

## COMUNICACIÓN BREVE

# Primer aislamiento de enterobacteria productora de carbapenemasa tipo-NDM en un hospital público de Rosario, Argentina

Recibido: 5/7/19 Aceptado: 16/10/19

Florencia Pastore<sup>1</sup>, Silvia Larini<sup>1</sup>, Patricia Marchiaro<sup>2</sup>, Adriana Limansky<sup>2</sup>, María Susana Díaz<sup>2</sup>, Jorgelina Perez<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** La emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el ámbito hospitalario representa un verdadero problema de salud pública mundial. Las carbapenemasas son enzimas que producen resistencia a los antibióticos carbapenémicos, teniendo un directo impacto en la disponibilidad de alternativas terapéuticas. En Argentina, a partir de 2013 han emergido carbapenemasas tipo-NDM (Nueva Delhi Metalo- $\beta$ -lactamasa, M $\beta$ L), que constituyen una resistencia emergente a nivel global.

**Objetivo:** Reportar el primer aislamiento clínico de enterobacteria portadora de NDM en nuestra institución.

**Materiales y métodos:** El aislamiento estudiado fue recuperado de una muestra ósea de un paciente adulto. La identificación bacteriana y los ensayos de susceptibilidad antibiótica se realizaron mediante metodología manual y sistema automatizado Vitek 2C (Biomérieux). La detección y caracterización de carbapenemasas se efectuó por ensayos fenotípicos y moleculares.

**Resultados:** Los ensayos revelaron que el aislamiento, tipificado como *Citrobacter freundii*, es productor de carbapenemasa tipo NDM. Resultó sensible a aztreonam, colistina y fosfomicina. No se detectó fenotípicamente la presencia de beta lactamasas de espectro extendido.

**Discusión:** Se reporta el primer aislamiento de enterobacteria productor de M $\beta$ L tipo-NDM en nuestro nosocomio, siendo

<sup>1</sup> Servicio de Bacteriología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Santa Fe.

<sup>2</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR).

**Autor para correspondencia:** Jorgelina Perez. Hospital Provincial del Centenario. Urquiza 3100, Rosario jofpg@yahoo.com.ar jperez@fbioyf.unr.edu.ar

Este trabajo fue financiado por el Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario, Argentina, y por el PID (Programa de Fomento de la Investigación Científica y Tecnológica, SCYT, UNR) otorgado a Adriana Limansky.

Ninguno de los autores declara presentar conflicto de intereses en relación a esta publicación.

multirresistente, con escasas alternativas terapéuticas. Dado que la presencia de este tipo de aislamiento es considerado de alto riesgo, se requiere un monitoreo activo de este mecanismo de resistencia y la instauración de medidas de control adecuadas para hacer frente a la amenaza que suponen.

