mayoría de las patologías severas causada por bacterias gram –negativas debido a que actúa como una potente endotoxina cuando se produce la lisis bacteriana.

- Cápsula: Estructura rígida formada por repeticiones de oligosacáridos que recubre a la bacteria y que no solo evita su desecación y la adhesión a distintas superficies, sino también, actúa como un gran factor de virulencia ya que le permite evadir la respuesta inmune mediada por el complemento y la fagocitosis.
- Sistemas de captación de hierro (Sideróforos): el hierro es un componente fundamental para que un microorganismo lleve adelante un proceso infeccioso. Dentro de un hospedero los niveles plasmático de hierro libre son muy bajos debido a que se encuentra unido a proteínas transportadoras (transferrina), dichos niveles son aún más bajos cuando se está cursando un proceso infeccioso debido a que, en dicha circunstancia, es captado por una proteína especial denominada lactoferrina como respuesta innata del hospedero a dicho proceso infeccioso. Algunas bacterias, dentro de las cuales se encuentra el género *Klebsiella*, poseen un mecanismo particular para poder quelar hierro férrico de forma más eficiente a partir de su entorno, sintetizan y secretan unos péptidos pequeños denominados sideróforos los cuales poseen una estructura química que le proporciona una mayor afinidad por este mineral que las proteínas unidoras presentes en el hospedero. Los sideróforos son liberados al exterior bacteriano cuando se encuentran en la etapa de crecimiento permitiéndoles tener una ventaja en su obtención.
- Fimbrias: son estructuras proteicas filamentosas que recubren la superficie bacteriana y que le permite adherirse a través de receptores específicos presentes en el extremo de la fimbria, lo que resulta fundamental para colonizar y/o producir un proceso infeccioso en un hospedero. El género *Klebsiella* produce dos tipos de fimbrias principales las de tipo 1 y tipo 3. Las fimbrias de tipo 1 se adhieren a residuos de manosa, este monosacárido es muy abundante en una proteína que se encuentra en el epitelio urinario por lo que es común asociar al género *Klebsiella* con infecciones del tracto genito–urinario. Las fimbrias del tipo 3 están asociadas a la posibilidad de formar biofilms. (1, 4, 5 ,6 ,7 ,10).

Otra característica muy relevante del género *Klebsiella* spp. es su capacidad de incorporar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos a su perfil de resistencias natural. Este género bacteriano es resistente natural a los antibióticos β -lactámicos del

grupo de amino-penicilinas y carboxi-penicilinas gracias al gen cromosomal *bla*_{SHV-1}, que codifica para la β -lactamasa de amplio espectro SHV-1 (2). *Klebsiella* spp. puede adquirir genes que le confieren resistencia a los antimicrobianos mediante procesos de transferencia horizontal como son la conjugación y la traducción, mediadas por plásmidos y fagos, respectivamente (4, 6). A estos procesos también se le suman la capacidad de adquirir mutaciones en genes intrínsecos que son sitio blanco de acción de algunos antimicrobianos, como así también modificar la expresión de porinas de membrana y/o sistemas de eflujo de drogas (8, 13, 19, 21).

2- Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos betalactámicos constituyen la familia más numerosa y más utilizada para el tratamiento de infecciones bacterianas producidas por bacilos gram-negativos en la práctica clínica tanto a nivel de la comunidad como hospitalario (22). Esto es debido a su amplio espectro de acción, su baja toxicidad y su fuerte actividad bactericida (22). El anillo betalactámico es la estructura química que agrupa a dichos compuestos, cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de la pared bacteriana impidiendo la transpeptidación, entrecruzamiento entre las cadenas de peptidoglicano, mediante la unión del antibiótico a restos aminoacídicos de las proteínas de unión a penicilinas (PBP por sus siglas en inglés) que realizan dicho entrecruzamiento impidiendo de esta manera que la pared bacteriana se ensamble adecuadamente causando finalmente la lisis celular (9,11,13,21,22). A esta familia de antibióticos pertenecen los carbapenemes, β -lactámicos de última línea utilizados para el tratamiento de infecciones graves cuando se sospecha un patógeno multirresistente (16). El comienzo del desarrollo de los carbapenemes data del año 1976 cuando fue descubierta la estructura de la tienamicina producida por un microorganismo gram-positivo; este primer carbapenem prometía ser un antibiótico muy beneficioso, pero, finalmente tuvo el inconveniente de no ser estable en soluciones acuosas por lo que fue necesario el desarrollo de un derivado, dándose así origen al imipenem (9). El imipenem a su vez, tuvo la particularidad de ser hidrolizado a nivel renal lo que llevó a que su utilización deba realizarse en conjunto con otro compuesto, no antimicrobiano, que inhibe la acción de la enzima renal que produce dicho efecto (9,22). El resto de los carbapenemes que se fueron desarrollando poseen el carbono 1 sustituido evitando así su destrucción renal y los efectos nefrotóxicos que pudiera ocasionar. La estructura

química del anillo carbapenémico consiste en la condensación de un anillo β -lactámico (formado por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno) y otro pirrolidínico de 5 miembros con un átomo de carbono en la posición 1 (carba) y un enlace no saturado entre los carbonos 2 y 3 (Figura 1). Todos poseen un grupo hidroxietilo en el carbono 6 el cual protege al anillo β -lactámico de las enzimas β -lactamasas presentes en las bacterias que poseen resistencias a los antibióticos β -lactámicos (10,16). No se absorben por vía oral por lo que deben administrarse de forma parenteral, poseen buena distribución corporal sobre todo a nivel del sistema nervioso central, riñón y peritoneo. Son de acción tiempo dependiente, es decir su acción va a depender del tiempo en el cual la concentración del antibiótico se encuentre por encima de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la bacteria, poseen un efecto pos antibiótico prolongado y las diferentes cadenas laterales en el carbono 2 son las que les brindan a cada carbapenem las propiedades farmacodinámicas (relación entre la susceptibilidad del microorganismo y la del antibiótico para tratar la infección) y farmacocinéticas (cambio de la concentración del antibiótico en función de su absorción, distribución, metabolismo y excreción) específicas. Estas propiedades deberían ser evaluadas en forma conjunta con la patología infecciosa a tratar, el foco de la misma, y las condiciones clínicas de cada paciente en particular por el personal médico tratante para que su uso sea correcto y eficaz evitando así la resistencia bacteriana a estos fármacos y la resolución del caso clínico (8,9,10,11,12,16).

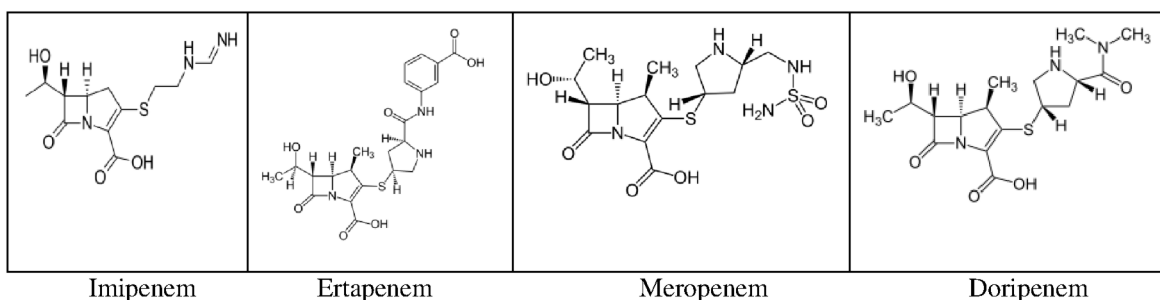
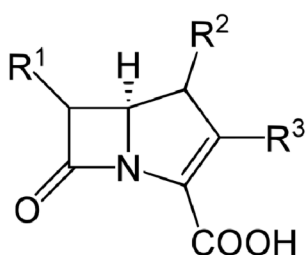


Figura 1: estructura genérica de los beta-lactámicos y estructura química de los principales carbapenemes.

3- β -lactamasas y resistencia a los β -lactámicos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un proceso complejo, multifactorial y rápidamente evolutivo en el cual la presión de selección juega un papel primordial. Por estudios epidemiológicos se observó que cuando se usa un antimicrobiano a gran escala aumenta la probabilidad de que surjan cepas resistentes a dicho antibiótico (7,18). Las bacterias tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia a antimicrobianos a partir de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. Estos nuevos genes adquiridos por una población bacteriana serán fundamentales para que dicho microorganismo proliferara (4, 10,18, 21). Las β -lactamasas son el principal mecanismo de resistencia en bacilos gram – negativos, forman parte de una amplia familia de enzimas cuyo mecanismo de acción es romper por hidrólisis el anillo de los antibióticos β -lactámicos, se alojan en el espacio periplásmico bacteriano logrando inactivarlos antes que lleguen a su sitio blanco, es decir a las proteínas de unión a penicilinas (PBP). Las β -lactamasas pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles. (7, 9, 13,18 22). Debido a la amplia diversidad de las β -lactamasas se propusieron diferentes clasificaciones para su nombramiento, una de ellas fue propuesta por Ambler en 1980 quien las clasificó en cuatro clases (A, B, C y D) teniendo en cuenta su secuencia primaria de aminoácidos y los mecanismos de interacción entre la enzima y su sustrato. Una segunda clasificación es la propuesta por Bush-Jacoby quienes toman en cuenta características funcionales de las enzimas como ser sus propiedades físico-químicas (peso molecular-punto isoeléctrico) el espectro de hidrólisis frente a los diferentes β -lactámicos y la capacidad de ser inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico, el tazobactam, sulbactam y agentes quelantes de cationes divalentes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (9, 14,16). Las enzimas carbapenemasas son un tipo de β -lactamasas que confieren resistencia a los antibióticos carbapenemes así como a la gran mayoría de los antibióticos β -lactámicos, las enzimas portadas en elementos genéticos móviles son el principal mecanismo transferible de resistencia a los carbapenemes (7, 10,18 ,21). Se las puede dividir en dos grandes grupos: i) las serinocarbapenemasas, las cuales poseen una serina en su centro activo para formar un enlace con el antibiótico y poder hidrolizarlo, y ii) las metalo- carbapenemasas que necesitan cationes divalentes, zinc, en su sitio activo para ejercer su acción hidrolítica. Las primeras pertenecen a la clase A y D de Ambler y las segundas a la clase B (13,18). Una de las principales serinocarbapenemasa de clase A, de gran importancia epidemiológica, es la enzima

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), se encuentra codificada por el gen bla_{KPC} (14,15). KPC-1 se denominó a la primera enzima identificada en el año 1996 en un hospital de Carolina del Norte, Estados Unidos, en una cepa de *K. pneumoniae* (7, 14, 15). La variante bla_{KPC-2} forma parte del transposón Tn4401 con el cual se diseminó rápidamente a nivel mundial. Tn4401 generalmente se aloja en plásmidos que pueden ser conjugativos, no conjugativos o movilizables, que ha contribuido a la gran propagación de esta enzima entre diferentes Enterobacterias. Muchas veces el plásmido que contiene el gen bla_{KPC-2} porta varios genes de resistencia adicionales confiriendo resistencia a múltiples drogas a los gérmenes portadores (7, 14, 15). Las enzimas KPC confieren resistencia a los carbapenemes, cefalosporinas, monobactámicos, cefamicinas y a todos demás β -lactámicos. Las diferentes variantes que se conocen de las enzimas KPC pueden conferir distintos niveles de resistencia a los carbapenemes, debido a que su poder de hidrólisis se ve afectado por mecanismos adicionales como son los cambios en la expresión de porinas de membrana las cuales son la vía de entrada de estos fármacos (7,14). Estos efectos pueden dificultar su detección por métodos automatizados de sensibilidad, y en ciertos casos se requiere confirmar presencia de KPC mediante otra metodología con el fin de evitar un fracaso terapéutico (14,15). La enzima KPC es inhibida por el ácido borónico y esta propiedad es utilizada en las pruebas de confirmación fenotípicas para su detección (14).

