



## PROTOCOLO PARA DETECCION DE KPC EN ENTEROBACTERIAS

Fuente:

Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI ANLIS  
"Dr. Carlos G. Malbrán"

### 1. ANTECEDENTES

Las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas pertenecientes al grupo KPC están emergiendo como un importante desafío en los establecimientos de salud, tanto como para su detección en el laboratorio como para el tratamiento del paciente por su resistencia a casi todos los antibióticos disponibles. Las implicaciones clínicas son relevantes, porque en los pacientes infectados por estas cepas productoras de carbapenemasas, se observan fallos clínicos y microbiológicos frecuentes. La letalidad por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas oscila entre el 47 y el 68%, según diversos estudios.

La familia de  $\beta$ - lactamasas tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) incluye en la actualidad 10 miembros (variantes alélicas). Esta familia de enzimas ha sido reconocida como la más extrema de las carbapenemasas descritas ya que posee capacidad hidrolítica en penicilinas, cefalosporinas, monobactams, y carbapenems así como sobre cefamicinas (cefoxitin) e inhibidores de  $\beta$ lactamasa (sulbactam, tazobactam, clavulánico). Las enzimas de la familia KPC pertenecen a la clase molecular A de Ambler y fueron recientemente reclasificadas como pertenecientes al grupo funcional 2f según K. Bush.

La primera descripción de este grupo de enzimas (KPC-1, hoy renombrada como KPC-2) se comunicó en el año 2001. Esta enzima fue detectada en *K. pneumoniae* (de ahí deriva su nombre original) oportunamente recuperada el año 1996 en Carolina del Norte, USA. Durante los últimos años, la rápida diseminación de cepas de *K. pneumoniae* KPC+ ha producido un dramático cambio en el contexto epidemiológico mundial. En la actualidad, KPC ha sido reportada principalmente en *K. pneumoniae*, pero se ha descrito además en diversas especies bacterianas, como *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Acinetobacter spp*, etc. En Argentina, la proporción de cepas productoras de KPC, particularmente *K. pneumoniae*, se ha ido incrementando año tras año con un preocupante aumento durante el primer cuatrimestre del 2010 (incremento del 800%). Cada vez más, reportes demuestran que la presencia de KPC en enterobacterias es un factor independiente de mal pronóstico (mortalidad) y que tiene asociada una mayor proporción de fallas terapéuticas e incremento de costos hospitalarios cuando se comparan con cepas de igual especie bacteriana que no producen KPC.

Ante este problema, el incremento de carbapenemasas en enterobacterias detectado en varios países de la Región y la detección de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en nuestro medio el año pasado, es necesario que los laboratorios realicen esfuerzos en la detección de este mecanismo de resistencia.

## 2. OBJETIVO:

Estandarizar el protocolo de trabajo para la búsqueda de KPC en laboratorios de la red de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en nuestro país.

## 3. DETECCION FENOTIPICA DE KPC:

El algoritmo de trabajo para la búsqueda de KPC (y demás carbapenemasas adquiridas), es el propuesto por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, consensado para la red Latinoamericana de vigilancia de la resistencia antimicrobiana (RELAVRA) el cual está basado fundamentalmente en el efecto inhibitorio del ácido 3-amino-fenilborónico sobre las serin-carbapenemasas del grupo A, y agentes quelantes de Zn sobre metaloenzimas (MBLs).

### 3.1. Sospecha cuando se realiza el antibiograma por el método de disco difusión:

El algoritmo propuesto se basa en un tamizaje inicial para identificar cepas sospechosas de producir carbapenemasas utilizando el tamaño de la zona de inhibición de **imipenem** por el método de disco difusión.

Los hallazgos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” señalaron que las cepas productoras de carbapenemasa corresponden a cepas con halos  $\leq 22$  mm para imipenem de acuerdo a los puntos de corte del CLSI M100 S21-CLSI 2011 basados en una evaluación de los parámetros PK/PD de este grupo de antibióticos. Según las tablas del CLSI 2014 los puntos de corte son los siguientes:

M 100 S24 CLSI 2014	Difusión (mm)				CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
Imipenem	$\geq 23$		20-22	$\leq 19$	$\leq 1$		2	$\geq 4$
Meropenem								
Ertapenem	$\geq 22$		19-21	$\leq 18$	$\leq 0.5$		1	$\geq 2$

Por lo tanto **considerar como sospechosas de carbapenemasas todas las cepas con halo a carbapenems dentro de la categoría de “no sensible” (intermedio o resistente), con algunas excepciones que se describen mas adelante.**

**3.2. Otros métodos diferentes a disco difusión:** En el INEI INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” realizaron estudios para evaluar la capacidad de detección de carbapenemasas de metodologías de amplia difusión en Argentina como métodos automatizados (Phoenix, Vitek 2C), métodos de tiras con gradiente de antibióticos (MICE) y el método de referencia de CIM por dilución en agar.