**Palabras clave:** carbapenemasas, Nueva Delhi Metalo- $\beta$ -lactamasa, *Citrobacter freundii*, multirresistencia.

## Introducción

Las enterobacterias son una causa importante de infecciones hospitalarias y tienen gran capacidad de diseminación. Al mismo tiempo, son capaces de adquirir y transmitir material genético que codifica determinantes de resistencia a diferentes antibióticos (1,2). Las carbapenemasas adquiridas constituyen la familia más versátil dentro de las  $\beta$ -lactamasas e incluyen serino- $\beta$ -lactamasas (S $\beta$ Ls) de clases A y D, las cuales contienen un residuo de serina en su sitio activo, así como metalo- $\beta$ -lactamasas (M $\beta$ Ls) de clase B, que contienen uno o dos iones Zn (II) para la actividad catalítica (2, 3, 4, 5, 6). Los genes codificantes de las carbapenemasas se localizan mayoritariamente en estructuras genéticas móviles o movilizables (e.g. secuencias de inserción, integrones, transposones, plásmidos, entre otros), lo que les otorga un gran potencial de diseminación (5). Son enzimas de espectro extremo capaces de hidrolizar la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenemes como imipenem (IPM), meropenem (MEM) y ertapenem (ETP), siendo estos últimos el tratamiento de elección para bacilos Gram-negativos multirresistentes (5). La emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EBPC) adquiridas en el ámbito hospitalario representa un verdadero problema de salud pública mundial debido al directo impacto en la disponibilidad de alternativas terapéuticas y a la morbi-mortalidad asociada (7, 8, 9). Particularmente, numerosas M $\beta$ Ls adquiridas han sido descritas desde 1990, siendo las enzimas tipo-IMP, -VIM y -NDM las más diseminadas y asociadas a enterobacterias, así como a bacilos no fermentadores (BNF, e.g. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, entre otros) (8, 10, 11, 12). Entre estas enzimas, la M $\beta$ L tipo-NDM es la que ha emergido más recientemente (en 2008) y, al presente, tanto enterobacterias como BNF productores se han documentado profusamente a nivel mundial (10, 11). En 2013, el Servicio de Antimicrobianos del Laboratorio Nacional de Referencia (ANLIS-INEI "Dr. C. Malbrán") alertó del primer aislamiento de enterobacteria (i.e. *Providencia rettgeri*) productor de NDM en nuestro país (12, 13). Desde entonces, se ha reportado la activa y creciente circulación en Argentina de diferentes especies de enterobacterias productoras tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* (13, 14, 15). En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo describir la caracterización fenotípica y genotípica del primer aislamiento clínico de una enterobacteria, *Citrobacter freundii*, productora de M $\beta$ L, recuperado de un paciente asistido en un nosocomio público de la ciudad de Rosario.

## Materiales y métodos

### 1. Caracterización del aislamiento clínico

En este trabajo se estudió una enterobacteria recuperada de una muestra ósea de metatarso de un paciente masculino de 61 años de edad, con antecedentes personales de diabetes *mellitus* tipo 2 e insuficiencia renal crónica en hemodiálisis, asistido en un hospital público de la ciudad de Rosario por cuadro agravado de pie diabético.

#### 1.1. Aislamiento e identificación

La muestra ósea se inoculó en medios de cultivo enriquecidos (agar sangre, agar chocolate) y caldo tioglicolato que se incubaron en condiciones de microaerofilia a 35 °C. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas manuales convencionales, así como por metodología automatizada Vitek 2C (Biomérieux).

#### 1.2. Susceptibilidad a los antimicrobianos

**Método de difusión de Kirby Bauer.** Se determinó la susceptibilidad a IPM, MEM, ETP, ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefazolina (KZ), ampicilina (AMP), amoxicilina/clavulánico (AMC), amikacina (AKN), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), ciprofloxacina (CIP), tigeciclina (TIG), aztreonam (AZT) y fosfomicina (FOS) según las recomendaciones del CLSI (16, 17, 18). Para FOS, se siguieron los criterios sugeridos por el protocolo de la Red WHONET 2014 (23).

**Prueba de sensibilidad por dilución automatizada.** Se empleó el sistema Vitek 2C (Biomérieux) utilizando la tarjeta AST-N. Se ensayó la susceptibilidad a IPM, MEM, CAZ, CTX, CEF, AMP, AKN, TMS, CIP, interpretándose según CLSI (16, 17, 18, 19, 20).

### 2. Detección fenotípica de carbapenemasas

#### 2.1. Ensayo de detección colorimétrica Blue-Carba

Se agregó una ansada de 5  $\mu$ l de colonias bacterianas a una solución tamponada de IPM con azul de bromotimol y se incubó a 37 °C. El tiempo de lectura no debe superar los 120 minutos. La positividad se infiere por visualización directa del viraje del indicador de pH de azul a amarillo, indicativo de la hidrólisis del IPM (21).

