

Mecanismos de acción y resistencia a β -lactámicos en BGN. Pruebas de tamizaje para detección de BLEE, AmpC, carbapenemasas.

Bioq. Melina Rapoport

Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lab. Nacional/Regional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos.

Centro Colaborador de OMS en Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos.

www.antimicrobianos.com.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



ANTIBIOGRAMA
AMPICILINA
AMOXICILINA/CLAVULANICO
C1G: CEFALOTINA/CEFAZOLINA
CEFOXITINA
C3G: CEFOTAXIMA/CEFTACIDIMA*
AC. NALIDIXICO
CIPROFLOXACINA
ENROFLOXACINA
FLORFENICOL
ESTREPTOMICINA
GENTAMICINA
AMICACINA
TRIMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOL
COLISTIN
FOSFOMICINA
TETRACICLINA**
AZITROMICINA (solo en Salmonella)

β-lactámicos

Polipéptidos

*(Ceftiofur) Si hay R a C3G → IMIPENEM

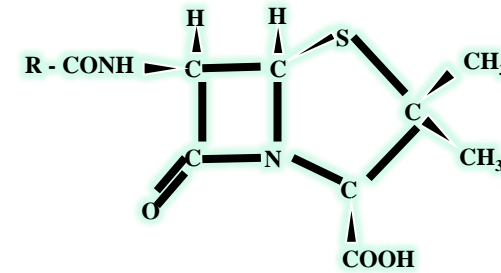
**Si hay R a TET → TIGECICLINA



**VIGILANCIA
INTEGRADA DE RAM
EN ANIMALES.**

**PANEL DE ATB A VIGILAR EN
E. coli y Salmonella**

Antibióticos β -lactámicos



Mecanismo de acción:

Inhibición de la síntesis de pared bacteriana = unión a PBPs

Mecanismos de resistencia:

- Impermeabilidad
- Eflujo
- Modificación del sitio blanco: mutaciones en las PBPs
- Inactivación enzimática = **producción de β -lactamasas**

Clasificación de β -lactamasas

Past and Present Perspectives on β -lactamasas.
Bush K. AAC, 2018 (62).

Characteristic active site

Molecular Class

Functional group

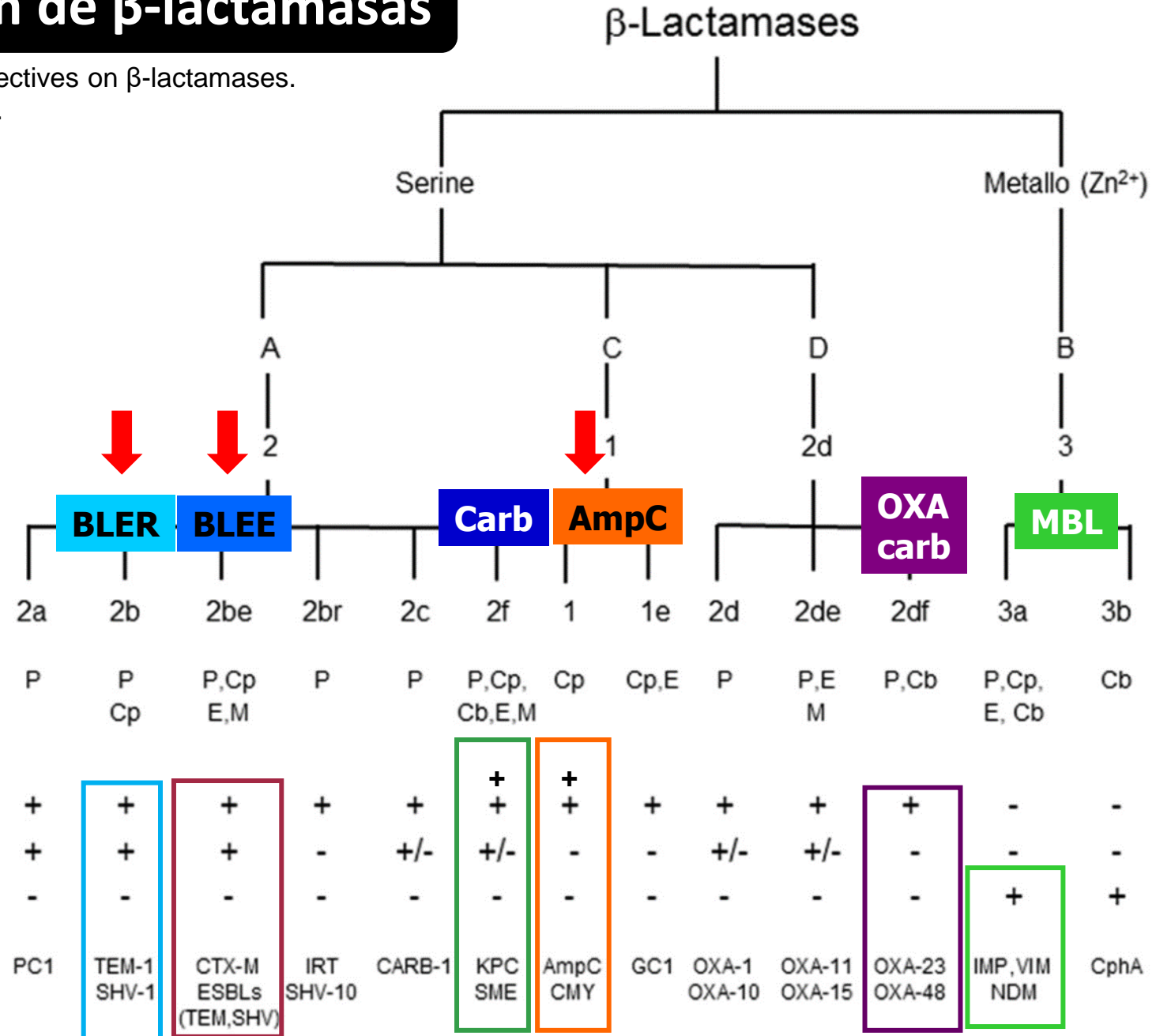
Major functional subgroups

Known substrates

Inhibitor profile

	APB	AV	CA	EDTA
2a	+	+	+	-
2b	+	+	+	-
2be	+	+	+	-
2br	+	+	-	-
2c	+	+	+/-	-
2f	+	+	+/-	-
1	+	+	-	-
1e	+	+	-	-
2d	+	+	+/-	-
2de	+	+	+/-	-
2df	+	+	-	-
3a	-	-	-	+
3b	-	-	-	+

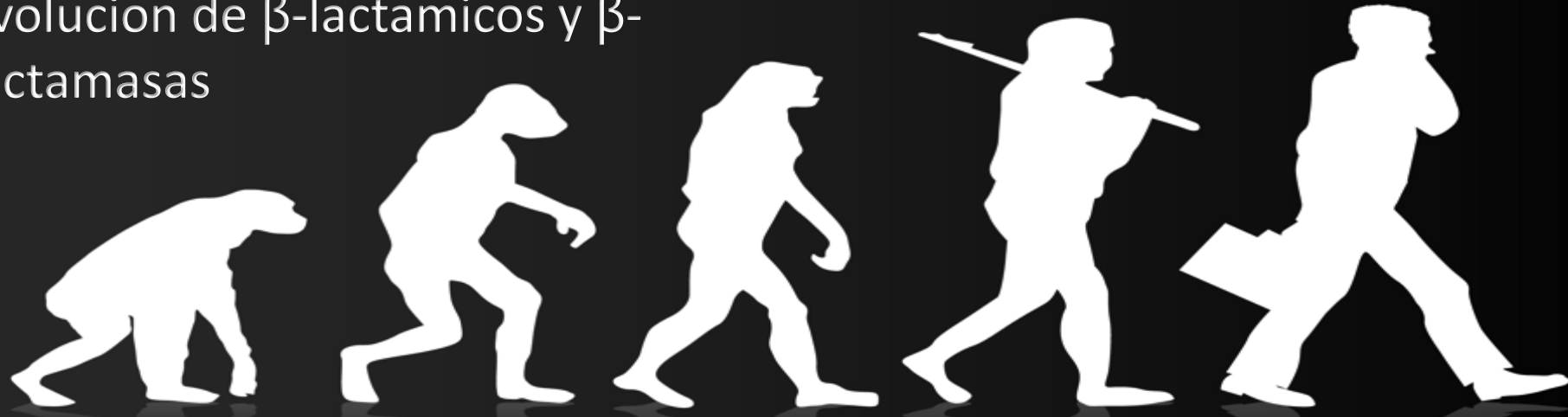
Representative enzymes or enzyme family



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIAN

Cb, carbapenem; Cp, cephalosporin; E, expanded-spectrum cephalosporin; M, monobactam; P, penicillin.