Las metalocarbapenemasas (MCPs) pertenecen a la clase B de Ambler, hidrolizan todos los antibióticos β -lactámicos, cefamicinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, carbapenemes, excepto el monobactámico aztreonam. Los genes codificantes de las MCPs pueden ser transportados como cassettes dentro de elementos genéticos móviles como integrones o dentro de estructuras tipo transposones (9). Generalmente estos elementos genéticos móviles muchas veces contienen genes de resistencias adicionales frente a otro tipo de antibióticos no β -lactámicos, como los aminoglucósidos (9). Las principales MCPs halladas en el género *Klebsiella* son NMD (*New Delhi Metallo- β -lactamase*) aislada por primera vez en 2008, IMP (en referencia a la resistencia a imipenem) y las enzimas de tipo VIM (*Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase*) Las MCPs no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas pero si por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA. (7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

4- Evaluación de la sensibilidad antibiótica

Métodos de evaluación de la sensibilidad antibiótica

La evaluación de la sensibilidad de las bacterias a determinados antibióticos se realiza mediante la exposición de un inóculo estandarizado del germen aislado a una concentración determinada de estos fármacos. Estos pueden brindar información cualitativa, donde se determina si una bacteria puede ser clasificada como sensible, resistente o con una sensibilidad intermedia a un antibiótico o grupo relacionado, y de forma cuantitativa, donde se obtiene la concentración mínima inhibitoria (CIM), es decir la concentración mínima del antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano.

a) Método cualitativo: Los antibiogramas por difusión denominados también método de Kirby-Bauer siguen siendo una de las herramientas más utilizadas a la hora de evaluar el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos. Estos consisten en colocar en la superficie del agar de una placa de medio Mueller- Hinton previamente sembrada con el microorganismo a evaluar, discos impregnados con concentraciones estandarizadas de diferentes antibióticos, los cuales difundirán radialmente alcanzando diferentes diámetros (halos) según su efectividad ante el patógeno sembrado. En nuestro país las pruebas de sensibilidad están estandarizadas bajo las normas del CLSI (23) que establece puntos de corte a través de los cuales se puede determinar si un determinado antibiótico sería efectivo contra un aislamiento clínico, donde una combinación microorganismo-antibiótico tendrá un diámetro de halo característico que permite definir si ese germen sería sensible o resistente al antibiótico probado. Para ello se requiere realizar el antibiograma por difusión siguiendo una serie de normas estandarizadas.

b) Métodos cuantitativos: son métodos que permiten determinar in vitro la CIM (concentración mínima inhibitoria) es decir, la finalidad de estas técnicas es evaluar cual es la concentración mínima de un determinado antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano para establecer una concentración que definirá un punto de corte a partir del cual se puede establecer la sensibilidad microbiana. Se pueden realizar en medio sólido, donde la concentración de antibiótico previamente determinada se coloca en la placa de agar donde se sembrara un inóculo específico de un patógeno a ensayar, o en caldos de cultivos con diluciones seriadas del antibiótico que serán inoculados con el patógeno y luego se evaluará el crecimiento del mismo por turbidez. Estas técnicas en caldo a su vez se pueden realizarse en tubos de ensayos denominados

de macrodiluciones o en policubetas denominadas técnicas de microdilución como las utilizadas por los métodos automatizados.

c) Sistema automatizado Vitek®2: La metodología de evaluación de la sensibilidad que realiza el sistema Vitek®2 (Figura 2), está basada en la determinación de la CIM a través de la técnica de microdilución. El equipo utiliza tarjetas que contienen pocillos con concentraciones específicas de cada antimicrobiano en un medio de cultivo y que se enfrenta a una carga estandarizada del microorganismo. El equipo posee software AES (*Advanced Expert System*) el cual a través de marcadores fenotípicos y categorías de sensibilidad previamente establecidas determina el fenotipo de sensibilidad del patógeno estudiado, así como evalúa el nivel de coherencia de los resultados brindados por las tarjetas y pone en alerta al usuario por resultados inusuales. La ventaja de este tipo de método de sensibilidad microbiana es que proporciona un valor de CIM que para ciertos procesos infecciosos como son las septicemias, infecciones respiratorias graves, son muy valiosos a la hora de administrar una terapia antibiótica, ya que le permite al personal médico ajustar la concentración del antibiótico a administrar en dosis y tiempos adecuados, sobre todo en aquellos pacientes que presenten patologías que puedan verse afectadas a un más por un esquema antimicrobiano, sin embargo, en ciertos aislamientos bacterianos puede no definir adecuadamente un fenotipo posible de resistencia, hecho que pone de manifiesto la necesidad de evaluar críticamente los resultados arrojados por el AES y realizar otros métodos de detección complementarios.



Figura 2: Sistema automatizado Vitek®2 Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023)

5- Detección de mecanismos de resistencia

Herramientas para la detección de mecanismos de resistencia

Los métodos cualitativos y cuantitativos brindan información del perfil de sensibilidad de un aislamiento frente a varios antibióticos, sin embargo hay situaciones en las cuales se requiere confirmar el mecanismo de resistencia involucrado. El conocimiento de si la resistencia a ciertas drogas está asociada a un mecanismo enzimático permite guiar el tratamiento del paciente infectado. Por lo tanto, en base a distintas estrategias para la evaluación de la sensibilidad y luego de una lectura interpretada de estos resultados por parte de un microbiólogo entrenado, se pueden identificar ciertos mecanismos de resistencia con el objetivo de optimizar el tratamiento antibiótico y reducir las chances de fracaso terapéutico. Conocer variables como la epidemiología local, fenotipos habituales y raros, género y especie del microorganismo infectante, de qué tipo de muestra se aisló la bacteria, la historia clínica del paciente, son cruciales a la hora de planificar una prueba de sensibilidad antibiótica, ya que un germen puede mostrar sensibilidad “in vitro” pero dicha sensibilidad no sea efectiva en el foco infeccioso. Los puntos de corte definidos por los organismos como el CLSI fueron establecidos con el objetivo de asegurar el tratamiento del paciente y evitar posibles fallas, pero no para esclarecer un posible mecanismo de resistencia. Por lo tanto, la utilización de pruebas como la colocación estratégica de discos en placa y la realización de una lectura interpretada de los resultados obtenidos, es una herramienta fundamental en el laboratorio de microbiología clínica. La colocación estratégica de discos incluye una disposición específica de discos con determinados antibióticos y su enfrentamiento con otros utilizados como inhibidores/marcadores que permitirán poner de manifiesto un posible mecanismo de resistencia. Por ejemplo, se utilizan discos conteniendo inhibidores como el ácido clavulánico para visualizar su efecto inhibitorio frente a β -lactamasas de espectro extendido ya que este se une de forma irreversible a la enzima formando un complejo que la inhabilita funcionalmente o el EDTA como quelante de zinc y su efecto sobre la actividad de las metalo-carbapenemasas las cuales utilizan estos iones para poder ejercer su efecto hidrolítico; como así también la actividad inhibitoria específica del ácido borónico frente a la carbapenemasa tipo KPC.

Métodos rápidos de identificación de carbapenemasas

Existen en el mercado una gran cantidad de métodos rápidos para la detección de carbapenemasas en forma rápida. Sin embargo algunos de estos métodos rápidos tienen altos costos y no están siempre al alcance de todos los hospitales. Los métodos mencionados a continuación son aquellos a los que se pudo acceder para el presente trabajo.

a) Rapid carb blue kit de Diatabs (ROSCO)

Método rápido para la detección de carbapenemasas producidas por bacilos gram negativos basados en el cambio de color del indicador de PH azul de bromotimol de un color azul negativo a un color amarillo - verdoso cuando una carbapenemasa hidroliza el carbapenémico imipenem. Al utilizar esta droga se considera que todas las carbapenemasas son resistentes a este antibiótico. Este método si bien tiene la ventaja de ser una prueba rápida, no permitir diferenciar entre una metalcarbapenemasa y una serinocarbapenemasa. Al evaluar actividad enzimática este método tampoco permite detectar un mecanismo de resistencia como la impermeabilidad bacteriana, lo cual su uso debe sea evaluado en un contexto y acompañado con otros métodos de detección de resistencia a carbapenems.

b) Inmunocromatografía

La inmunocromatografía de flujo lateral es una herramienta con alta precisión que brinda resultados en forma muy rápida. Estos métodos se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales contra ciertas carbapenemasas que se encuentran adheridos a una placa cromatográfica. Este sistema permite detectar en 15 minutos la presencia de familias de enzimas epidemiológicamente significativas en nuestra región. En nuestro país hay distintos sistemas disponibles, pero al que tuvimos acceso es el que permite detectar las carbapenemasas OXA-163, OXA -48 y KPC. Estos sistemas son muy eficientes, sin embargo tienen un costo alto por reacción y su utilización está restringida para casos clínicos de extrema gravedad.

6- Epidemiología actual de la resistencia a los antimicrobianos en *K. pneumoniae*

K. pneumoniae resistente a múltiples drogas (MDR) es un patógeno de gran relevancia clínica ya que limita las posibilidades de tratamiento de las infecciones. La resistencia a ciertas drogas de este germen se mantienen estables en los últimos años, sin embargo se ha visto un incremento alarmante de la resistencia a carbapenemes y en especial por la pandemia por COVID-19 (Figura 3). La resistencia a carbapenemes, imipenem y meropenem, se incrementó desde un 10% en el año 2010 hasta alcanzar un 33,8% en el año 2021 (Figura 3) (24)

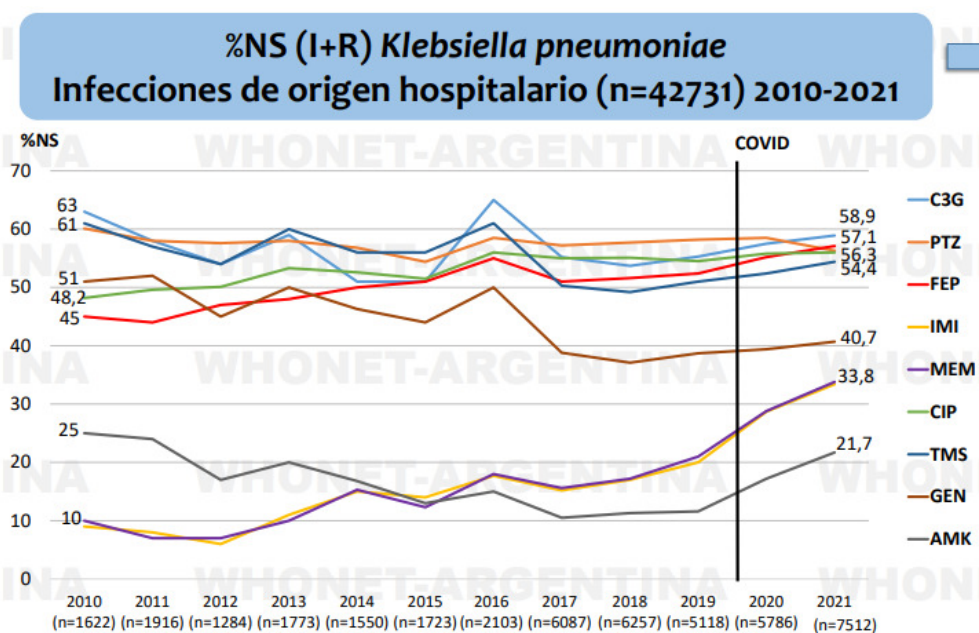


Figura 3. Vigilancia de la resistencia de *K. pneumoniae* causante de infecciones a través de la Red-WHONET-Argentina. Los números (n) debajo de los años corresponden a la cantidad de aislamientos incluidos en dicho periodo. Abreviaturas figura: NS, no sensible; I+R, categorías intermedio más resistente; C3G, cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftacidima); PTZ, piperacilina-tazobactam; FEP, cefepime; IMI, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; TMS, trimetoprima-sulfametoxazol; GEN, gentamicina; AMK, amikacina. Figura modificada de Rapoport, M. 2022 (24).