#### 2.2. Ensayos microbiológicos

Se empleó el test de Hodge modificado (MHT) y el Tritón

Hodge Test (THT) utilizando discos de carbapenemes (*i.e.* MEM y ERT) (22). Para ambos métodos se hisopó una placa de Mueller Hinton agar (MHA) con una suspensión 0,5 Mc Farland de la cepa indicadora (*Escherichia coli* ATCC 25922). Luego se ubicó en el centro de la placa un disco de carbapenem y se estrió la cepa a evaluar desde el disco hacia la periferia. En el THT se adicionó Tritón X-100 hasta su completa absorción, previa a la inoculación de la cepa indicadora. Un resultado positivo tanto en el MHT como en el THT se verifica como un sobrecrecimiento de la cepa indicadora (*E. coli* ATCC 25922) hacia el disco de carbapenem en la intersección de la estría con la zona de inhibición. La sensibilidad del MHT en la identificación de MβLs tipo-NDM es baja debido a que estas enzimas son lipoproteínas y se hayan ancladas a membrana. La incorporación de un detergente (*i.e.* Tritón) al ensayo aumenta la sensibilidad del mismo al permitir la liberación de estas proteínas de la membrana. Así, el THT favorece la detección de esta clase de carbapenemasas en cepas productoras (1, 22, 23).

### 2.3. Método de Inactivación de Carbapenemes modificado (mCIM)

Se incubó un disco de MER en una suspensión bacteriana de la cepa en estudio durante cuatro horas a 35 °C. Luego, el mismo se colocó en una placa de MHA previamente inoculada con la cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922. Asimismo, en la placa se colocó un segundo disco de MER como control. Finalmente, se incubó la placa a 35 °C durante 18 hs. Una diferencia de las zonas de inhibición entre ambos discos mayor o igual a 5 mm es indicativa de la hidrólisis del carbapenem por presencia de carbapenemasa en la cepa en estudio (1, 17, 18, 23).

## 3. Caracterización fenotípica de carbapenemasas

### 3.1. Ensayos de sinergia (ES)

Se colocaron discos de carbapenemes (IPM, MEM) a una distancia óptima de otros discos impregnados con inhibidores de SCBs clase A como el ácido 3-amino fenilborónico (APB, 300 µg), o de MβLs como el EDTA/SMA (EDTA 740/2000 µg). Asimismo, este método de difusión de doble disco se puede ensayar en enterobacterias productoras de otras β-lactamasas (no carbapenemasas) como las de tipo-AmpC, utilizando un disco impregnado con cloxacilina (CLOXA, 300 µg). De esta manera, un ES podría detectar EBPC productoras de SCBs clase A como ES/EDTA: negativo, APB: positivo y CLOXA: negativo, así como MβLs según ES/EDTA: positivo, ES/APB: negativo y ES/CLOXA: negativo (24, 25, 26).

### 3.2. Método de Inactivación de Carbapenemes modificado con agregado de EDTA (eCIM)

Se realizó la metodología del mCIM (ítem 2.3) con el agregado de EDTA 5 mM a la suspensión bacteriana en estudio. El eCIM debe realizarse conjuntamente con el mCIM cuando se investiga la producción de MβL. En el caso de que un aislamiento sea productor de esta enzima la actividad de la misma será inhibida por EDTA, y el MER contenido en el disco no podrá ser hidrolizado. Así, un incremento de la zona de inhibición mayor o igual a 5 mm del disco de MER en eCIM respecto al halo de MER en mCIM es indicativo de la producción de MβL por parte de la cepa en estudio (1, 17, 18, 23).

## 4. Detección fenotípica de Beta Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Se empleó el test de Jarlier en MHA suplementado con EDTA 0.4 mM (15, 25). La estrategia consistió en hisopar la cepa en estudio en placas que contienen el medio de cultivo suplementado. Posteriormente, se colocó un disco de AMC (30/10 µg), y a 25 mm discos de CTX (30 µg) y CAZ (30 µg). Después de una incubación de 24 horas a 35 °C, la visualización de una zona de inhibición de crecimiento entre el antibiótico central (AMC) y las cefalosporinas (CTX y/o CAZ) es indicativa de una cepa productora de BLEE (18, 17, 1). Asimismo, se realizó el test confirmatorio de discos combinados propuesto por el CLSI en MHA suplementado con EDTA 0.4 mM. Se emplearon discos de CAZ (30 µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAC) (10/30 µg), CTX (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTC) (10/30 µg). Una diferencia mayor o igual a 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAC y CAZ solos o CTC y CTX se interpreta como resultado positivo.