Evolucion de β -lactamicos y β -lactamasas



PENICILINAS

**CEFALOSP.
1ª GEN**

**MONOBAC-
TAMES (AZT)**

**CEFALOSP.
3ª y 4ª GEN**

CARBAPENEMES

β -lactamasa espectro reducido

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



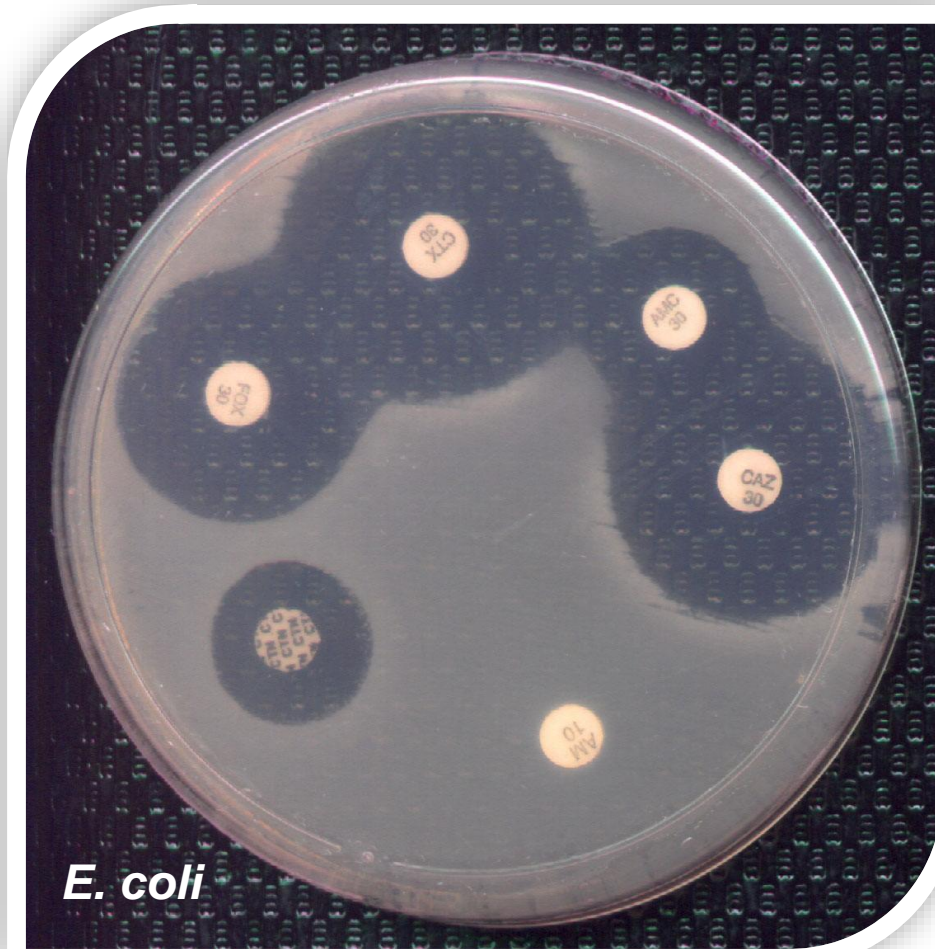
Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Cómo se ve una β -lactamasa de espectro reducido?



E. coli

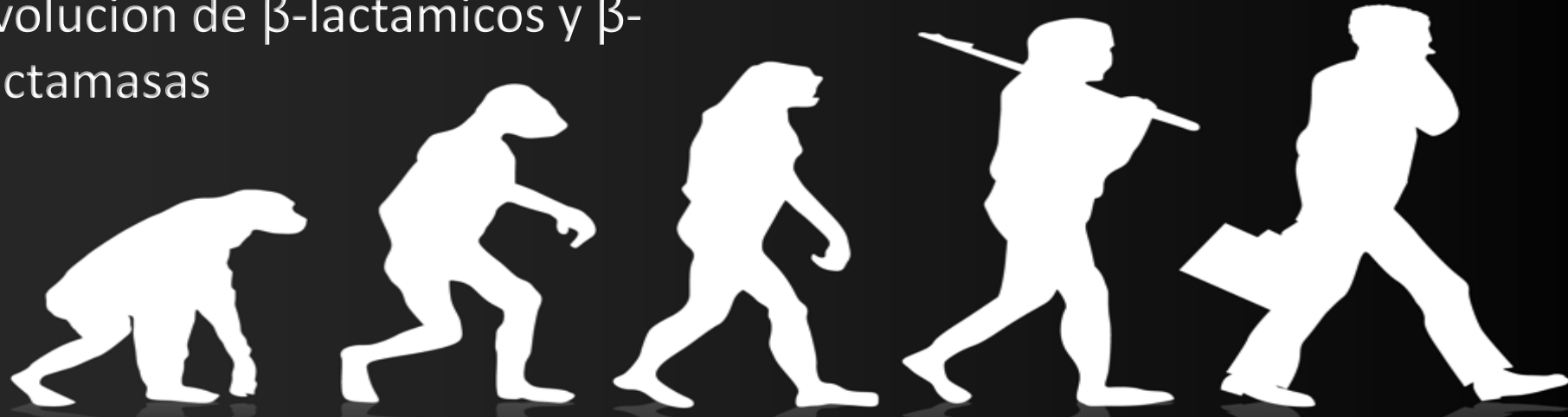
- *Grupo 2b KB: **TEM-1** TEM-2 y SHV1.
- *Muy comunes en Enterobacterales
- *Alta prevalencia en *E. coli* de humanos.