Un consecuencia inquietante de la pandemia por COVID-19 es el cambio epidemiológico en los mecanismos de resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* (Figura 4). En este sentido se observó un incremento de 10% al 30% de mecanismos enzimáticos mediados por metalo-beta-lactamasas, además de la emergencia de bacterias con múltiples mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenemes (Figura

4). Las combinaciones de mecanismos observados fueron: NDM+KPC, KPC+OXA-48-like, y NDM+OXA-48-like. Recientemente se publicó la caracterización de 82 aislamientos clínicos de Enterobacterales productores de al menos dos carbapenemasas de nuestro país, de los cuales 77 eran *K. pneumoniae* (25) (Faccone, 2023). En ese trabajo se observó que el 95% de los aislamientos productores de dos carbapenemasas tenían la combinación de las enzimas NDM + KPC, con las siguientes combinaciones alélicas: KPC-2+NDM-5 (55%), KPC-2+NDM-1 (32,5%), KPC-3+NDM-1 (5%), y KPC-2+NDM-5+OXA-163 (2,5%) (25) (Faccone, 2023).

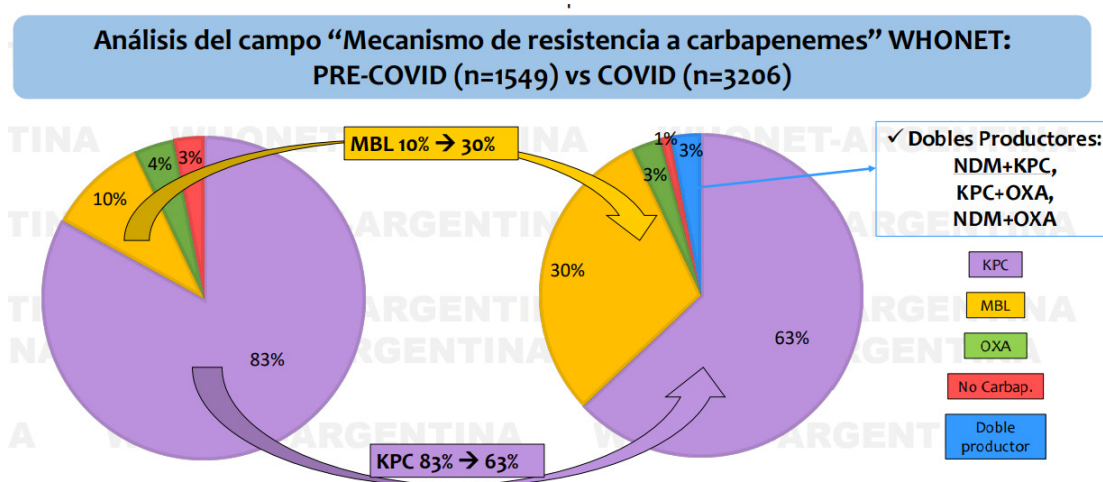


Figura 4. Cambios en la epidemiología de los mecanismos de resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* luego de la pandemia por COVID-19. Figura modificada de Rapoport, M. 2022 (24).

Por otro lado, en noviembre del año 2021 el Servicio de Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” realizó un estudio multicéntrico con 183 instituciones de salud participantes de todo el país, en el cual se observó que un 8,7% de los aislamientos estudiados fueron confirmados como doble productores de carbapenemasas, siendo *K. pneumoniae* productora de la combinación KPC+NMD como la principal causante de esta situación (26).

Esta grave situación epidemiológica debe ser tenida en cuenta por cada institución de salud para implementar medidas que permitan la rápida detección de estos mecanismos, optimizar el tratamiento del paciente infectado, y contener la diseminación de la resistencia.

IMPORTANCIA DEL TEMA

La identificación rápida y certera del perfil y de los mecanismos de resistencia a drogas de relevancia en patógenos de importancia clínica, como *K. pneumoniae*, en pacientes críticos internados en unidades de terapia intensiva, permiten definir la terapia antimicrobiana óptima. La modificación del tratamiento empírico por un tratamiento óptimo permite mejorar la utilización de antimicrobianos en la clínica y contener la diseminación de la resistencia que podrían propagarse causando brotes nosocomiales de difícil erradicación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos y emplear estrategias fenotípicas para la detección de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. recuperados de distintas muestras de pacientes internados en la unidad de terapia intensiva de adultos del Hospital General de Agudos Evita Pueblo de Berazategui.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar estrategias o algoritmos específicos para el aislamiento de bacterias dependiendo del tipo de muestra clínica derivada.
- Realizar la identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas o por medio del sistema automatizado Vitek®2, y seleccionar aquellas pertenecientes al género *Klebsiella* spp.
- Evaluar la sensibilidad de los aislamientos del género *Klebsiella* spp. por el método de difusión en agar o el sistema automatizado Vitek®2.
- Utilizar la técnica de antibiograma con colocación estratégica de discos para poner de manifiesto la posible presencia de mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos de relevancia clínica en aislamientos del género *Klebsiella* spp.
- Utilizar métodos rápidos para la detección de carbapenemasas.
- Aplicar algoritmos de trabajo, interpretar y analizar en forma crítica los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, observacional, descriptivo y de corte transversal orientado a la detección de enzimas hidrolíticas que confieren resistencia a los antibióticos carbapenemes en el género *Klebsiella* spp. en el período Enero-Mayo de 2023.

Obtención de muestras clínicas

Las muestras analizadas fueron hemocultivos, retrocultivos, urocultivos y muestras de secreciones respiratorias bajas de pacientes adultos con más de 48hs de internación en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Hospital General de Agudos Evita Pueblo de Berazategui, provincia de Buenos Aires. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de dicho hospital. Los tipos de muestras fueron elegidos en función de ser indicadores de infección intrahospitalaria, por lo que sus perfiles de sensibilidad nos permiten conocer la epidemiología de la institución así como el seguimiento de los tratamientos empíricos establecidos por el personal médico. Los especímenes analizados fueron obtenidos de muestras clínicas adecuadamente obtenidas y representativas del proceso infeccioso teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Antes de la toma de muestra se evaluó el riesgo/beneficio de su obtención para el paciente.
2. Cada muestra fue acompañada de una solicitud médica confeccionada de manera legible y en donde figuraba:
 - a. Identificación del paciente (Apellido y nombre, DNI, fecha de nacimiento, sexo)
 - b. Enfermedad de base
 - c. Identificación del episodio
 - d. Fecha de solicitud
 - e. Datos de la muestra: fecha y hora de su obtención, naturaleza, procedimiento de la extracción (señalando la utilización de técnicas especiales)
 - f. Médico solicitante
 - g. Servicio solicitante

- h. Datos clínicos adicionales: diagnóstico presuntivo, estado inmunitario del paciente, tratamiento antibiótico si lo hubiere recibido.
3. Estudios/pruebas solicitadas: Indicadas claramente el tipo o tipos de determinaciones solicitadas.
4. Obtención de la muestra: La toma de muestra se realizó en el sitio exacto de la lesión/sitio de infección y lo más rápido posible, en condiciones de máxima asepsia, evitando contaminaciones ambientales, del personal y del propio paciente a la muestra y viceversa.
5. Cantidad de muestra: La cantidad de muestra tomada debió ser suficiente para el diagnóstico solicitado. En ocasiones, una escasa cantidad de muestra puede ser la causa de falsos negativos. En caso que se solicitó más de un estudio se debió mandar mayor cantidad, y de no ser posible, se jerarquizó el diagnóstico.
6. Calidad del cultivo: Recomendable que el material destinado al cultivo no haya estado en contacto con sustancias desinfectantes o anestésicas.
7. Momento de toma de muestra: La muestra se recogió antes de iniciar cualquier terapia antimicrobiana. Caso contrario, se obtuvo justo antes de la administración de una dosis, o tras 48 horas de retirado, indicándolo en el formulario de petición.
8. Transporte de la muestra: En envases estériles, con cierres a prueba de fugas, sin el agregado de conservantes.
9. Identificación de la muestra: Con el apellido y nombre del paciente y el tipo de muestra en el contenedor, no en la tapa.
10. Envío de la muestra: El envío al laboratorio de microbiología debió ser lo más rápido posible con objeto de asegurar la supervivencia de microorganismos de difícil crecimiento y de evitar el sobrecrecimiento de la flora normal/contaminante, acortar el tiempo de contacto con anestésicos locales o con otras sustancias con acción antimicrobiana.

Medios de cultivo primario utilizados: Agar sangre de carnero, Agar chocolate, Agar CLED (cisteína-lactosa deficientes en electrolitos), Infusión cerebro-corazón; seleccionados teniendo en cuenta el tipo de muestra a analizar y su procedencia (ver más adelante). Considerando que la población de estudio fueron pacientes internados

en la Unidad de Terapia Intensiva de adultos en algunos casos se realizaron siembras en distintos tipos de medios de cultivo dependiendo de la situación de cada paciente.

La identificación bacteriana se realizó en forma diferencial dependiendo del tipo de muestra (ver más adelante). Se emplearon pruebas manuales básicas como la morfología colonial, tinción de Gram, catalasa y oxidasas, para bacterias recuperadas de muestras de urocultivo se procedió a realizar la identificación mediante pruebas convencionales, mientras que los aislamientos de muestras de hemocultivo, retrocultivo y secreciones respiratorias bajas se identificaron mediante el sistema automatizado Vitek®2

Muestras de urocultivo

Las muestras de orina fueron sembradas en agar CLED y en agar sangre cuando fue proveniente de un paciente con patología renal para poner en evidencia algún posible proceso hemolítico. Las muestras de orina consideradas para este estudio fueron provenientes de un solo cultivo. A partir del crecimiento de una colonia pura se realizó un extendido bacteriano, se coloreó con tinción de Gram, se seleccionaron bacilos gram negativos y las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana utilizadas fueron:

- Catalasa: prueba que permite detectar la presencia de la enzima catalasa la cual produce la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno, la presencia de burbujas indica una prueba positiva.
- Prueba de oxidasa: permite determina la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, en donde en presencia de oxigeno atmosférico si la enzima está presente oxidará el reactivo fenilendiamina generando un compuesto de color purpura.
- Agar Triple Sugar Iron (TSI): medio utilizado para orientar la identificación de patógenos entéricos gram negativos capaces de fermentar carbohidratos con la formación de ácido y gas, y para detectar la producción de sulfuro de hidrógeno. El medio está compuesto por 1 parte de glucosa, 10 partes de lactosa y 10 partes de sacarosa, sulfato de amonio ferroso, y tiosulfato de sodio, el indicador es rojo de metilo. Las bacterias del género *Klebsiella* son capaces de fermentar tanto la glucosa como la lactosa produciendo el viraje del indicador presente en el medio de un color rojo a un color amarillo tanto en la profundidad del tubo como en el pico de flauta con producción de gas.