## 5. Ensayos genotípicos

Se realizaron PCRs específicas de genes codificantes de MβLs (*i.e.* *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, y *bla*<sub>VIM</sub>, según protocolo MBL "multiplex", [www.antimicrobianos.com.ar](http://www.antimicrobianos.com.ar)) y posterior secuenciación (Universidad de Maine, EE.UU). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó empleando la herramienta bioinformática BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool", [http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) (27).

## Resultados

Un paciente de sexo masculino con presencia de factores de riesgo (*i.e.* diabetes *mellitus* tipo 2, insuficiencia renal crónica

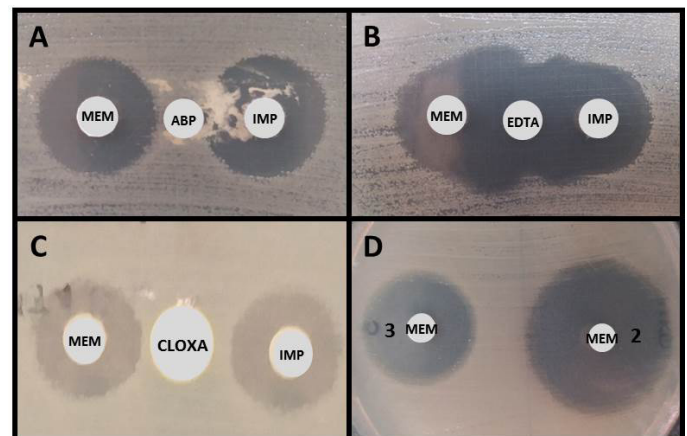
y en tratamiento de hemodiálisis) acudió a la guardia de un hospital público de la ciudad de Rosario por agravamiento de su cuadro de pie diabético. Dada la preocupante evolución se decidió efectuar una biopsia de la lesión y el material recuperado fue enviado para su estudio al laboratorio de bacteriología clínica del nosocomio. En las placas de cultivo, tras 24 horas de incubación, se evidenció desarrollo de un bacilo Gram-negativo, corroborado por la tinción de Gram. El aislamiento fue identificado como *Citrobacter freundii* según pruebas bioquímicas manuales (i.e. pruebas positivas: fermentación de glucosa con producción de ácido, fermentación de lactosa, utilización de citrato, producción de sulfuro de hidrógeno, movilidad, rojo de metilo; pruebas negativas: hidrólisis de urea, producción de indol, y producción de acetoina). Asimismo, la identificación bacteriana se confirmó mediante el empleo de Vitek 2C.

Los ensayos de susceptibilidad por metodologías de difusión y pruebas de sensibilidad por dilución automatizada mostraron que el aislamiento presentó resistencia a MEM, IPM, ETP, CAZ, CTX, KZ, AMP, AMC, TMS, FOX y sensibilidad a AZT, TIG, AKN, CIP y FOS. El equipo comercial automatizado informó valores de Concentración Inhibitoria Mínima a MEM e IPM  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ , alertando esto sobre la posible producción de carbapenemasas. A fin de verificar la presencia de este tipo de enzimas, el aislamiento fue sometido al test de Carba Blue, el cual resultó ser positivo tras una hora de incubación. Adicionalmente se realizaron otros ensayos confirmatorios de producción de carbapenemasas como MHT, THT y mCIM. Los resultados de dudosa interpretación obtenidos con MHT no permitieron confirmar la producción de carbapenemasa (Figuras 1A y 1B). Sin embargo, el THT mostró que el aislamiento era productor de la misma. El ensayo de THT fue más sensible cuando se empleó como sustrato ETP, de acuerdo a lo sugerido por el Servicio de Antimicrobianos (Figuras 1C y

1D; 4). El análisis comparativo de estos dos ensayos sugirió que la carbapenemasa tendría la característica de ser una proteína anclada a membrana, implicando la presencia de una MBL tipo-NDM. Por su lado, el mCIM arrojó un resultado compatible con la producción de carbapenemasa (Figura 1E).