Basados en estos estudios, estandarizaron estrategias metodológicas que permitieron optimizar cada método para la detección de enzimas tipo KPC y demás

carbapenemasas adquiridas los cuales resultan en un desempeño equivalente para su búsqueda. El algoritmo de trabajo se encuentra en el diagrama de la página 7.

Los indicadores de mejor sensibilidad y especificidad para el tamizaje inicial de carbapenemasas por estas metodologías son las siguientes:

**3.2.a. Phoenix:** Se debe considerar la especie bacteriana de la cepa ensayada.

- Cepas de *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* (Grupo KES) con IMP  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  deben ser consideradas sospechosas de carbapenemasa y examinadas por métodos más específicos.
- En las demás especies bacterianas (NO Grupo KES) se recomienda utilizar ERT  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  como criterio de tamizaje.

**3.2.b. Vitek 2C:** la mejor identificación de cepas con sospecha de carbapenemasas ocurre independientemente de la especie bacteriana:

- CIM de IMP  $\geq 2.0$   $\mu\text{g/ml}$  y a la vez una CIM de MEM  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ .
- Un aislamiento con CIMs por debajo de los puntos de corte propuestos (CIM de IMP  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  (S) o CIM de MEM  $\leq 0.5$   $\mu\text{g/ml}$ , se podrá excluir la presencia de carbapenemasa.

**3.2.c. AGAR DILUCION, MICE Y E TEST:**

- CIM de IMP  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  deben ser consideradas sospechosas de carbapenemasa y examinadas con métodos más específicos.

**3.3.** Un importante avance en la etapa confirmatoria lo constituye la incorporación de cloxacilina/oxacilina en las pruebas fenotípicas. Este inhibidor específico de AmpC (y no de KPC) permite superar la baja especificidad del APB para detectar KPCs en cepas con altos niveles de AmpC (*Enterobacter*, *Citrobacter*). Aquellas cepas donde el mecanismo implicado en la resistencia a carbapenems fuera la presencia de enzimas AmpC, cursarán con una doble inhibición (inhibidas por APB y CLOXA/OXA). Mientras que las KPCs (inclusive cuando esté presente en una bacteria con hiperproducción de AmpC) y demás enzimas de clase A mostrarán sólo inhibición por APB y no por CLOXA/OXA.

**NOTA:** Estos métodos utilizando APB y cloxacilina no resultan de utilidad para la detección de KPC en *P. aeruginosa*.

*Es importante destacar que en el contexto epidemiológico, es imprescindible que los laboratorios de microbiología realicen de rutina la confirmación para carbapenemasas indicada en el algoritmo (sinergias con APB y EDTA/SMA). Tanto la subestimación de este mecanismo como su sobreestimación (falta de realización de pruebas confirmatorias) redundan en una mala toma de decisiones clínicas y epidemiológicas para los pacientes y la Institución.*

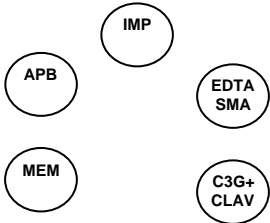
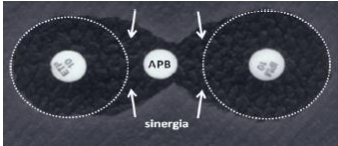
## PROTOCOLO PARA DETECCION DE KPC

Basado en Protocolo de Trabajo del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

### 1: CONSIDERAR EL HALO DE INHIBICION DE IMIPENEM PARA SOSPECHAR PRESENCIA DE CARBAPENEMASAS:

GRUPO BACTERIANO	HALO DE INHIBICION SOSPECHOSO	INFORME CLINICO
Enterobacterias a excepción de <i>Salmonella</i> , <i>Proteus spp</i> , <i>Providencia spp</i> , <i>Morganella morganii</i>	IMP ≤ 22 mm	El informe clínico de los carbapenems en el caso de descartar carbapenemasas (por puntos de corte, en este caso) será según el fenotipo, es decir como da en el antibiograma (S, I, R)
<i>Proteus spp</i> , <i>Providencia spp</i> , <i>Morganella morganii</i>	IMP ≤ 22 mm + MEM ≤ 27 mm,	
<i>Salmonella spp</i>	IMP ≤ 24 mm	