- Agar Citrato Simmons: medio que permite detectar la habilidad de las bacterias de utilizar el citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno obteniéndose productos alcalinos que viran el indicador azul de bromotimol de un color verde a un color azul cuando la prueba es positiva.
- Fenilalanina: medio que permite poner en evidencia la presencia de la enzima fenilalanina deaminasa. El medio de cultivo color es ámbar claro el cual vira a un color verde en el pico de flauta y en el líquido de condensación al agregar Fenilalanina Reactivo indicando una prueba positiva e indicando que el microorganismo posee la enzima.
- SIM: medio semisólido utilizado para evaluar la movilidad, la producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos. Algunas bacterias son capaces de metabolizar el aminoácido triptófano para producir indol, el cual al ser combinado con el aldehído del reactivo de Kovac's origina un compuesto de color rojo. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente en el medio para dar un compuesto de color negro. La consistencia del medio al ser semisólida permite apreciar si hay crecimiento bacteriano más allá de la línea de siembra indicando movilidad bacteriana.
- Christensen Medio (Urea Agar Base): medio que permite evidenciar si las bacterias poseen la enzima ureasa y son capaces de hidrolizar urea liberando amoníaco y dióxido de carbono. Al alcalinizar el medio de cultivo el indicador rojo de fenol de color amarillo vira al rosado cuando la prueba es positiva.

Muestras de hemocultivo y retrocultivo

Los frascos de hemocultivos y retrocultivos se colocaron en el equipo automatizado BactAlert (marca BD) para hemocultivos, el cual mantiene los frascos a 37°C con agitación constante durante 5 a 7 días. Dicho equipo realiza lecturas cada 15 minutos aproximadamente detectando cambios en la concentración de CO₂ que hace virar el indicador a un color amarillo cuando resulte positivo. Las muestras positivas fueron inoculadas en agar chocolate, un medio de cultivo enriquecido y no selectivo que permite el desarrollo de patógenos que requieren factores de crecimientos específicos. Estas muestras fueron incubadas en estufa a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂. A partir de una colonia pura se realizó un extendido bacteriano, se coloreó con tinción de Gram para diferenciar microorganismos gram-positivos de gram- negativos dado que la

identificación y la sensibilidad bacteriana se realizaron mediante el sistema automatizado Vitek®2 (ver más adelante).

Muestras respiratorias bajas

Se incluyeron en esta categoría a todas las muestras respiratorias de las vías aéreas inferiores obtenidas por diferentes procedimientos, como por ejemplo lavados broncoalveolares y aspirados traqueales como los más relevantes de la unidad de cuidados críticos. Las siembras de las muestras se realizaron en medios de cultivo agar chocolate, el cual permite el crecimiento de los microorganismos exigentes, agar sangre para poder observar una posible hemólisis y agar CLED que permite una mejor apreciación de los bacilos gram - negativos. La identificación y la sensibilidad microbiana se realizaron por el método automatizado Vitek®2 (ver más adelante).

Sistema automatizado VITEK®2 para identificación y sensibilidad bacteriana

Para las muestras de hemocultivos, retrocultivos y secreciones respiratorias bajas se utilizó el sistema automatizado Vitek®2 (Figura 1). El equipo utiliza un sistema de tarjetas con reactivos que incluye 47 pruebas bioquímicas que evalúan distintas fuentes de carbono y actividades enzimáticas logrando la identificación bacteriana (ver anexo 1). Las tarjetas o paneles de identificación y sensibilidad se inocularon con una suspensión bacteriana preparada a partir de colonias aisladas del crecimiento en placas en medios de cultivos puros, aptos según especificación del fabricante. En un tubo con iguales proporciones de agua destilada y solución fisiológica estériles se realizó cada suspensión bacteriana a una concentración de 0,5 en la escala de McFarland ajustada con un nefelómetro. El panel de identificación bacteriana para nuestro trabajo se utilizó la tarjeta Vitek®2 GN (Ref 21341) para microorganismos gram - negativos. Para evaluar la sensibilidad antibiótica se utilizó la tarjeta Vitek®2 AST-N421 (Ref 424055) diseñada para patógenos de pacientes internados, donde los antibióticos a testear pertenecen al grupo utilizado para el tratamiento de patologías hospitalarias (ver anexo 2). Los puntos de corte utilizados fueron los establecidos por el CLSI (23).

Detección de mecanismos de resistencia mediante antibiograma estratégico

El antibiograma estratégico se realizó a todos los aislamientos recuperados de muestras de urocultivo, hemocultivo, retrocultivo o muestras respiratorias que fuesen sospechosas

de producir carbapenemasa, halo de imipenem <22 mm, o CIM de carbapenemes(imipenem/meropenem >2 ug/ml), detectadas por el sistema Vitek®2 . El sistema de microdilución automatizada permite, a través de un software experto del equipo, determinar fenotipos probables de algunos mecanismos de resistencia, aunque no permite la diferenciación entre clases de carbapenemasas, por lo que se requiere la utilización de otros métodos confirmatorios en aquellos aislamientos de Enterobacterias sospechosas de producir carbapenemasa.

El antibiograma o técnica de Kirby-Bauer se realizó siguiendo las normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (23). Se toman 3-4 colonias del aislamiento a analizar y se resuspendieron en solución fisiológica hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. Con un hisopo estéril se inoculó la suspensión bacteriana en la superficie de placas secas de agar Müller-Hinton en tres direcciones, girando 60° las placas en cada pasada a modo de asegurar un crecimiento bacteriano confluyente y homogéneo. Luego se colocaron sobre el agar inoculado los discos de antibióticos y se incubaron a 35°C durante 18-20 horas. Los halos de inhibición se midieron con un calibre y se interpretaron de acuerdo a guías del CLSI (23). Los monodiscos (Liofilchem) con antibióticos ensayados fueron:

Tabla 1= Puntos de corte para Enterobacterias según CLSI (23)

Interpretación según los puntos de corte en mm				
ANTIBIOTICO	Carga (ug)	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Amoxicilina/clavulánico	30	≥18	14-17	≤13
Ceftazidima/avibactam	30	≥21	-	≤20
Aztreonam	30	≥21	18-20	≤17
Cefepime	30	≥25	19-24	≤18
Cefazolina	30	≥15	-	≤14
Cefotaxima	30	≥26	23-25	≤22
Ceftazidima	30	≥21	18-20	≤17
Cefoxitina	30	≥18	15-17	≤14
Imipenem	10	≥23	20-22	≤19
Ertapenem	10	≥22	19-21	≤18
Meropenem	10	≥23	20-22	≤19
Piperacilina/tazobactam	110	≥25	21-24	≤20
EDTA	NC	NC	NC	NC

Ácido borónico	300	NC	NC	NC
----------------	-----	----	----	----

NC= No corresponde

Detección fenotípica de carbapenemasas por método de difusión

Se realizó mediante la colocación estratégica de discos de carbapenemes e inhibidores para visualización de sinergias ante la presencia de carbapenemasas. Para este estudio se utilizó la tabla 2 como referencia para la detección de carbapenemasas prevalentes en el género *Klebsiella*.

Tipo de carbapenemasa	Sinergia entre carbapenemes e inhibidores específicos	
	IMI +EDTA+MER	IMI +BOR+ERT
Clase A (KPC)	-	+
Clase B (VIM, IMP, NDM)	+	-

Tabla 2: detección fenotípica de carbapenemasas: IMI (imipenem), EDTA (ác. etilendiamino-tetra-acético), MER (meropenem), BOR (ác. borónico), ERT (ertapenem)

Nota: las carbapenemasas clase D (OXA) no fueron incluidas en este estudio.

Para la colocación de los discos de carbapenemes se utilizó la mitad de una placa de MH y fueron colocados en forma lineal siguiendo el siguiente esquema:

ertapenem – ac. borónico – imipenem -EDTA-meropenem (Figura 5)

Un disco de ceftazidima/avibactam (14 ug/ml) fue colocado a 20 mm de un disco de aztreonam para visualizar la posible sinergia en casos de la presencia de una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) presente junto a una MCP, y a 15 mm de un disco de imipenem para la visualización de sinergia en caso de una KPC.

Un disco de piperacilina/tazobactam fue colocado en otro sector de la placa ya que la sensibilidad a este antimicrobiano descarta la presencia de carbapenemasa.

En base a la disposición estratégica, se realizó la siguiente interpretación de resultados:

- Sinergia positiva EDTA/carbapenem (imipenem, meropenem), aztreonam sensible → presencia de metalo-carbapenemasa
- Sinergia positiva EDTA/carbapenem (imipenem, meropenem), sinergia positiva ceftazidima/avibactam-aztreonam → presencia de metalo-carbapenemasa +BLEE

- Sinergia positiva ácido borónico/ carbapenem (imipenem, ertapenem) → presencia de serino-carbapenemasa (KPC)
- Sinergia positiva ácido borónico/ carbapenem (imipenem, ertapenem), sinergia positiva EDTA/carbapenem (imipenem, meropenem) doble productora de carbapenemasa: KPC+MCP

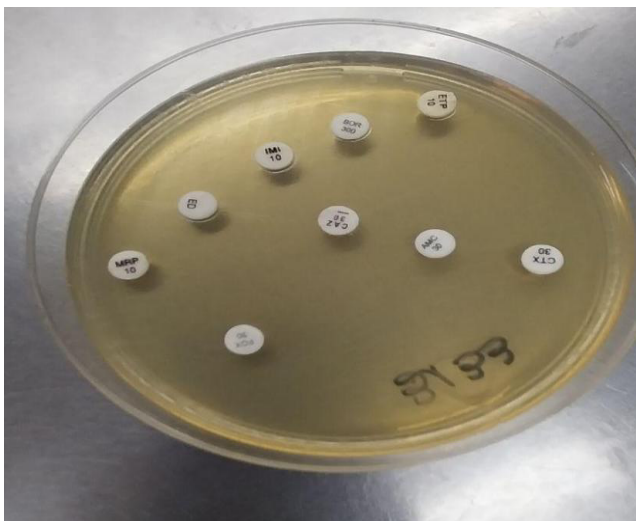


Figura 5: Disposición estratégica de discos en antibiograma, MEM(meropenem), ED(EDTA), IMP(imipenem), BOR(ac. borónico), ETP(ertapenem), CAZ(ceftazidima/avibactam), AMC(amoxicilina/clavulánico), CTX(cefotaxima), FOX(cefoxitina), Hospital General de Agudos Evita Pueblo 2023

Métodos rápidos:

a) RAPID CARB BLUE KIT DE DIATABS (ROSCO)

Se utilizó en aquellos aislamientos en los cuales la detección fenotípica de carbapenemasa por difusión en agar no fue concluyente y en donde fue necesario una resolución rápida para brindarle al personal médico información crucial que le permitiera decidir una conducta terapéutica a implementar. Para realizar el método se utilizaron colonias frescas desarrolladas en agar Mueller-Hinton, el cual es un medio de crecimiento bacteriano apto especificado por el fabricante para poder realizar el método rápido de identificación de carbapenemasas. Se tomaron colonias de los bordes de las placas evitando cualquier tipo de contacto que podrían haber tenido con algún disco de antibiótico testado previamente en la placa, se realizaron suspensiones bacterianas alcanzando una

turbidez de 2 de la escala Mc Farland en 200 ul de solución salina ajustada a PH 8.5 en dos tubos eppendorf como indica el fabricante, se dejó reposar 30 minutos para permitir la liberación de las posibles carbapenemasas y se agregó al tubo de reacción la tableta de “imipenem (2x) + Bromothymol” y al tubo destinado al control (control negativo) la tableta “CARB Negative Control Blue”. Se agitó mediante un vórtex para la disgregación de las tabletas y se incubó en estufa hasta un máximo de 2 horas observándose a ojo desnudo los resultados cada 15 minutos. Se observó al cabo del tiempo establecido el color de la suspensión en el fondo del tubo.