Para la caracterización fenotípica de la carbapenemasa producida por el aislamiento en cuestión se efectuaron ES y eCIM. Los ES para detección de  $\beta$ -lactamasas son ampliamente utilizados por los laboratorios de microbiología clínica debido al bajo costo y a la fácil realización. Las metodologías de mCIM y eCIM fueron incorporadas por el CLSI a partir de 2017 y, utilizadas conjuntamente, tienen una sensibilidad mayor al 95% y una especificidad mayor al 92% para la detección de MBLs en enterobacterias. El ES que resultó positivo fue el que emplea EDTA (Figura 2B). Además, se observó un incremento superior a 5 mm en la zona de inhibición del eCIM en comparación a la del mCIM.

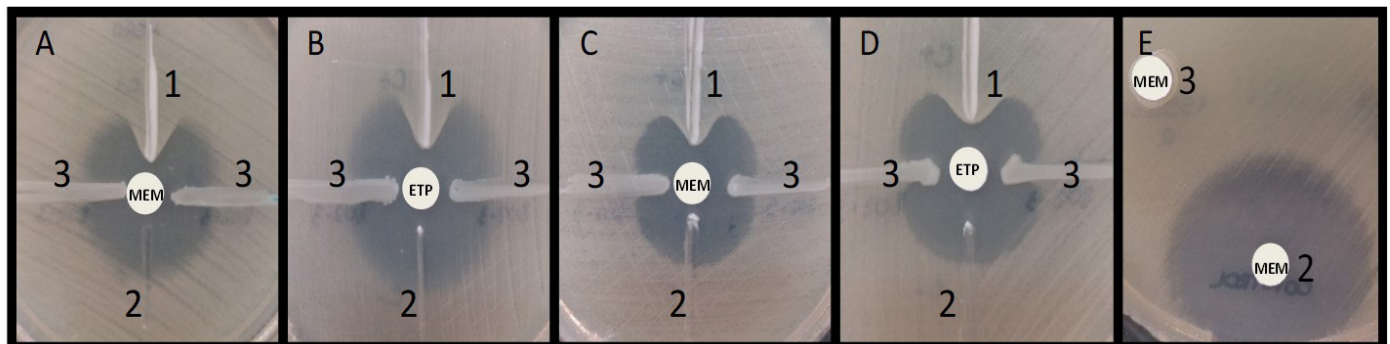
**Figura 2**



**A, B y C.** Ensayos de sinergia con APB, CLOXA y EDTA, respectivamente.

**D.** eCIM. **2.** *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control negativo). **3.** Aislamiento en estudio.

**Figura 1**



**A y B.** MHT con discos de MEM y ETP, respectivamente.

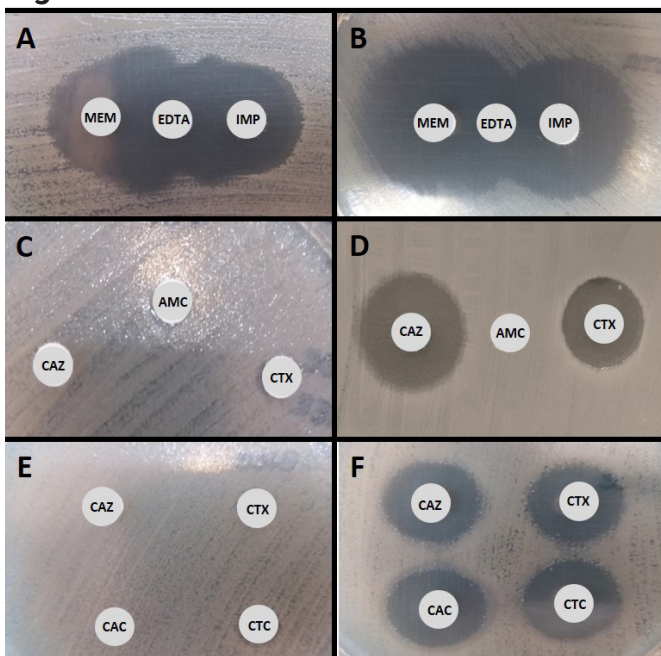
**C y D.** THT con MEM y ETP, respectivamente.