### 2.- REALIZAR SINERGIAS:

DISPOSICION DE LA COLOCACION DE DISCOS	DISTANCIA ENTRE LOS DISCOS	EJM:
 <p>Sinergia entre discos de Acido fenil borónico (APB, 300 ug/disco) e Imipenem</p> 	<p><b>MEM - APB – IMP:</b> Calcular en base a los diámetros de inhibición obtenidos en el antibiograma primario. según la siguiente fórmula:</p> <p>radio del antibiótico + radio del inhibidor + 5 mm</p> <p>Colocar el disco de APB a una distancia de centro a centro con los carbapenems en base al resultado anterior.</p> <p><b>IMI - EDTA/SMA - C3G+CLAV:</b> Se considera igual que para MEM - APB – IMP (usando la misma fórmula)</p>	<p>Ejm: Una enterobacteria tiene los siguientes halos: IMI= 22 mm (radio 11mm) MER= 18 mm (radio 09mm) APB= Considerar diámetro del disco =06mm (03 mm)</p> <p>Según la fórmula: Para IMP: 11 + 3 + 5 = 19 mm Para MEM: 09 + 3 + 5 = 17 mm</p> <p>Se debe colocar el disco de APB a 19 mm de centro a centro del disco IMP. Colocar el disco de APB a 17 mm de centro a centro del disco MEM</p>

**3.-CORRELACIONAR RESULTADO DE LAS SINERGIAS CON C3G (CTX o CAZ)****Intermedio o Resistente a C3G (a alguna de ellas):**

RESULTADO DE SINERGIAS	TIPO DE CARBAPENEMASA	CRITERIO DE INFORME (en fenotipos puros)	OPCIONES DE TRATAMIENTO (Δ) (requiere demostrar sensibilidad)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Positivo: MEM – APB – IMI</li> <li>- Negativo: IMI - EDTA/SMA – C3G/CLAV</li> <li>- Positivo: C3G y C4G con CLAV (BLEE +)</li> </ul> <p>NOTA: En <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Citrobacter freundii</i> puede dar sinergia positiva con APB por AmpC, inhibir con OXA o CLOXA</p>	<p><b>Carbapenemasas 2f tipo KPC</b></p> <p>(Las carbapenemasas 2f son inhibibles por ácido clavulánico y por ácido borónico)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NO se recomienda CARBAPENEMES</li> <li>- R: C1G, C2G, C3G y C4G</li> <li>- R: AZT</li> </ul> <p>(independientemente de la sensibilidad in Vitro)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agentes no β-lactámicos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Negativo: MEM - APB – IMI</li> <li>- Positivo: IMI - EDTA/SMA - C3G/CLAV</li> </ul>	<p><b>Carbapenemasas Metalo β-lactamasa (MBL)</b></p> <p>Las MBL son inhibibles por EDTA, Mercaptoacético de sodio (SMA) o tioglicolato de sodio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NO se recomienda CARBAPENEMES</li> <li>- R: C1G, C2G, C3G y C4G</li> </ul> <p>(independientemente de la sensibilidad in Vitro)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Según fenotipo en el antibiograma (S, I, R): AZT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agentes no β-lactámicos</li> <li>- Aztreonam</li> <li>- Piperacilina-tazobactam</li> </ul>

**Sensible a C3G:**

RESULTADO DE SINERGIAS	TIPO DE CARBAPENEMASA	CRITERIO DE INFORME (en fenotipos puros)	OPCIONES DE TRATAMIENTO (Δ) (requiere demostrar sensibilidad)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Negativo: MEM - APB - IMI</li> </ul>	Perfil inusual	La CEPA debe enviarse al Instituto Malbrán (coordinar con el INS)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Positivo: MEM - APB - IMI</li> <li>- Negativo: IMI - EDTA/SMA - C3G/CLAV</li> </ul>	<p><b>Carbapenemasas 2f tipo Sme, NMC-A</b></p> <p>(solo para <i>Enterobacter spp</i> y <i>Serratia marcescens</i>).</p> <p>(Las carbapenemasas 2f son inhibibles por ácido clavulánico y por ácido borónico).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NO se recomienda CARBAPENEMES</li> <li>- R: C1G y C2G</li> <li>- Según fenotipo en el antibiograma (S, I, R): C3G y C4G</li> <li>- Según fenotipo en el antibiograma (S, I, R):AZT</li> </ul> <p>En el caso de detectar otro mecanismo de R asociado como por ej. BLEE, se informarán los β-lactámicos de acuerdo al criterio de BLEE(+) y recomendar no usar carbapenemes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agentes no β-lactámicos</li> <li>- C3G, C4G y AZT (demostrar ausencia de BLEE asociada)</li> <li>- Piperacilina-tazobactam</li> </ul>