Resistencia a aminopenicilinas
AMP

Sensibilidad / Sensibilidad
intermedia a C1G

Sensibilidad a C3G, C4G,
carbapenemes, combinación con
inhibidores (Amoxi/clavulánico,
Pip/tazobactam, Ampi/sulbactam)

Evolucion de β -lactamicos y β -lactamasas



PENICILINAS

**CEFALOSP.
1ª GEN**

**MONOBAC-
TAMES (AZT)**

**CEFALOSP.
3ª y 4ª GEN**

CARBAPENEMES

β -lactamasa espectro reducido

β -lactamasa espectro extendido (BLEE) / AmpC

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

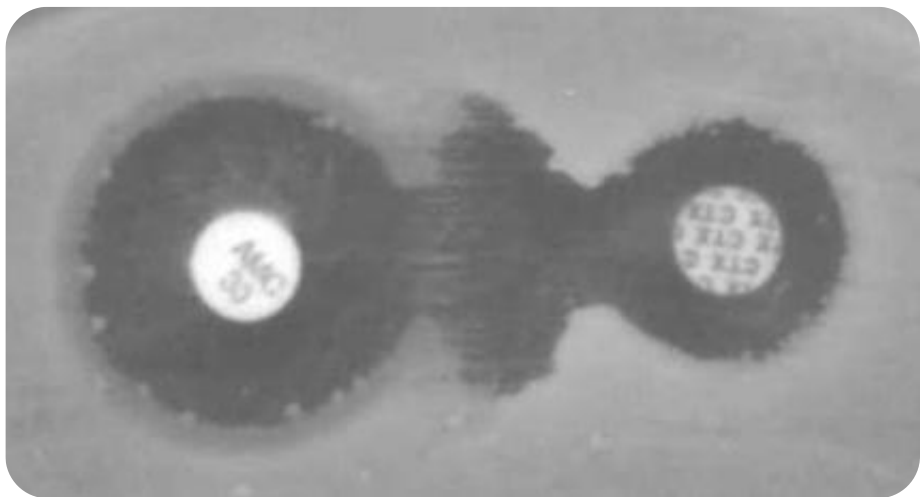


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Cómo se ve una β -lactamasa de espectro extendido (BLEE)?

*Grupo 2be KB: **TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, OXAs**



Resistencia a AMP, C1G, C2G, C3G, C4G.

Sensibilidad o valores intermedios a AMC, PTZ, AMS.

Sensibilidad a FOX y carbapenemes

Inhibibles por CLAVULANICO, SULBACTAM, TAZOBACTAM

CTX-M es la BLEE mas prevalente en Eco y Salmonella a nivel mundial

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

DISTANCIAS DE CENTRO A CENTRO

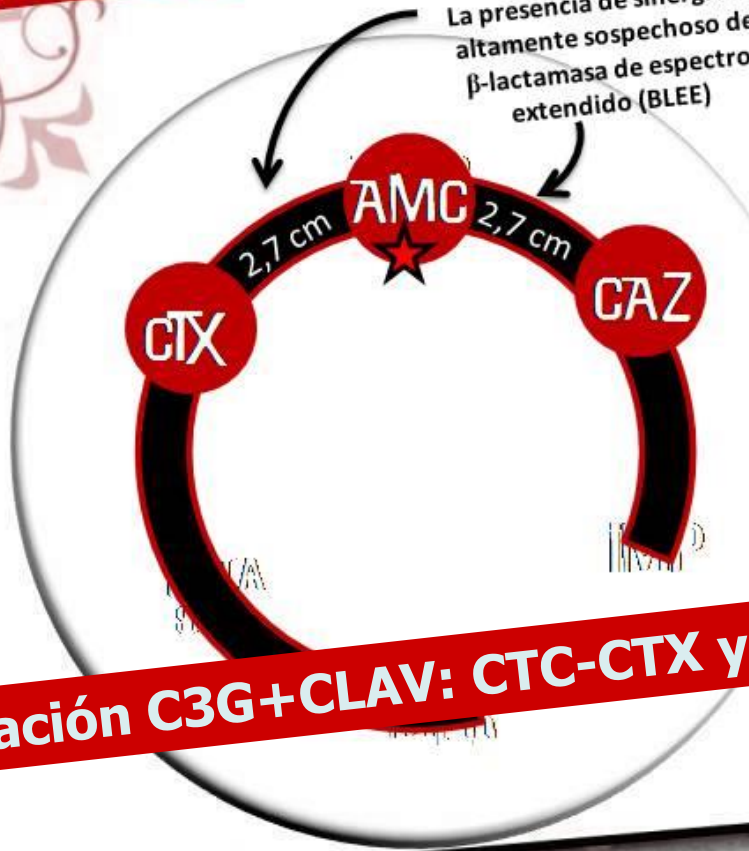
DISEÑO: AMOC: amoxicilina+clavulánico;
MER: meropenem; IMP: Imipenem; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; AMC: amoxicilina+clavulánico;
EDTA/ISMA: Lee K., J. Clin. Microbiol 41, 4623; 2003

COLOCACION ESTRATEGICA de DISCOS

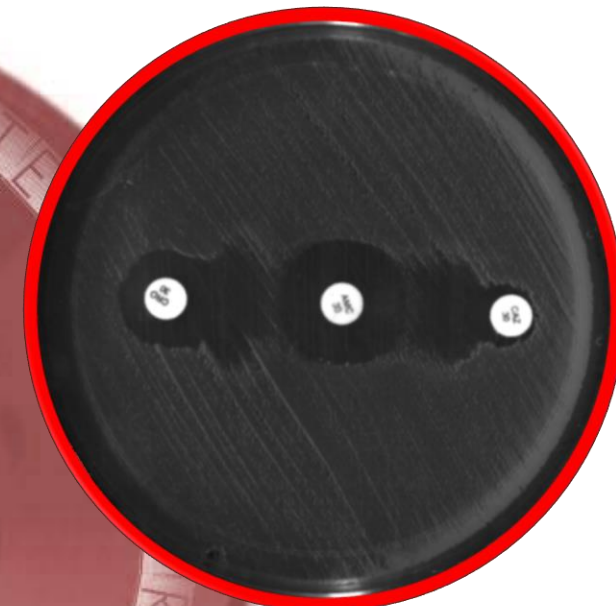
Año 2008

Diseñado para la búsqueda de mecanismos de resistencia en Argentina o demás países de la Región que presenten similar epidemiología.

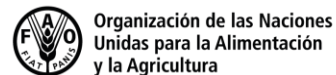
CTX ≤ 27mm. CAZ ≤ 22mm
La presencia de sinergia es altamente sospechoso de β-lactamasa de espectro extendido (BLEE)



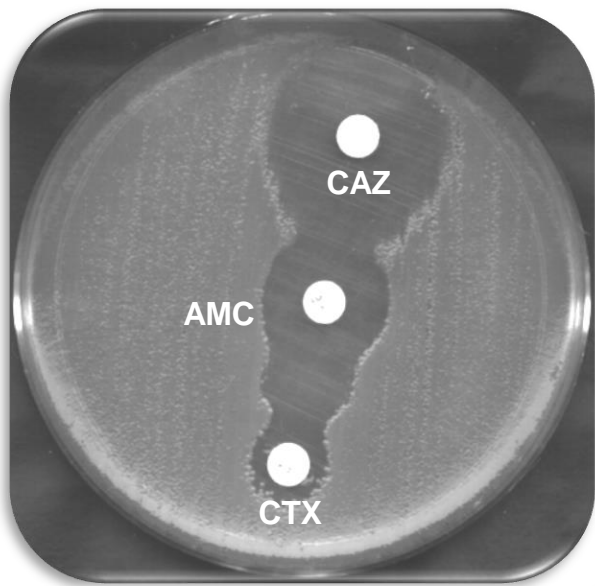
Combinación C3G+CLAV: CTC-CTX y CAC-CAZ $\Delta \geq 5\text{mm}$