**E.** mCIM. **1.** *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa de nuestra colección (control positivo). **2.** *K. pneumoniae* ATCC 700603 (control negativo). **3.** Aislamiento en estudio.

En conjunto, los resultados de los ES y del eCIM mostraron que la cepa era productora de M $\beta$ L (Figura 2).

Los ensayos genotípicos detectaron la presencia del gen *bla*<sub>NDM</sub>. Finalmente, se realizó un test adicional de inhibición de la M $\beta$ L mediante el agregado de EDTA 0,4 mM en MHA a fin de evaluar si la resistencia a cefalosporinas de tercera generación era producto del efecto hidrolítico de la M $\beta$ L o de la presencia de BLEE, prevalentes en enterobacterias en nuestro medio. En la placa con EDTA se observó un incremento en el diámetro de los halos de carbapenemes y cefalosporinas de tercera generación, indicando que el aislamiento no era portador de BLEE. Es importante mencionar que con las dos metodologías fenotípicas ensayadas no se detectó presencia de BLEE (Figura 3).

**Figura 3**



**A.** Ensayo de sinergia empleando EDTA como inhibidor e IMP y MEM como sustratos.

**B.** Ensayo A con EDTA 0.04 mM como inhibidor de M $\beta$ L.

**C y D.** Test de Jarlier para la detección de BLEE en MHA (sin y con suplemento de EDTA 0.04 mM, respectivamente).

**E y F.** Test de discos combinados para la detección de BLEE en MHA (sin y con suplemento de EDTA 0.04 mM, respectivamente).

## Discusión

En este trabajo se reporta el primer aislamiento de enterobacteria, *Citrobacter freundii*, productor de M $\beta$ L tipo-NDM en nuestro nosocomio; siendo el mismo multirresistente

con escasas alternativas terapéuticas. Cabe destacar que no hubo evidencias de diseminación del gen de resistencia identificado a otras bacilos Gram negativos en el paciente estudiado, situación diferente a lo reportado por Martino et al. (14), donde en un mismo paciente se recuperaron seis enterobacterias portadoras del mismo gen *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Los métodos fenotípicos empleados por el Laboratorio de Microbiología Clínica logran categorizar eficientemente la presencia de M $\beta$ L, destacándose su rol crítico como centro primario de pesquisa de determinantes de resistencia. Un fenotipo que ayuda a la detección de carbapenemasas tipo M $\beta$ L es la inhibición por EDTA y la resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto a AZT. En nuestro caso, el empleo de métodos moleculares (amplificación y posterior secuenciación) permitió identificar el gen codificante, de la M $\beta$ L caracterizada fenotípicamente como *bla*<sub>NDM</sub>. Este conocimiento aporta información relevante en la epidemiología local de infecciones nosocomiales causadas por bacilos Gram-negativos productores de M $\beta$ Ls.

Dado que la presencia de este aislamiento en nuestra institución debe ser considerado de alto riesgo, se requiere un monitoreo activo de este mecanismo de resistencia y la instauración de medidas preventivas de control adecuadas para evitar la diseminación de estos patógenos bacterianos productores de carbapenemasas y/o de sus genes de resistencia. La falta de control de estas cepas resistentes culminará en la poca o nula disponibilidad de opciones terapéuticas y, por ende, en el incremento en la morbi-mortalidad de los pacientes.