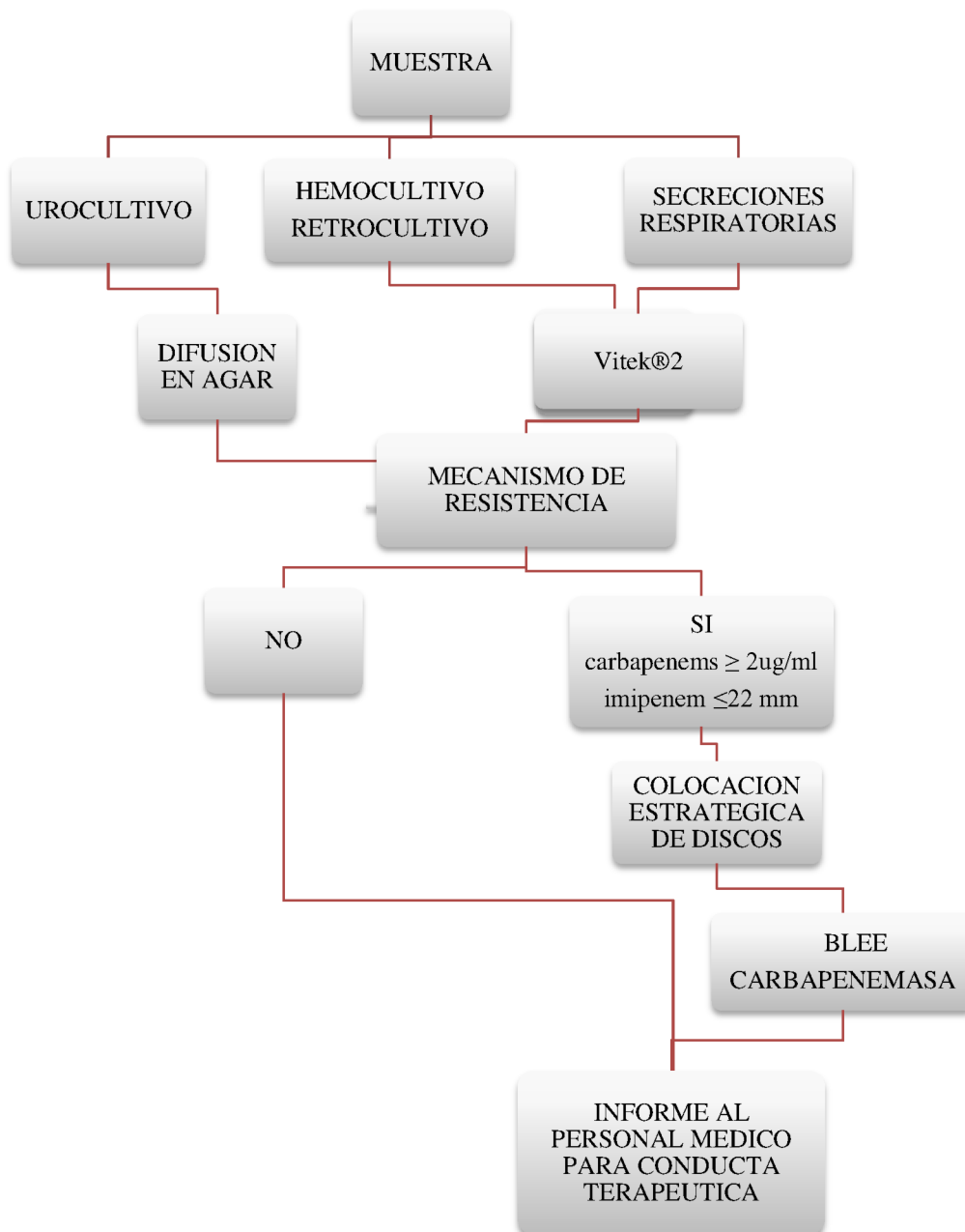
b) **Placa Inmunocromatografica (Laboratorio BRITANIA)**

Fue utilizada a modo de prueba confirmatoria en una muestra clínica en particular. En un tubo brindado por el kit comercial se colocaron 10 gotas de la solución tampón, se tomaron con un ansa estéril colonias puras de un aislado bacteriano a testear y se introdujeron en el tubo con la solución buffer mezclándolos hasta formar una solución homogénea, se cerró con el pico gotero. Mediante el tubo con tapa gotero se colocaron gotas de la muestra en la ventana del dispositivo y se dejó que la solución muestra corriera, a los 15 minutos se observó la placa. Esta placa permite la detección simultánea de las carbapenemasas tipo KPC, OXA-48 y OXA-163.

RESULTADOS

Para la realización de esta tesis se utilizó el siguiente algoritmo de trabajo según el origen de las muestras.

ALGORITMO DE TRABAJO



1-Aislamientos de *Klebsiella* spp. recuperados de urocultivo.

En el periodo enero a mayo de 2023 fueron remitidos al laboratorio de Microbiología del hospital General de Agudos Evita Pueblo 64 muestras de urocultivos provenientes de la sala de Terapia Intensiva de adultos (UTI). Del total de muestras, en 57 (89%) se obtuvo crecimiento microbiano, pudiéndose identificar: 44 (77%) bacilos gram – negativos, 3 (5%) cocos gram – positivos y 10 (18%) levaduras.

De las 44 muestras positivas para bacilos gram - negativos se pudieron identificar 8 cepas de *Klebsiella pneumoniae* a través de pruebas bioquímica convencionales. En la Figura 6 se observa un aislamiento representativo de *K. pneumoniae* crecido en medio CLED. Los 8 aislamientos de *K. pneumoniae* arrojaron el perfil bioquímico de identificación convencional detallado en la tabla 3 a continuación (Figura 7).

TSI	FENILALANINA	CITRATO	UREA	SIM
A/A -	-	+	+	- - -

Tabla3: perfil bioquímico de identificación

Catalasa positiva, oxidasa negativa

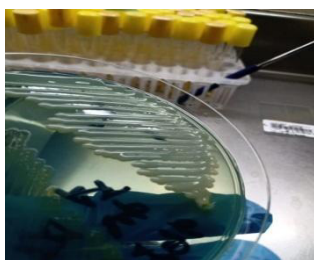


Figura 6: Crecimiento de *K. pneumoniae* en agar CLED, Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023)



Figura 7: Perfil bioquímico presentado por *K. pneumoniae*, Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023). Las pruebas mostradas de izquierda a derecha son: TSI, Fenilalanina, Citrato, Urea, SIM.

Sensibilidad a antibióticos β -lactámicos de *K. pneumoniae* obtenidas en muestras de urocultivo.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron en dos etapas. La inicial donde se ensayaron las siguientes drogas: amoxicilina/ác. clavulánico, cefazolina, cefotaxima, ceftazidima y cefepime. Aquellos aislamientos que fueron resistentes a algunas de estos antibióticos se les realizó un segundo antibiograma para la búsqueda carbapenemasas, donde se evaluó: aztreonam, ceftaxina, ceftazidima/avibactam, imipenem, meropenem y ertapenem, piperacilina/tazobactam, EDTA y ac. borónico. En la siguiente tabla (tabla 4) se resumen las interpretaciones de los aislamientos frente a las drogas ensayadas en la primera etapa. Como se puede observar hay 3 aislamientos, cepa 6, cepa 7 y cepa 8, presentaron resistencia a los β -lactámicos, y por lo tanto se les realizó el segundo antibiograma con la colocación estratégica de discos obteniéndose los resultados detallados en la tabla 5.

ATB β -lactámico	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8
Amoxicilina/ac. clavulánico	19 S	19 S	21 S	23 S	20 S	18 S	6 R	6 R
Cefazolina	26 S	24 S	23 S	23 S	24 S	6 R	6 R	6 R
Cefotaxima	26 S	30 S	28 S	26 S	27 S	6 R	6 R	6 R
Ceftazidima	23 S	25 S	24 S	22 S	24 S	6 R	6 R	6 R
Cefepime	16 S	26 S	27 S	26 S	28 S	6 R	6 R	6 R

Tabla 4: perfil de sensibilidad obtenido en la primera etapa; S= categoría sensible; R=categoría resistente

ATB β -lactámico	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8
Ceftazidima/avibactam	23 (S)	21 (S)	6 (R)
Imipenem	25 (S)	14 (R)	6 (R)
Meropenem	24 (S)	12 (R)	6 (R)
Ertapenem	23(S)	6(R)	6 (R)
Aztreonam	-	6 (R)	6 (R)
Cefoxitina	19 (S)	6 (R)	6(R)
Detección de BLEE / Carbapenemasa	BLEE	KPC	BLEE + MCP

Tabla 5: perfil de sensibilidad obtenido en la segunda etapa; S= categoría sensible; R=categoría resistente. – No evaluado

La cepa 6 mostro una deformación del halo inhibitorio de los discos con cefotaxima (CTX) y ceftazidima (KZ) en las cercanías con el disco con amoxicilina/ác. clavulánico (AUG), sensibilidad frente al disco de imipenem (halo mayor a 22mm) y frente al disco de cefoxitina (>18 mm) por lo tanto se interpretó que ese aislamiento era productor de una enzima tipo BLEE (Figura 8).



Figura 8: Imagen de cepa 6 “Presencia de enzima BLLE, Hospital General de agudos Evita Pueblo 2023. CTX (cefotaxima) – AUG (amoxicilina/ac clavulánico) – KZ (ceftazidima) – CN (cefalexina)

Para las cepas 7 y 8 en el antibiograma con colocación estratégica de discos para la detección de carbapenemasas se observó: en la cepa 7 una deformación del halo inhibitorio en las cercanías del disco con ác. borónico y los correspondientes imipenem y ertapenem que fue interpretado como portadora de una carbapenemasa del tipo KPC. La cepa 8 mostro una sinergia entre el halo en torno del disco con EDTA y los correspondiente imipenem y meropenem que fue interpretado como presencia de una MCP, la sinergia positiva a la combinación ceftazidima/avibactam - aztreonam se interpreto como que la cepa también era poseedora de una enzima BLEE (Figura 9).

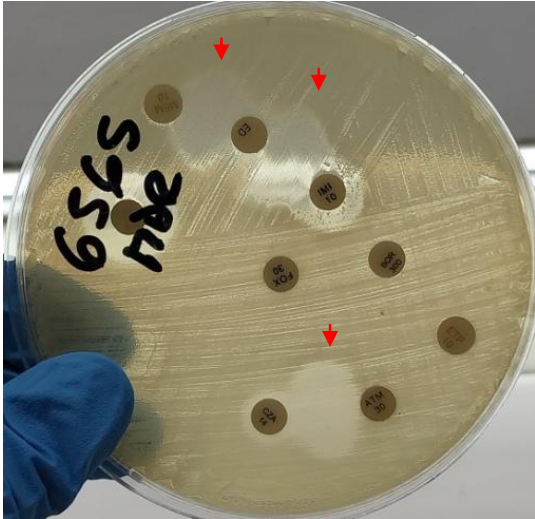


Figura 9: Antibiograma estratégico de la cepa 8. Las sinergias que evidencian la presencia de una MBL+ BLEE se resaltan con flecha roja. MEM (meropenem)- ED (EDTA) –IMI (imipenem) – BOR (ac. borónico) – ETP (ertapenem). ATM (aztreonam) – CZA (ceftazidima/avibactam). Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023)

2-Aislamientos recuperados en muestras de Hemocultivos.