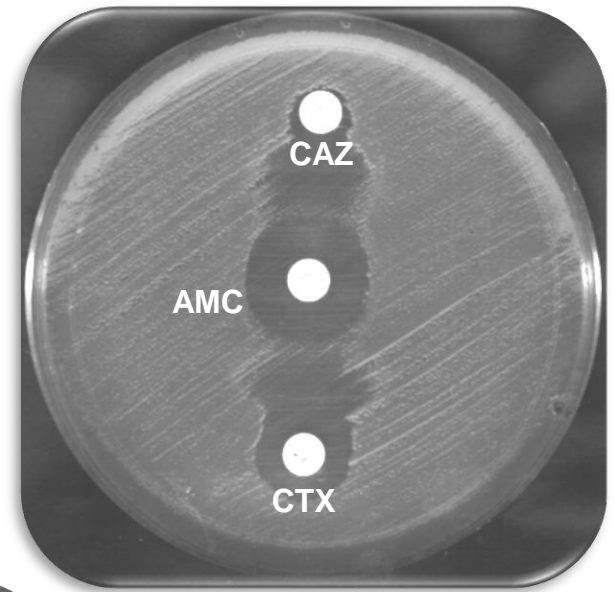
Si se disponen de discos de CTX/Clav y CAZ/Clav realizar el siguiente esquema de colocación de discos: MER-(15mm)-EDTA/SMA-(15mm) CTX/CLAV-(27mm)-CAZ-(20mm)-IMP-(20mm)-AMC-(27mm)-CTX



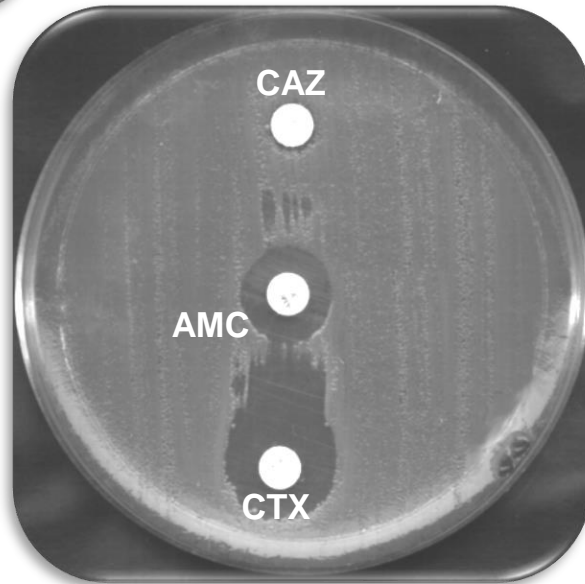
Distintas BLEE: Distintos Fenotipos



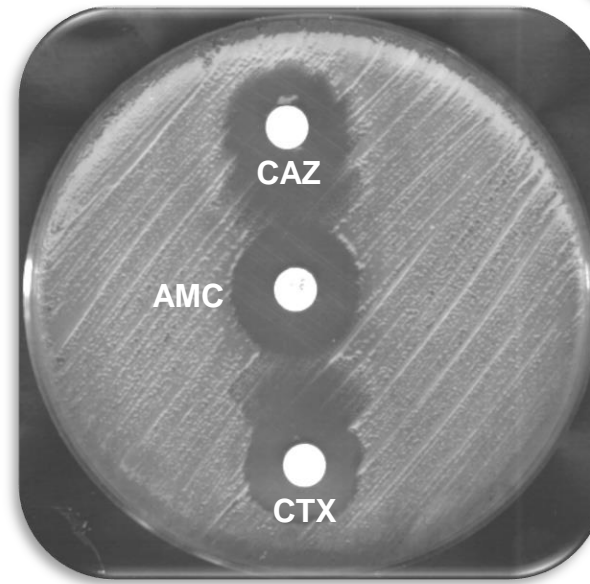
E. coli CTX-M



E. coli PER-2



E. coli SHV-5



E. coli SHV-2

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

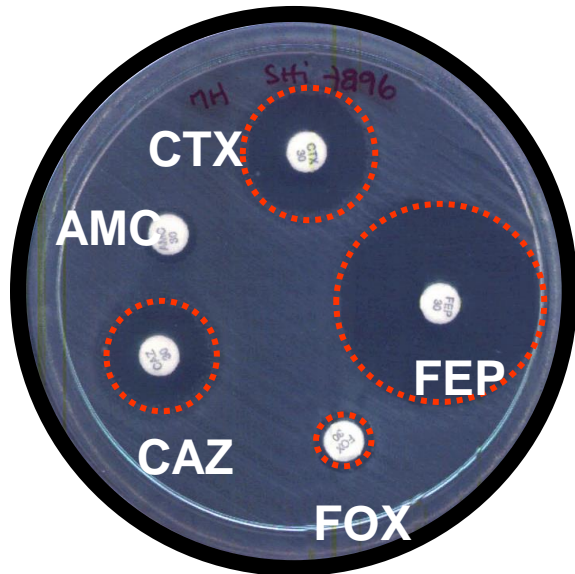


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Cómo se ve una β -lactamasa tipo AmpC en *E. coli* o *Salmonella*?



*Grupo 1/Clase C: Cromosómica o Plasmídica.
*Inhibible por **Ac. Fenil Borónico (APB)**,
Avibactam.

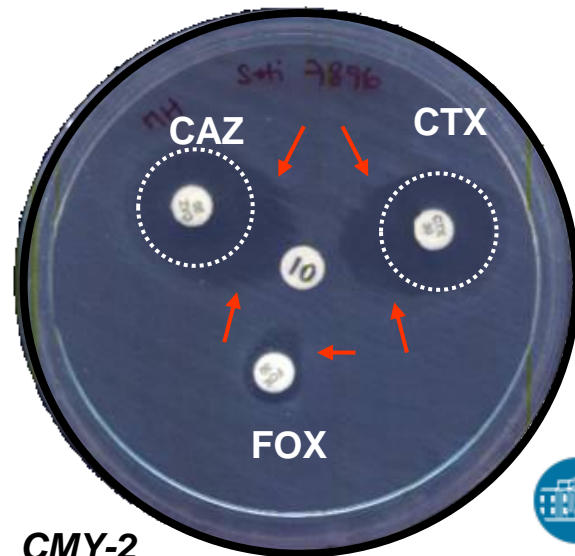
***E. coli* posee AmpC cromosómico basal**

Resistencia
AMP, C1G, AMC, FOX

Sensibilidad Intermedia o Resistencia a
C3G

Sensibilidad
FEP (C4G), carbapenemes

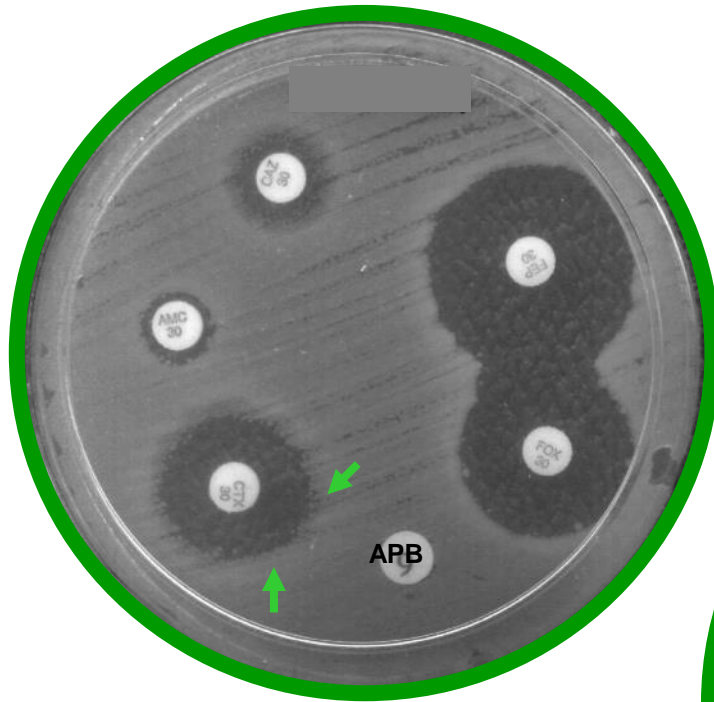
Familias de AmpC
plasmídicas
descriptas:
ACC, ACT, BIL,
CMY, DHA, FOX,
LAT, MIR, MOX