(Δ) Sugeridos por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán

Requiere la confirmación molecular de Carbapenemasas 2f tipo KPC, tipo Sme, NMC-A y MBL

**Otros mecanismos de resistencia no mediados por carbapenemasas:**

RESULTADO DE SINERGIAS	MECANISMO	CRITERIO DE INFORME sugeridos por el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán (en fenotipos puros)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Negativo: IMI- APB</li> <li>- Negativo: IMI - EDTA/SMA - C3G/CLAV</li> <li>- Positivo: C3G y C4G con CLAV: (BLEE+) (halos de CTX mucho más pequeños que los de CAZ)</li> <li>- Escaleras fenotípicas en carbapenemas: Dan halos de inhibición en escalera: IMI (&gt;21 mm) &gt; MEM &gt; ERT (6mm)</li> </ul>	<b>β-lactamasa de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M + impermeabilidad</b>	(sólo presencia de BLEE) Según fenotipo (S, I, R): CARBAPENEMES R: C3G y C4G R : AZT
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Positivo: IMI- APB En <i>E. cloacae</i> y <i>C. freundii</i> (falsos positivos para carbapenemasa 2f)</li> <li>- Negativo: IMI- APB. En <i>M. morgani</i>, <i>Providencia spp</i>, <i>S. marcescens</i></li> <li>- Negativo: IMI - EDTA/SMA – C3G/CLAV</li> <li>- Escaleras fenotípicas: MER &gt; IMP (&lt; 22mm) &gt;ERT (6 mm)</li> </ul>	<b>AmpC (derreprimido) + impermeabilidad:</b>	CARBAPENEMES: NO se recomienda R: C3G y C4G Según fenotipo en el antibiograma (S, I, R): AZT

**RECOMENDACIONES:**

- El INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" sugiere que la mayor contribución del test de Hodge resulta en identificar cepas que no producen carbapenemasa (alto valor predictivo negativo).
- El fenotipo de **carbapenemasa tipo KPC** siempre cursa con resistencia a C3G y C4G.
- Las otras carbapenemasas: **Sme y Nmc-a** (de *Serratia* y *Enterobacter*, respectivamente) en su fenotipo salvaje cursan con sensibilidad a C3G y C4G. Cuando a estas carbapenemasas se les suma una BLEE, entonces se podría confundir fenotípicamente con una KPC. Por lo tanto, la confirmación final de la carbapenemasa involucrada debería realizarse por PCR

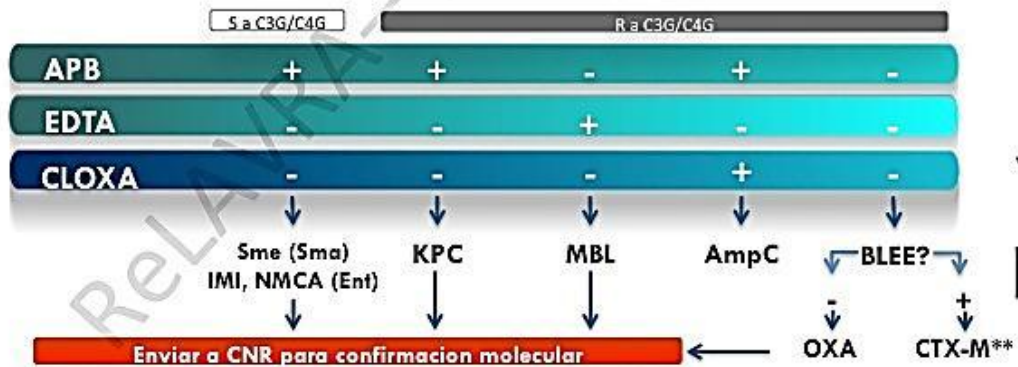


Diagrama 1:

**ALGORITMO DE BUSQUEDA DE CARBAPENEMASAS  
CONSENSO DE LA RED LATINOAMERICANA DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA  
(RELAVRA)**



Cepas sospechosas de producir carbapenemasa. Confirmar con:



\* Para Salmonella utilizar IMP <=24 mm y para la tribu Proteae utilizar IMP <=22 + MERO <=27 mm. \*\* Deberá presentar perfil de BLEE compatible con cefotaximasa

**Enterobacterias  
carbapenemasas**

- IMP: imipenem.
- ETP: Ertapenem
- MERO: Meropenem
- APB: ácido 3 aminofenil borónico.
- OXA/CLOXA: oxacilina o cloxacilina según este disponible.

Fuente:  
Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI/NLIS  
"Dr. Carlos G. Malbrán"