Durante el periodo Enero-Mayo 2023 fueron remitidos al laboratorio de Microbiología del Hospital General de Agudos Evita Pueblo 140 muestras de hemocultivo y 34 muestras de retrocultivo, obteniéndose en 86 (61%) muestras de hemocultivos y en 18 (53%) muestras de retrocultivo crecimiento microbiano. Los retrocultivos fueron obtenidos de los mismos pacientes a los cuales se les tomaron muestras de hemocultivo obteniéndose el mismo desarrollo microbiano por lo tanto solo se analizó, para este estudio, las muestras de hemocultivo. De las 86 muestras marcadas como positivas por el equipo automatizado BactAlert se identificaron por microscopia con tinción de Gram la presencia de 27 (31%) cepas de bacilos gram – negativos y 59 (69%) cepas de cocos gram - positivos. Luego mediante el sistema Vitek®2 se analizaron los 27 bacilos gram – negativos, de los cuales 9 fueron compatibles con el género *Klebsiella*, 7 cepas se identificaron como *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* y 2 como *Klebsiella pneumoniae* spp *ozaenae*.

Sensibilidad a los antibióticos de las cepas del género *Klebsiella* obtenidas de hemocultivo

Los resultados arrojados por el sistema AES (*Advanced Expert System*) se detallan en la tabla 6 donde se agrupan en la misma columna aquellas cepas con iguales sensibilidades

ATB β -lactámico	Cantidad cepas:1		Cantidad cepas:1		Cantidad cepas:6		Cantidad cepas:1	
	CIM(ug/ml)	Int	CIM(ug/ml)	Int	CIM(ug/ml)	Int	CIM(ug/ml)	Int
Ampicilina/sulbactam	4	S	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R
Piperacilina/tazobactam	≤ 4	S	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R
Cefotaxima	≤ 0.25	S	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
Ceftazidima	≤ 0.12	S	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
Ceftazidima/avibactam	≤ 0.12	S	4	S	≥ 16	R	≥ 16	R
Ceftolozano/tazobactam	≤ 0.25	S	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R
Cefepime	≤ 0.12	S	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R
Imipenem	≤ 0.25	S	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R
Meropenem	≤ 0.5	S	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R
BLEE	NEG		NEG		POS		NEG	
Carbapenemasa	NEG		KPC		MCP		KPC + MCP	

Tabla 6: perfiles de sensibilidad detectados por el sistema automatizado Vitek®2; CIM= concentración inhibitoria mínima; Int=interpretación: S=sensible R=resistente

De los datos obtenidos se pudo observar que 8 de las 9 cepas aisladas tuvieron valores de CIM ≥ 16 ug/ml para los antibióticos imipenem y meropenem a las cuales se les realizo antibiograma con colocación estratégica de discos para la confirmación de una posible carbapenemasa obteniéndose los siguientes resultados:

Seis cepas mostraron sinergia entre el halo de imipenem y meropenem con el disco de EDTA, además de sinergia positiva a la combinación Ceftazidima/Avibactam – Aztreonam, lo que fue interpretado como una MCP + BLEE (Figura 10).

En otra de las ocho cepas sospechosa de producir carbapenemasa se utilizó el equipo Vitek®2 con la tarjeta AstN368/369, disponible en ese momento, que incluye otros antibióticos y que permitió evaluar la CIM al aztreonam y al doripenem los cuales dieron CIM ≥ 64 ug/ml (categoría Resistente) y CIM ≥ 8 ug/ml (categoría Resistente), respectivamente. Dicho resultado fue analizado junto con el antibiograma por difusión con colocación estratégica de discos en el cual se pudo observar una sinergia entre el halo inhibitorio de los carbapenemes en torno al disco de EDTA y en torno del disco de ác. borónico, estos resultados fueron interpretados como una cepa productora de doble carbapenemasa KPC + MCP (Figura 11).

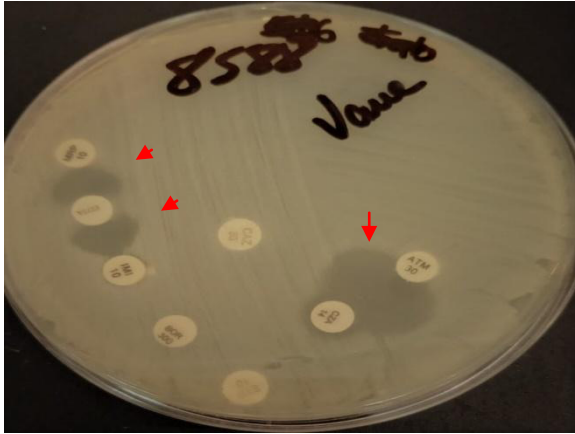


Figura 10: Antibiograma estratégico de cepa con sinergia entre carbapenems y EDTA, y sinergia positiva ceftazidima/avibactam –aztreonam. Las sinergias se resaltan con flecha roja. MEM (meropenem)- ED (EDTA) –IMI (imipenem) – BOR (ac. borónico) – ETP (ertapenem) -ATM (aztreonam) – CZA (ceftazidima/avibactam). Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023)



Figura 11: Antibiograma estratégico de cepa productora de doble carbapenemasa (KPC+MBL). Las sinergias se resaltan con flecha roja. Hospital General de Agudos Evita Pueblo 2023. MEM (meropenem)- ED (EDTA) –IMI (imipenem) – BOR (ac. borónico) – ETP (ertapenem)

Otra de las cepas mostro sinergia positiva con el ác. borónico que fue interpretado como presencia de carbapenemasa tipo KPC, la cual fue también confirmada utilizando el método rápido de Inmunocromatografía en placa, a modo de evaluar la importancia de este método rápido de identificación para pacientes críticos (Figura 12).



Figura 12: Inmunocromatografía en placa para detección de carbapenemasas KPC, OXA-48 y OXA-163, Hospital General de Agudos Evita Pueblo 2023. C, control positivo del ensayo.

3-Aislamientos recuperados en muestras de secreciones respiratorias bajas.

En el periodo Enero a Mayo de 2023 fueron remitidos al laboratorio de Microbiología del hospital General de Agudos Evita Pueblo 77 muestras de secreciones respiratorias bajas provenientes de la sala de Terapia Intensiva de adultos (UTI). En 69 (90%) de ellas se obtuvo crecimiento microbiano, en 64 muestras se pudieron identificar bacilos gram-negativos y en 5 cocos gram-positivos. La identificación y la sensibilidad bacteriana se realizó por el sistema automatizado Vitek®2 obteniéndose del total de muestras analizadas 15 cepas (22%) compatibles con el género *Klebsiella*, 13 *K. pneumoniae* ssp *pneumoniae* y 2 *K. pneumoniae* ssp *ozaenae*. Los perfiles de sensibilidades a los β-lactámicos arrojados por el equipo automatizado Vitek®2 se detallan en la tabla 7 a continuación en la cual se agrupan en la misma columna aquellas cepas con el mismo perfil obtenido.

ATB β-lactámico	Cantidad de cepas:9		Cantidad de cepas: 1		Cantidad de cepas:5	
	CIM(ug/ml)	Int	CIM(ug/ml)	Int	CIM(ug/ml)	Int
Ampicilina/sulbactam	4	S	≥32	R	≥32	R
Piperacilina/tazobactam	≤4	S	≥128	R	≥128	R
Cefotaxima	≤0.25	S	≥64	R	≥64	R
Ceftazidima	≤0.12	S	≥64	R	≥64	R
Ceftazidima/avibactam	≤0.12	S	≥16	R	≥16	R
Ceftolozano/tazobactam	≤0.25	S	≥32	R	≥32	R
Cefepime	≤0.12	S	≥16	R	≥16	R
Imipenem	≤0.25	S	≥16	R	≥16	R
Meropenem	≤0.5	S	≥16	R	≥16	R
BLEE	NEG		NEG		POS	
Carbapenemasa	NEG		MCP + KPC		MCP	

Tabla 7: perfiles de sensibilidad detectados por el sistema automatizado Vitek®2; CIM= concentración inhibitoria mínima; Int=interpretación: S=sensible R=resistente

De los resultados arrojados por el sistema automatizado Vitek®2 se pudo interpretar que 9 cepas fueron sensibles a los β-lactámicos y que 6 cepas mostraron perfiles de resistencia a los carbapenemes (CIM ≥ 16 ug/ml) a las cuales se les realizó un antibiograma por difusión con colocación estratégica de disco obteniéndose los siguientes resultados:

Cinco cepas mostraron un aumento del halo inhibitorio en cercanías del disco con EDTA, y sinergia positiva a los discos de ceftazidima/avibactam –aztreonam lo que llevo a la conclusión de que dichas cepas presentaron una MCP + BLEE (Figura 13).

Una cepa mostro aumento del halo en las cercanías del disco de ac. borónico y en las cercanías del disco con EDTA, resistencia al antibiótico aztreonam y a ceftazidima/avibactam que fue interpretado como cepa productora de doble carbapenemasa (KPC+MCP).



Imagen 13: Sinergia positiva a discos de ceftazidima/avibactam – aztreonam, resaltada con flecha roja. Hospital General de Agudos Evita Pueblo 2023. CZA (Ceftazidima/Avibactam) – ATM (Aztreonam)

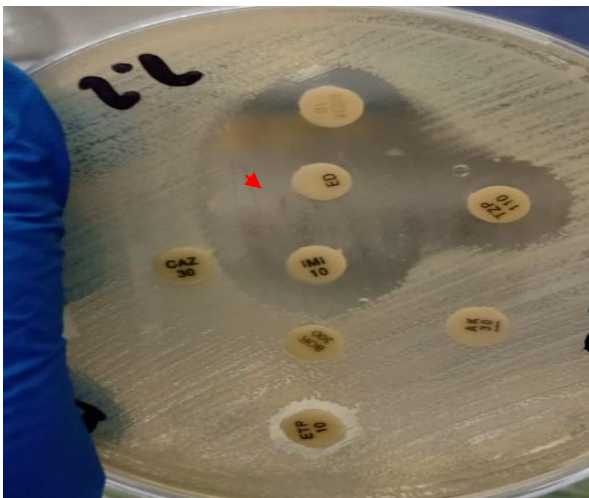


Imagen 14: cepa productora de MCP, se resalta la sinergia con flecha roja. Hospital General de Agudos Evita Pueblo (2023)

CONCLUSION

Los carbapenemes son antibióticos ampliamente utilizados en los tratamientos clínicos frente a infecciones graves causadas por bacilos gram – negativos. Su uso inadecuado incrementa la selección microorganismos resistentes a este grupo de drogas. Identificar fenotípicamente carbapenemasas implica todo un desafío para el servicio de microbiología ya que su espectro de acción no es homogéneo, pudiendo estar sujeto a múltiples variables que incluyen tanto el patógeno portador como la frecuente combinación de otros mecanismos de resistencia. La detección de mecanismos de resistencia en forma oportuna permitiría realizar un uso adecuado de los antimicrobianos, así como, poder implementar medidas sanitarias tendientes a evitar la diseminación de gérmenes multidrogorresistente.