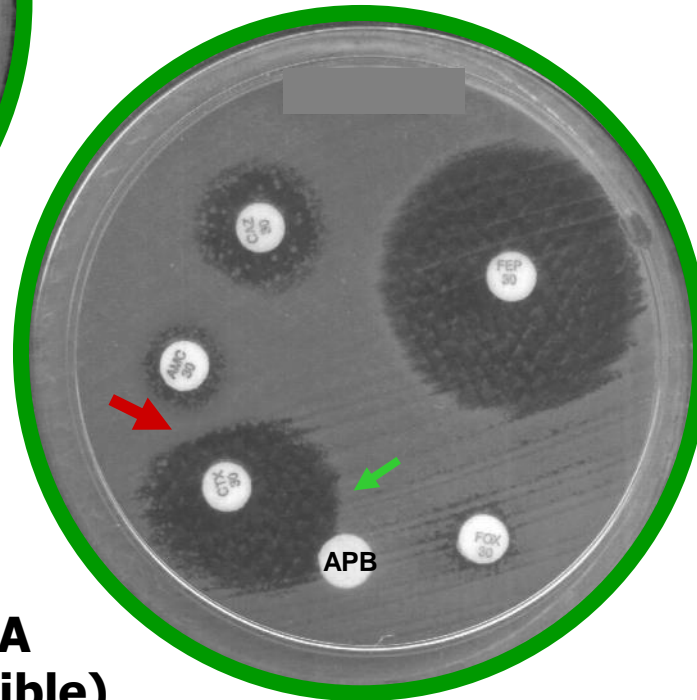
TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

β -lactamasas plasmídicas tipo AmpC

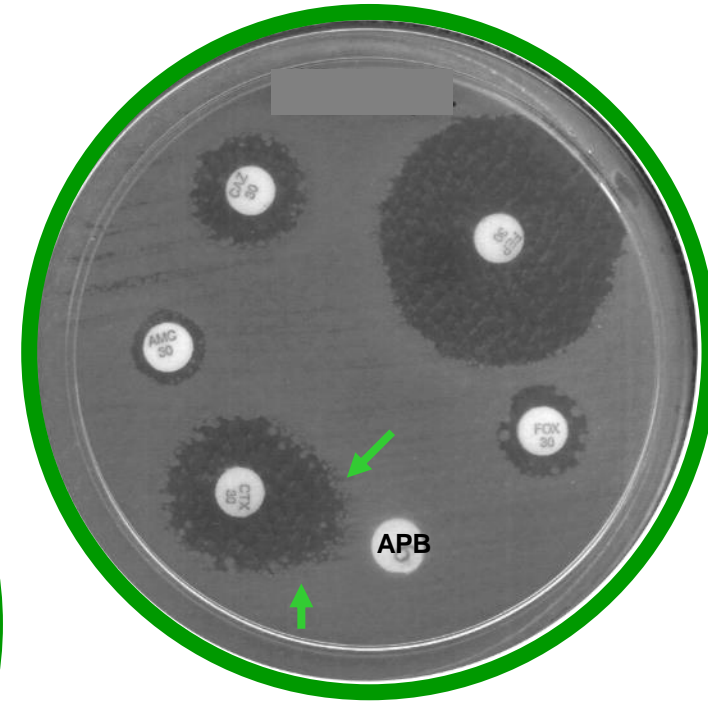
Detección con Ac. Fenil-Borónico



**ACC-1
(FOX sensible)**



**DHA
(inducible)**



CMY-2

APB: Acido Fenil-Borónico

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

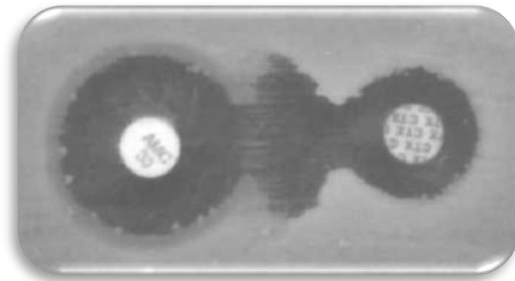
Sospecha de BLEE o AmpC

E. coli / *Salmonella* R a C1G

**1) Sospecha de BLEE
R a C3G?**

Evaluar sinergia CTX-AMC-CFR

BLEE POSITIVA

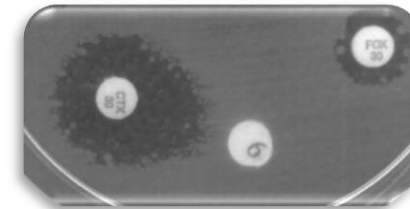


BLEE NEG

**2) Sospecha de AmpC
R/I a FOX?**

Evaluar sinergia FOX-APB-C3G

**β -lactamasa
tipo AmpC**



- ✓ *Salmonella*: fenotipo AmpC implica adquisición de AmpC plasmídico.
- ✓ *E. coli* no hay forma de diferenciar fenotípicamente entre AmpC plasmídico e Hiperproducción de AmpC cromosómico.