## Bibliografía

- Miranda Pratt MS. Recomendaciones para detección de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomona aeruginosa*. 2018.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112-22.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
- Nordmann P. and Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821–83.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
- Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000-2004). *Microb Drug Resist* 2006; 12: 223-30.
- Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2013; 4:48.
- Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct; 25(4):682-707.
- Dordet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014: 249856.
- Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology* (2013), 62, 499–513.
- Pasteran F, Rapoport M, Alborno E, Lucero C, Ceriana P, Faccone D, Gómez S, NDM Argentina Group and Corso A. Dissemination of NDM producers in Argentina (2013-2015): escalation of *Enterobacteriaceae* belonging to the proteaeae tribe. Protocolo del Servicio de antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" 26th ECCMID. Amsterdam, Netherlands. 9-12 April 2016.
- Pasteran F, Meo A, Gomez S, Derdoy L, Albronz E, Faccone D, Guerriero L, Archuby D, Tarzia A, Lopez M, Corso A. Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist* 2014; 2:344-345.
- Martino F, Tijet N, Melano R, Pasteran F, Rapoport M, Faccone D, Biondi E, Vazquez M, Corso A, Gomez SA. Isolation of Six *Enterobacteriaceae* Producing New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM-1) in a Pediatric Patient from Argentina. *ASM Microbe* 2016, 16 al 20 de junio de 2016, Boston, EEUU.
- Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Boletín informativo n° 3. 2013.
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, and Patel JB. Evaluation of Methods to Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2007, 45: 2723–2725.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement, 2017; M100-S27. Wayne, PA, EE.UU.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th informational supplement, 2018; M100-S28. Wayne, PA, EE.UU.
- Nicola FG, Nievas J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Argentina de Microbiología* 2012; 44: 290-302.
- Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *J Clin Microbiol* 2011; 49: 697-701.
- Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(12):4281.
- Pasteran F, Gonzalez LJ, Alborno E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol.* 2016 Mar; 9-640:(3)54.
- Servicio Antimicrobianos- Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos – INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

24. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083-6.
25. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, y col. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
26. Picaõ RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of doubledisk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *Clin Microbiol Infect* 2008; 46: 2028-37.
27. Brovedan M, Marchiaro P, Morán-Barrio J, Cameranesi M, Cera G, Rinaudo M, Viale A, Limansky A. Complete sequence of a *bla*<sub>NDM-1</sub>-harboring plasmid in an *Acinetobacter bereziniae* clinical strain isolated in Argentina. 2015. *Antis microb Agents Chemother*. 2015; 59 (10): 6667-9.

## First isolation of a NDM-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Rosario, Argentina

**Introduction:** the emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the hospital environment represents a major challenge for health care worldwide. Carbapenemases are carbapenem-hydrolysing enzymes that confer resistance to these “last-line” antibiotics having a direct impact on the limited treatment options available. In Argentina, carbapenemases NDM-like (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase, M $\beta$ L) have emerged in 2013. This resistance has increased in frequency and it has disseminated around the world at unprecedented levels.

**Objective:** report the first isolation of a NDM-producing *Enterobacteriaceae* in our hospital.

**Materials and methods:** the isolate analysed in this study was recovered from a bone biopsy belonging to an adult patient. The bacterial identification and antimicrobial susceptibility testings were performed using conventional methods and the automated system Vitek 2C (Biomérieux). Phenotypic and molecular techniques were carried out for the detection and characterization of carbapenemases.

**Results:** it was confirmed that the isolate, identified as *Citrobacter freundii*, produces the NDM enzyme. It showed sensitivity to aztreonam, colistin and fosfomicyn. Extended-spectrum beta-lactamases were not detected.

**Discussion:** in this study we report the first isolation of NDM-like M $\beta$ L in our institution, a multiresistant pathogen associated with a lack of effective antimicrobial treatment options. Given the high risk of these infections, an active search of mechanisms of resistance is mandatory. In addition, the establishment of accurate control measures is a must to attempt to overcome this formidable threat.

**Keywords:** carbapenemases, New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase, *Citrobacter freundii*, multiresistance.