En el presente estudio se determinó que de los 135 aislados bacterianos que correspondieron a bacilos gram - negativos, 32 cepas (23,7%) fueron identificadas dentro del género *Klebsiella*, y a su vez 16 de las cuales (50%) presentaron carbapenemasas. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de realizar la interpretación del antibiograma y la búsqueda exhaustiva de los mecanismos de resistencia bacteriana a fin de orientar al personal médico para tomar la mejor conducta terapéutica para el tratamiento del paciente. Cabe destacar también que el monitoreo de los perfiles asociados a los mecanismos de resistencia permitió detectar aislamientos bacterianos con la presencia de una combinación de carbapenemasas (MCP+KPC), hecho alarmante que pone de manifiesto la necesidad de que cada institución cuente con un sistema de vigilancia epidemiología como una herramienta para poder identificar comportamientos microbianos, que permitan implementar consensos cuya finalidad sea poder establecer nuevas estrategias farmacológicas que permitan resolver la problemática de la resistencia bacteriana y la escases de opciones terapéuticas.

ANEXO

ANEXO 1

BIOMÉRIEUX

REF 21341
VITEK® 2 GN

044066-04 - 2020-03

IVD

Uso previsto

Estas instrucciones de uso corresponden a la versión del software 7.01 o superiores de VITEK® 2 System. Si no está utilizando la versión 7.01 o una superior del software de VITEK® 2 System 7.01, consulte la información sobre el producto de VITEK® 2 System que recibió junto con su versión de software actual.

La tarjeta de identificación de Gram negativos (GN) VITEK® 2 está diseñada para su uso con VITEK® 2 System para la identificación automática de los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores clínicamente más significativos. La tarjeta de identificación GN VITEK® 2 es un producto desechable de un solo uso. Para obtener una lista de las especies determinadas, consulte la sección Organismos identificados.

Descripción

La tarjeta GN se basa en métodos bioquímicos establecidos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) y sus datos automáticamente decodificados para medir la utilización de la fuente de carbono. Los acridatos enzimáticos y la resistencia. El ítem 47 (prueba de oxígeno) y un punto de control negativo. El punto Control negativo de descarboxilasa (22) se usa como referencia local para los puntos de análisis de descarboxilasa. Los diferentes resultados pueden ser interpretados como:

Para obtener una lista del contenido de los pozos, véase Contenido de los pozos de la tarjeta GN.

Tabla 1. Contenido de los pozos de la tarjeta GN

Pozo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/Pozo
2	Acid-Fermentación/AMIDASA	APFN	0,0324 mg
3	ADONITOL	ADN	0,1875 mg
4	L-Phenilalanil-AMIDASA	PpA	0,018 mg
5	L-ARABITOL	ARL	0,3 mg
7	D-CELULOSA	CCFL	0,3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASA	BGAL	0,026 mg
10	FERMENTACIÓN DE H2S	H2S	0,024 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA	BNAG	0,0408 mg
12	Glucosil Arabinosa pH	AGLpH	0,0324 mg
13	D-GLUCOSA	BGLU	0,3 mg
14	GAMMA-GLUTAMIL-TRANSFERASA	GGIT	0,0228 mg
15	FERMENTACIÓN/GLUCOSA	DFF	0,45 mg
17	BETA-GLUCOSIDA	BGLU	0,036 mg
18	D-MALTOSA	DMAL	0,3 mg
19	D-MANITOL	DMAN	0,1875 mg
20	D-MANOSA	DMNE	0,3 mg
21	BETA-XILOSIDASA	BXYL	0,0324 mg
22	BETA-Alanina arilamidasa pH	BAlap	0,0174 mg

BioMérieux - Español - 1

VITEK® 2 GN

044066-04 - es - 2020-03

Pozo	Análisis	Abreviatura	Cantidad/Pozo
23	L-Prósia ARILAMIDASA	PpA	0,0234 mg
26	LIPASA	LP	0,0192 mg
27	POLITROSA	PLT	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASA	TpA	0,0276 mg
31	UREASA	URE	0,15 mg
32	D-GICRITOL	DSOR	0,1875 mg
33	SACAROSA	SAC	0,3 mg
34	D-TAGATOSA	DTAG	0,3 mg
35	D-TRALOSA	DTRE	0,3 mg
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0,054 mg
37	MALDATO	MNT	0,15 mg
39	SACRO-D-GLUCONATO	SGL	0,3 mg
40	Abstracción de L-LACTATO	BLA	0,15 mg
41	ALFA-GLUCOSIDASA	AGLU	0,036 mg
42	Abstracción de SUCRATO	SUCF	0,15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASA	NAGA	0,0208 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASA	AGAL	0,036 mg
45	FOSFATASA	PFAS	0,0504 mg
46	Oxina ARILAMIDASA	OxP	0,012 mg
47	OPORTUNA DE CARBOHIDRATO	ODC	0,3 mg
48	LISINA DE CARBOHIDRATO	LOC	0,15 mg
52	BASE DE CARBOHIDRATO	BOEC	NIC
53	Acetilación de L-HISTIDINA	PHSA	0,067 mg
54	CUMARATO	CUF	0,126 mg
57	BETA-GLUCURONIDASA	BGLUR	0,0378 mg
58	RESISTENCIA OF29 (comp. vitro.)	OF29R	0,0108 mg
59	Oni-Clp-Ary-ARILAMIDASA	OGAA	0,0076 mg
61	Acetilación de L-SALATO	RLS	0,042 mg
62	ELIMAN	ELIM	0,03 mg
64	Acetilación de L-LACTATO	LALA	0,186 mg

Nota: Los pozos con los números entre 1 y 64 no designados en esta tabla están vacíos.

Precauciones

Nota: Los clientes de industria que necesitan ayuda en la selección de la tarjeta de identificación VITEK® 2 correcta pueden consultar el capítulo "Guía para seleccionar una tarjeta de identificación VITEK® 2" en el Manual del usuario del instrumento VITEK® 2 Compact.

- Únicamente para diagnóstico in vitro.
- Para Estados Unidos únicamente. Precaución: la Ley Federal de EE. UU. limita la venta de este dispositivo por un médico diplomado o bajo prescripción de un médico diplomado.
- Exclusivamente para uso profesional.
- Las temperaturas que no se encuentren dentro del rango correspondiente en el DENSICHEK® Plus de VITEK® 2 o el DENSICHEK® de VITEK® 2 pueden afectar al rendimiento de la tarjeta.

BioMérieux - Español - 2

ANEXO 2

REF 424055

BIOMÉRIEUX

VITEK® 2 AST-N421

057643-01 - es - 2020-12

IVD

USO PREVISTO

La tarjeta de sensibilidad de gram negativos VITEK® 2 ha sido diseñada para su uso con VITEK® 2 System en laboratorios clínicos como test *in vitro* para determinar la sensibilidad de bacterias aerobias gram negativas clínicamente significativas a agentes antimicrobianos cuando se obtienen según los ensayos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El test de sensibilidad está indicado para cualquier organismo que esté replicado en un proceso infeccioso que justifique el uso de terapia antimicrobiana. Los tests de sensibilidad están indicados principalmente en los casos en que los datos de un organismo causante pertenecen a una especie que presenta resistencia a los antimicrobianos utilizados habitualmente. En los casos de organismos con posible acción patógena en sustratos de una placa de agar y se analiza su sensibilidad de difusión puede indicar al médico la concentración necesaria de un antimicrobiano para lograr el organismo inofensivo en el lugar de la infección.

Tradicionalmente, los CMi se han determinado mediante diluciones seriadas al 1/2 de antimicrobianos en distintos volúmenes del sustrato. Entretanto se puede lograr un sistema de interpretación con facilidad, entendiendo el resultado a los resultados de CMi para facilitar la interpretación terapéutica.

Para algunos antimicrobianos (por ejemplo gentamicina de alto nivel, estreptomicina de alto nivel), se genera un resultado cualitativo.

Los procedimientos estándar de referencia se basan en tests de sensibilidad que requieren entre 16 y 24 horas de incubación para bacterias. Varios factores ya han demostrado procedimientos automatizados que producen resultados en menor tiempo mediante la utilización de tiempos de incubación más breves. Para obtener los CMi de organismos infecciosos, los laboratorios de todo el mundo siguen variando del procedimiento de referencia estándar a lo largo de un producto disponible en el mercado.

AES (Advanced Expert System)

El AES (Advanced Expert System) es una herramienta de software que facilita información sobre el análisis clínico. El AES determina el nivel de coherencia de los resultados de ACT y alerta al usuario de los resultados inusuales. El AES propone terapias en casos de resultados de sensibilidad anómalos, y explica correcciones terapéuticas (CT) en función de los límites propuestos y del rango de parámetros de AES indicados.

Como el AES propone un resultado en función de cada clase de antimicrobianos analizados, los resultados varían en función de la configuración de la tarjeta. Hay que señalar que una propuesta de terapia por parte del AES no es una consulta definitiva de la presencia de un mecanismo de resistencia concreto. Los usuarios son responsables de los resultados que emita su laboratorio. Pueden obtener ciertos formularios para resultados (consulte el Manual del usuario del software VITEK® 2 System). El AES puede facilitar información sobre el análisis automatizado, pero sólo en inglés que el laboratorio formado no tenga que revisar los resultados.

BiMérieux revisa los cambios en la base de conocimientos (KB) del AES. Con cada actualización de la KB del AES realiza una validación biológica. Como los parámetros de los tests de AES pueden variar en función de la configuración de cuando cambia la configuración de una tarjeta nueva, siguiendo sus procedimientos internos. Esta revisión garantizará que el AES funcione los resultados previstos para las tarjetas, a permitiendo que el usuario efectúe modificaciones en la configuración de revisiones del AES si lo estima necesario.

Resistencia de especies enterobacterias (ESBL)

Las ESBL son enzimas generadas por mutaciones en los genes de betalactamasas comunes mediadas por plásmidos. Las cepas aisladas de Klebsiella spp. y E. coli productoras de ESBL pueden ser clínicamente resistentes a tratamiento con penicilinas, cefalosporinas y aminopenicilinas, a pesar de la sensibilidad *in vitro* aparente a algunos de los agentes mencionados. Algunas de estas cepas resisten CMi por encima de la población sensible normal, pero por debajo de los puntos de corte.

VITEK® 2 AST-N421

057643-01 - es - 2020-12

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La tarjeta AST para VITEK® 2 System representa una metodología de prueba automatizada basada en la técnica de la concentración mínima inhibidora (CMI) descrita por MacLeroy y March y Gedach.^{1,2} La tarjeta AST es básicamente una versión automatizada y optimizada de la técnica de dilución doble para los CMi determinados mediante el método de microdifusión.¹

Cada tarjeta AST contiene un pozo de control, que contiene solo medio de cultivo microbiológico. Los posibles resultados contienen concentraciones previas de los antimicrobianos específicos combinados con el medio de cultivo.

Es preciso que la suspensión con el organismo está diluida a una concentración normalizada en solución salina al 0,45% antes de utilizar para sembrar el medio con antimicrobianos de la tarjeta. A continuación, la tarjeta se incuba, se sella y manualmente (como ocurre con VITEK® 2 Compact) dicho instrumento controla el crecimiento de cada pozo de la tarjeta durante un período de tiempo determinado (hasta 18 horas para gram negativos). Al final del ciclo de incubación, para determinar un resultado positivo o negativo.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Al recibir las tarjetas AST VITEK® 2, almacenarlas en su envase original a una temperatura entre 2 y 8 °C.