CTX cefotaxima
CFR ceftiofur
FOX cefoxitina

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Metodo de

Hodge

Detección de resistencia enzimática

1. Hisopar

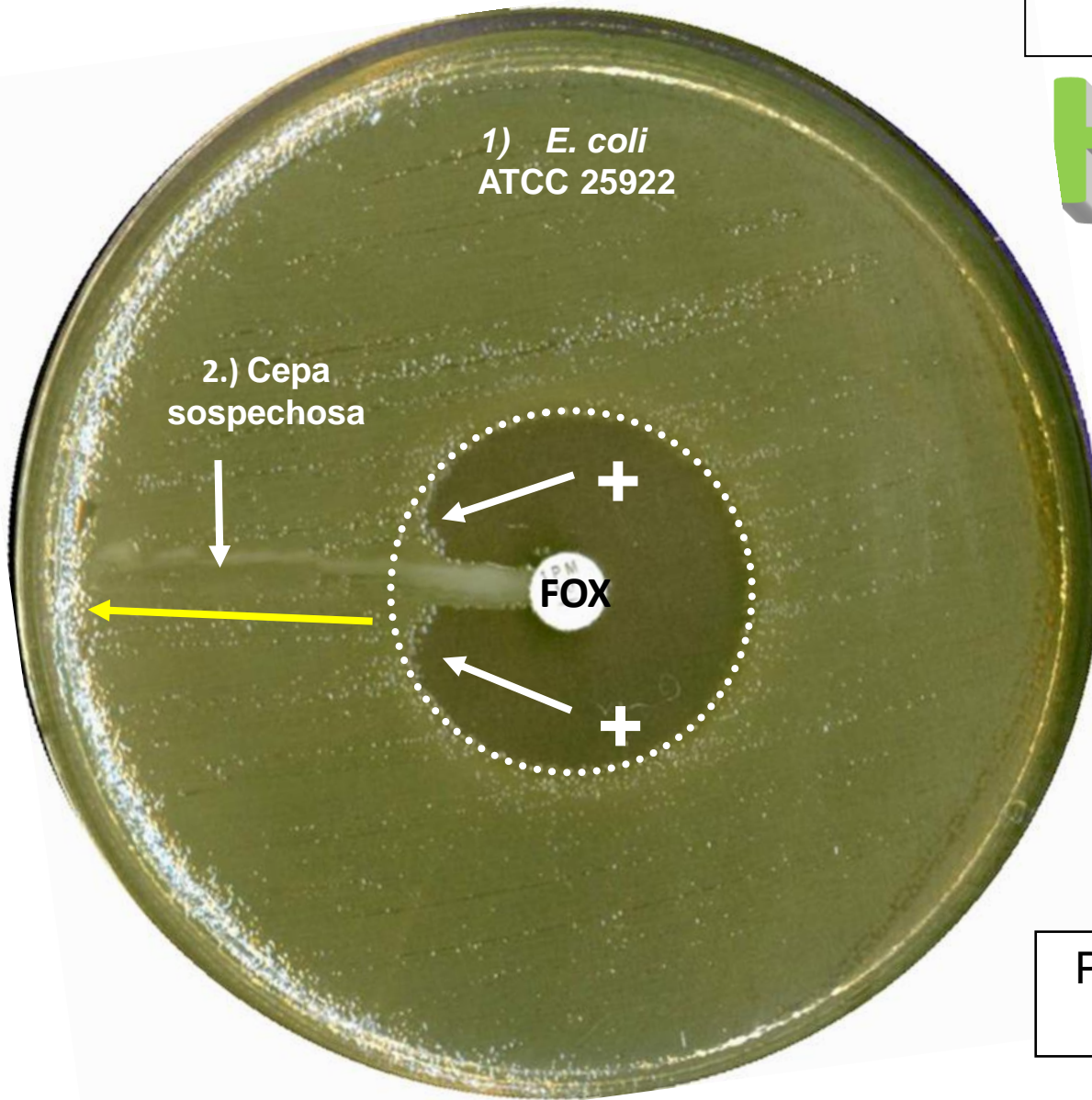
E. coli ATCC 25922

2. Realizar una estría con cepa sospechosa desde el centro hacia la periferia (cultivo fresco)

3. Colocar disco

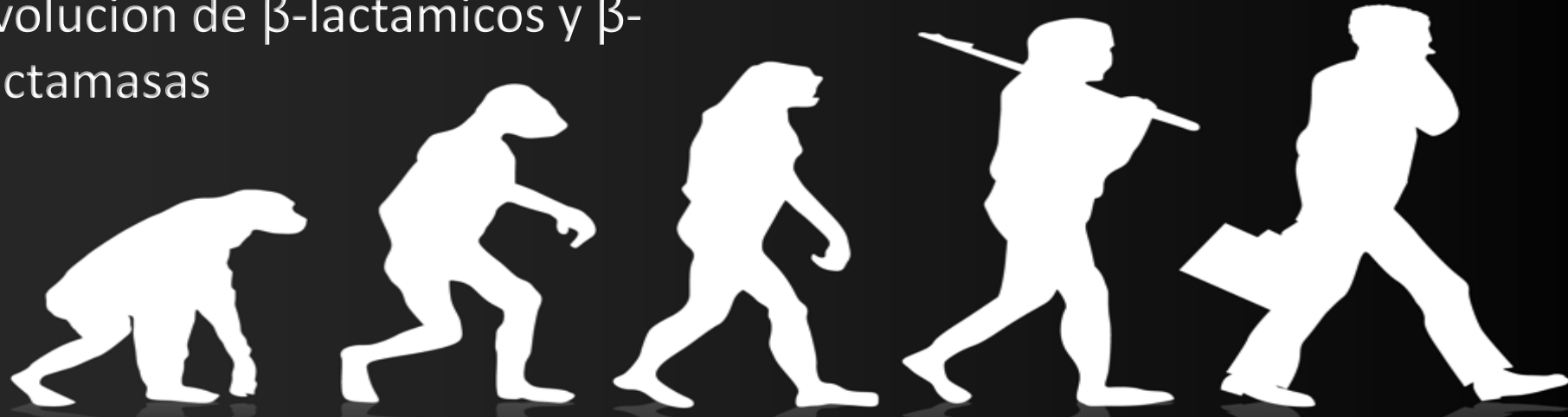
4. Incubar 18hs 35°C

Para detectar AmpC plasmídico:
usar el disco de FOX



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

Evolucion de β -lactamicos y β -lactamasas



PENICILINAS

**CEFALOSP.
1ª GEN**

**MONOBAC-
TAMES (AZT)**

**CEFALOSP.
3ª y 4ª GEN**

CARBAPENEMES

β -lactamasa espectro reducido

β -lactamasa espectro extendido (BLEE)

Carbapenemasas

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Principales Carbapenemasas adquiridas

Grupo 2f, Clase A

SERINO enzimas.

KPC

R a carbapenemes,
C3G , C4G y AZT

Inhibidor: APB, AVI

Carbapenemes: Imipenem, Meropenem, Ertapenem
C3G/C4G: cefalosporinas de 3era/4ta generacion;
AZT: aztreonam; APB: acido fenil boronico; AVI: avibactam

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura

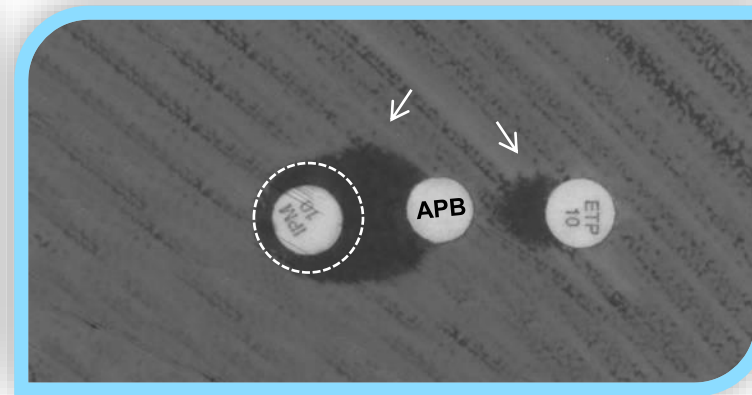
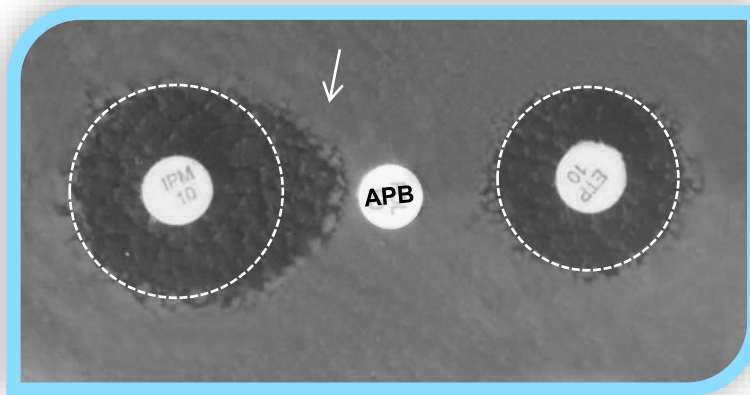
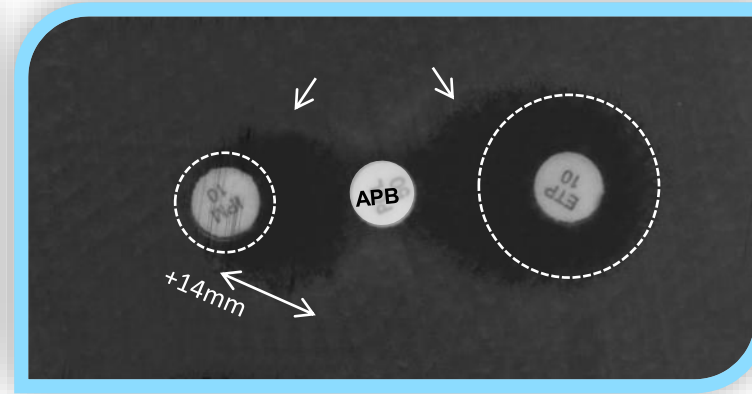
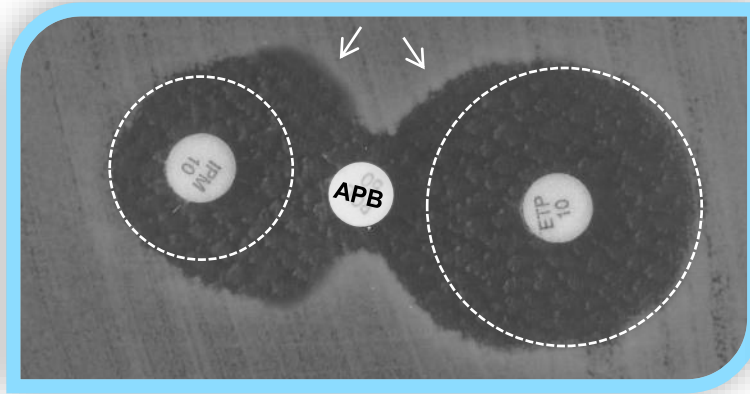


ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea

Detección de carbapenemasas clase A con discos de APB



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Principales Carbapenemasas adquiridas

Grupo 2f, Clase A

SERINO enzimas.

KPC

R a carbapenemes,
C3G , C4G y AZT

Inhibidor: APB, AVI

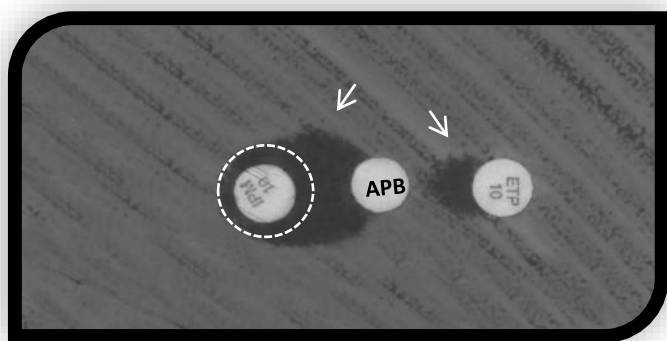
Grupo 3, Clase B

METALO enzimas.

VIM, IMP, NDM

R a carbapenemes,
C3G y C4G
S a AZT

Inhibidor: EDTA

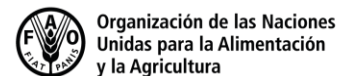


Carbapenemes: Imipenem, Meropenem, Ertapenem
C3G/C4G: cefalosporinas de 3era/4ta generacion;
AZT: aztreonam; APB: acido fenil boronico; AVI: avibactam

Detección de MBL con discos de EDTA



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Principales Carbapenemasas adquiridas

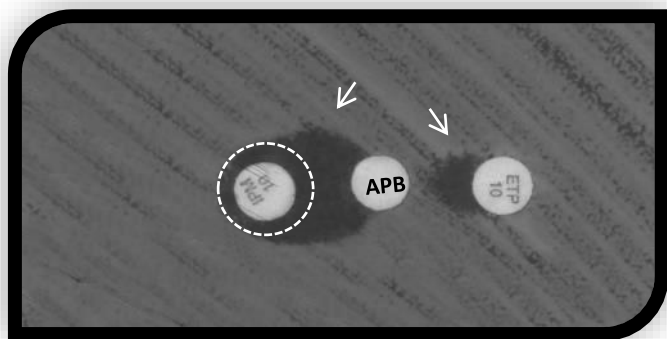
Grupo 2f, Clase A

SERINO enzimas.

KPC

R a carbapenemes,
C3G , C4G y AZT

Inhibidor: APB, AVI



Grupo 3, Clase B

METALO enzimas.

VIM, IMP, NDM

R a carbapenemes,
C3G y C4G
S a AZT

Inhibidor: EDTA



Grupo 2df, Clase D

SERINO enzimas.

OXA-48like/OXA-163

R a carbapenemes,
C3G y C4G

Inhibidor: AVI +/-

Carbapenemes: Imipenem, Meropenem, Ertapenem
C3G/C4G: cefalosporinas de 3era/4ta generacion;
AZT: aztreonam; APB: acido fenil boronico; AVI: avibactam

Métodos de Detección de carbapenemasas

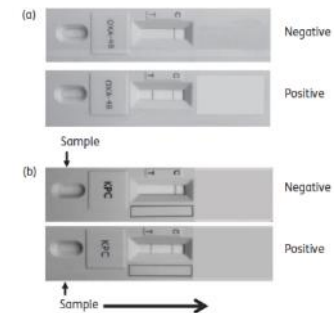
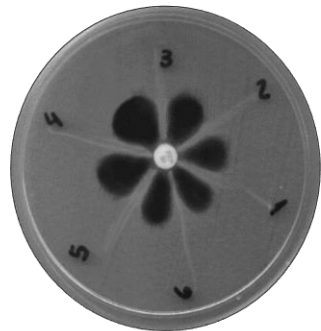
Métodos fenotípicos