PRECAUCIONES

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Para Estados Unidos únicamente. Precaución: la Ley Federal de E.E.U.U. limita la venta de este dispositivo por un medio diferente a la prescripción de un médico diplomado.
- Exclusivamente para uso profesional.
- Los instrumentos que se encuentran fuera de los rangos correspondientes en el VITEK® 2 DENSICHECK™, el VITEK® 2 DENSICHECK™ Plus o el VITEK® 2 DENSICHECK™ pueden afectar al funcionamiento de la tarjeta.
- Puede ser que la sensibilidad y la eficacia de los antimicrobianos, de los que se haya analizado la sensibilidad frente a enterobacterias mediante este E. coli/AES, se haya establecido o no en ensayos clínicos bien controlados para el tipo de infección clínica del paciente y la presencia de microorganismos que no figuren en las indicaciones y el uso en la tarjeta para los antimicrobianos de referencia incluye los usos para los que está aprobado el antimicrobiano.
- No use la tarjeta después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- Almacene la tarjeta sin abrir en su envase. No use la tarjeta si el envase protector está dañado o si carece de desecante.
- Preavise que la tarjeta requiere una temperatura ambiente antes de abrir el envase.
- No utilice puntas con látex, ya que éste puede afectar al funcionamiento del sistema óptico.
- El uso de medios de cultivo diferentes de los tubos recomendados debe ser validado por el laboratorio del cliente para determinar si se logra un rendimiento aceptable.
- La tarjeta sólo presenta el resultado previsto cuando se utiliza con VITEK® 2 System, siguiendo las instrucciones incluidas en las instrucciones de uso.
- Es muy recomendable que también se sigan las buenas prácticas de laboratorio (por ejemplo, FDA, CLS, ISO, etc.), según los directivos o las regulaciones locales.
- No use tubos de ensayo de vidrio. Utilice exclusivamente tubos de ensayo de plástico (polipropileno). Existen variaciones entre el diámetro real de los tubos de ensayo. Coloque cuidadosamente el tubo en el soporte. Si se observa resistencia, deséchelo y grábalo con otro tubo que se introduzca sin que haya que ejercer presión.
- Antes de la incubación, examine los tubos para detectar roturas o daños en la tapa. Deserre las tarjetas de estado. Verifique los niveles de solución salina en los tubos después de haberse propuesto el código para asegurar el correcto control de la tarjeta.
- VITEK® 2 60 o VITEK® 2 XL: Equivoce las tarjetas Readme incorrectamente.
- VITEK® 2 Compact: No cargue las tarjetas Readme incorrectamente.

BiMérieux - Español - 1

BiMérieux - Español - 2

VITEK® 2 AST-N421

057643-01 - es - 2020-12

• Debe prestar especial atención al origen de la muestra y al tipo de terapia del paciente. Las tarjetas AST pueden contener algunos antimicrobianos que no han demostrado ser eficaces para el tratamiento de infecciones debido a todas las organizaciones que pueden ser analizadas. A fin de interpretar y comunicar los resultados de antimicrobianos que se ha determinado que son activos contra grupos de organismos tanto *in vitro* como en infecciones clínicas, consulte la etiqueta de la especificidad farmacológica antimicrobiana individual o las directrices terapéuticas locales.

• La interpretación de los resultados de los tests debe realizarse un facultativo cualificado que sepa interpretar el resultado de los análisis de AST. Es posible que se requieran análisis adicionales.^{1,2}

Advertencia: Todas las cultivos microbianos, muestras de pacientes y tarjetas VITEK® 2 inoculadas, junto con las materias relacionadas, son potencialmente infecciosas y deben tratarse siguiendo las precauciones generales.^{1,2}

REACTIVOS

Utilizada con los instrumentos VITEK® 2, la tarjeta AST resulta un sistema complejo de análisis de sensibilidad. Cada tarjeta AST contiene determinados antimicrobianos en distintas concentraciones y en forma deshidratada junto con un medio de cultivo microbiológico.

Título 1: Contenido de la tarjeta

Antimicrobiano	Código	Concentración §	Intervalo de Interpretación §	Intervalo de Interpretación §	Indicaciones de uso de la FDA
Amikacina	amk01	2, 4, 16, 48	1	64	Pneumonia spp., E. coli, P. mirabilis, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Serratia spp., Acinetobacter spp. (incluido el complejo A. baumannii), C. freundii
Ampicilina/Sulbactam	amp01n	42, 168, 32/16	01	32/16	CGAZCAB
Cefepime	cef03n	0,25, 1, 4, 16, 32	0,12	32	Enterobacter spp., E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, C. Issatz, C. freundii, P. agglomerans, K. oxytoca, P. vulgaris, P. stuartii, S. marcescens
Cefotaxima	cef01n	0,5, 2, 4, 8, 32	0,25	64	Acinetobacter spp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp., Serratia spp., Acinetobacter spp. (incluido K. pneumoniae), M. morgani, P. mirabilis, P. vulgaris, P. stuartii, S. marcescens, Providencia spp., Salmonella spp. (incluido S. typhi)
Carbapenem	car01n	0,25, 1, 2, 8, 32	0,12	64	**ND

BiMérieux - Español - 3

VITEK® 2 AST-N421

057643-01 - es - 2020-12

Antimicrobiano	Código	Concentración §	Intervalo de Interpretación §	Intervalo de Interpretación §	Indicaciones de uso de la FDA
Carbapenem/Amikacina	car02n	0,064, 0,254, 14, 44, 84	0,12	16	C. freundii, E. cloacae, E. coli, K. oxytoca, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, C. Issatz, E. aerogenes, M. morgani, P. stuartii, S. marcescens
Carbapenem/Tazobactam	car01n	0,54, 14, 44, 84, 324	0,25	32	E. cloacae, E. coli, K. oxytoca, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa, C. freundii, C. Issatz, E. aerogenes, P. vulgaris, P. stuartii, S. marcescens
Ciprofloxacino	cip01n	0,06, 0,12, 0,5, 1	0,06	4	C. freundii, C. Issatz, E. cloacae, E. coli, K. pneumoniae, M. morgani, P. mirabilis, P. vulgaris, P. stuartii, P. aeruginosa, Salmonella typhi, S. marcescens, S. enteritidis, E. aerogenes, K. oxytoca, Salmonella enteritidis
ESBL	esb01n	PEP 1, CTX 0,5, CAZ 0,5, FEPIC 1/10, CTACA 0,5/4, CAZCA 0,5/4	NEG	POS	E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca
Gentamicina	gen01n	4, 8, 32	1	16	Citrobacter spp., Enterobacter spp., E. coli, Klebsiella spp., Proteus spp., Serratia spp., P. aeruginosa, Acinetobacter spp., Citrobacter spp., E. cloacae, Comamonas, Enterobacter cloacae, E. coli, Klebsiella spp., P. aeruginosa

BiMérieux - Español - 4

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Rosete-Enríquez, M., Quintero-Hernández, V., Morales-García, Y. E., Rodríguez-Andrade, O., & Rivera-Urbalejo, A. P. (2019). La personalidad multifacética del género *Klebsiella*: El bueno, el malo y el feo.
- 2- Galas, M. F., & WHONET, R. (2013). Grupo Kes.
- 3-Arenas, N. E., Julián, A., Salazar, L. M., Polanco, J. C., & Gómez, A. (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2), 22-29.
- 4-Araque, M., Varela, Y. Y., & Labrador, I. (2019). Fenotipo hiper mucoviscoso de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta: Lo nuevo de un viejo enemigo. *Avances en Biomedicina*, 8(1), 21-29.
- 5- Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilms formation. *BMC microbiology*, 10, 1-10.
- 6- Izquierdo Lázaro, L. (2003). *Biosíntesis del lipopolisacárido de " Klebsiella Pneumoniae"*. Universitat de Barcelona.
- 7-Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 77-104.
- 8-Esper, R. C., Bustos, M. Z., Alcántara, H. Á., Córdova, D. M. C., & Córdova, C. A. C. (2013). La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 56(3), 5-11.
- 9-Monge, K. M. M. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*, 70(608), 599-605.
- 10-Mairena, B. M. M. M., & Téllez, B. L. S. L. SUB TEMA: *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa KPC.

- 11- Hellinger, W. C., & Brewer, N. S. (1991, October). Imipenem. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 66, No. 10, pp. 1074-1081). Elsevier.
- 12-Morales I., Ricardo. (2003). Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Revista chilena de infectología*, 20(4), 270-276. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003000400008>
- 13-Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antib Restrepo, A. D. D. C. F., & Arias, C. A. A. (2015). Resistencia a los antibióticos beta-lactámicos Carbapenem mediada por el gen blaKPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2), 109-118
- 14-Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M.,... & González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484
- 15- Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., Medina, J., & Savio, E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). *Tendencias en Medicina*, 39, 47-52.
- 16-Codjoe, FS y Donkor, ES (2017). Resistencia a los carbapenémicos: una revisión. *Ciencias Médicas*, 6 (1), 1.
- 17-. *Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud (RIECS)*, 4(2), 84-89.
- Iglesias, J. O. (2019). Comprendiendo la resistencia a antibióticos
- 18-Lirola Andreu, L., Ávila Jiménez, Á. F., Fernández Mariscal, M. A., Reinoso Espín, Á., & Martínez, S. (2022). La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa
- 19-Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R., & Fernández, N. (2013). *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 26 (4), 20-Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 28(6), 375-385.192-196.

21-uba.ar (2016).Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos β -lactámicos y Glicopéptidos [versión pdf].

22-Suárez, C. y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 27 (2), 116-129.

23- CLSI. (2023).CLSI M10 ED33_2023.CLSI.ORG

24-Rapoport Melina, Lucero Celeste, Menocal Alejandra, De Mendieta Juan Manuel, Tuduri Ezequiel, Echegorry Mariano, Pasteran Fernando, Red WHONET-Argentina, Corso Alejandra (2022). *Klebsiella pneumoniae*: PERFIL DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS 2018-2021. PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS, RED WHONET –ARGENTINA. Abstract Nro: 0229. XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI), Buenos Aires, 15-17 septiembre 2022.

25-Diego Faccone, Sonia A. Gómez, Juan Manuel de Mendieta, María Belén Sanz, Mariano Echegorry, Ezequiel Albornoz, Celeste Lucero, Paola Ceriana, Alejandra Menocal, Florencia Martino, Denise De Belder on behalf of the Carbapenemase Working Group, Alejandra Corso and Fernando Pasterán. (2023). Emergence of Hyper-Epidemic Clones of Enterobacterales Clinical Isolates Co-Producing KPC and Metallo-Beta-Lactamases during the COVID-19 Pandemic. Pathogens. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030479>

26-Fernando Pasteran, Mariano Echegorry, Laura Olivieri, Diego Faccone, Ezequiel Albornoz, Celeste Lucero, Melina Rapoport, Paola Ceriana, Alejandra Menocal, Juan Manuel De Mendieta, Alejandra Corso. 2023. Multicenter, Prospective Study of Carbapenemase-Producing Enterobacterales (CPE) in the COVID-19 Era in Argentina (RECAPT-AR). Abstract Nro: 00385. 33rd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Copenhagen, Dinamarca, 15-18 abril de 2023.

27-Barcelona L, Marin M, Stamboulian D. (2008). Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas Amoxicilina-sulbactam. Medicina (B.Aires), 68(1), 0025,07680. www.scielo.or.ar



BASTOZZA
VANESA
DNE 24206771