Hodge Test / THT

mCIM/eCIM

Métodos colorimétricos

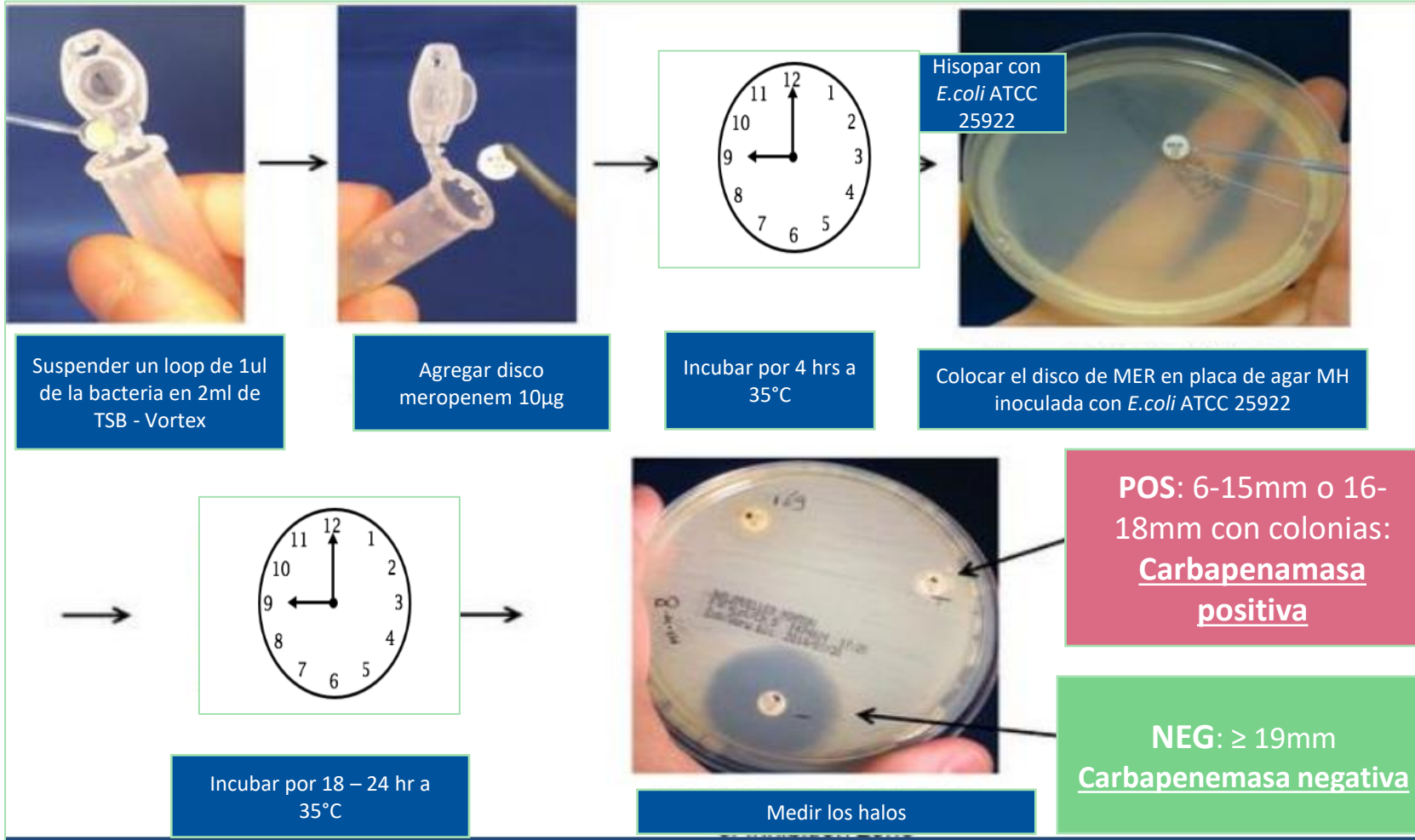
Métodos Inmunocromatográficos



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

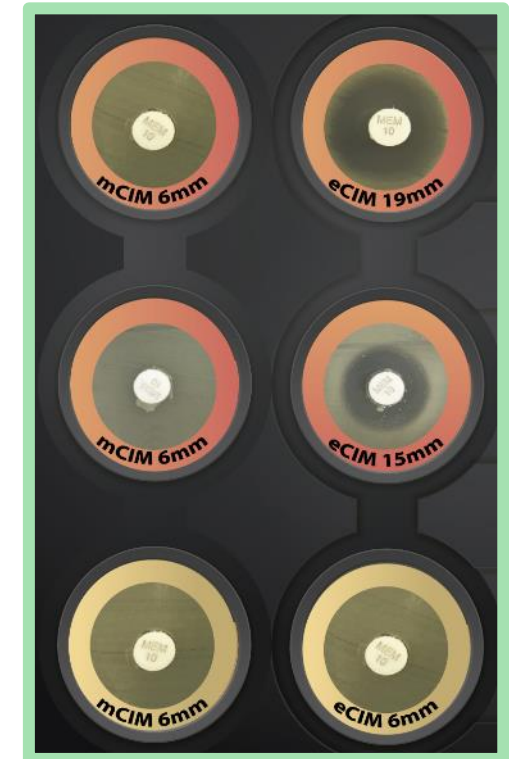
mCIM/eCIM

CLSI M100



eCIM: agregar un 2do tubo con 20ul de EDTA 5mM. Realizar mCIM en paralelo.

Δ eCIM-mCIM ≥ 5 mm = MBL



TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS

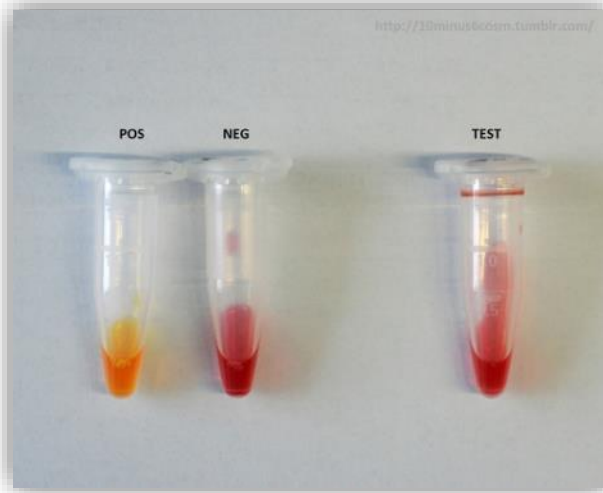
Métodos colorimétricos

Control	Reacción	
		(+) <i>Ps. aeruginosa</i> KPC
		(+) <i>Ps. aeruginosa</i> VIM
		(-) <i>E. cloacae</i> AmpC+CTXM
		(-) <i>E. coli</i> OXA-163
		(+) <i>K. pneumoniae</i> NDM



BlueCarbaTest

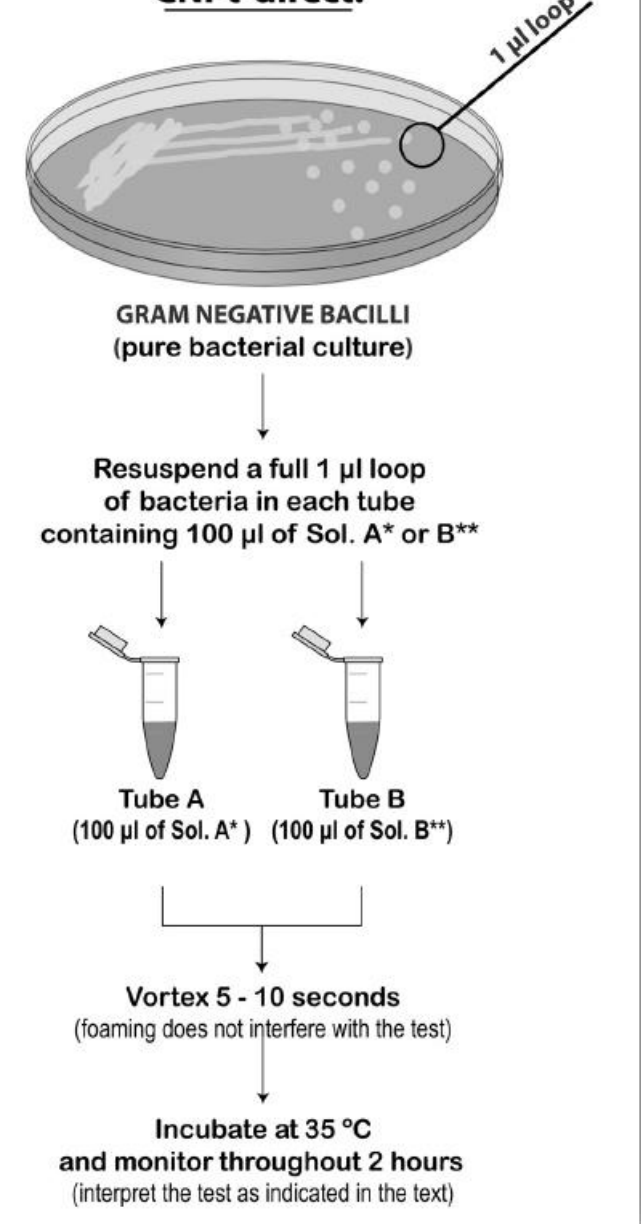
- ✓ Un resultado positivo de un método colorimétrico indica la presencia de carbapenemasa. Por el contrario, un resultado negativo, requiere evaluar el fenotipo completo para definir la presencia o ausencia de carbapenemasa.
- ✓ Algunos alelos de carbapenemasa de tipo OXA pueden no ser detectadas por estos métodos.



CarbaNP-direct



Rapidec CarbaNP® bioMérieux



Métodos Inmunocromatográficos

Métodos ultra rápidos: 15min.

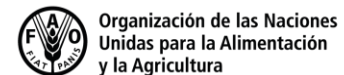


Resist O.O.K: OXA-48, OXA-163, KPC



NG-test 5: KPC, OXA-48like, VIM, IMP, NDM

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Muchas gracias!

Servicio Antimicrobianos
INEI-ANLIS “Dr C. G. Malbran”

www.antimicrobianos.com.ar
rapoport@anlis.gob.ar

TRABAJANDO
JUNTOS
PARA COMBATIR
LA RESISTENCIA
A LOS ANTIMICROBIANOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
Proteger a los animales, preservar nuestro futuro



Unión Europea