



RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS: EL RETO DE LAS CARBAPENEMASAS.

María Jesús Zamora Escribano y Sonia M^a Aguayo Balsas

Centro Nacional de Alimentación

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Un poco de historia

2007 - La EFSA publica especificaciones para el seguimiento armonizado de bacterias zoonóticas importantes, *Salmonella* y *Campylobacter*, detectadas en animales.

2008 - Los expertos de la EFSA examinan cómo los alimentos pueden convertirse en portadores de bacterias resistentes y hace recomendaciones para prevenir y controlar la transmisión. La EFSA publica otras especificaciones para el seguimiento armonizado de la RAM en *Escherichia coli* y enterococos en animales y alimentos.

2009 - La EFSA, el ECDC, la EMA y el Comité Científico de los Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados (CCRSERI) de la Comisión Europea publican un dictamen científico conjunto sobre la RAM centrado en las infecciones que pueden transmitirse a los seres humanos a partir de animales y alimentos (es decir, enfermedades zoonóticas).

La EFSA evalúa la importancia para la salud pública del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en animales y alimentos. Llega a la conclusión de que el SARM asociado al ganado representa solo una pequeña proporción de todas las infecciones de SARM notificadas en la UE, con diferencias significativas entre los Estados miembros.

Desde 2011 - La EFSA y el ECDC han elaborado un informe conjunto sobre la RAM en bacterias zoonóticas que afectan a seres humanos, animales y productos alimenticios. Este informe anual supone una importante contribución al trabajo que se está llevando a cabo a escala europea y apoya a la Comisión Europea en el desarrollo de propuestas para combatir la RAM.

The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021

Published: 6 March 2023 | Approved: 31 January 2023

Share:   

Un poco de historia – programas de vigilancia

- Decisión de Ejecución de la Comisión (2013/652/UE) sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos
- DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2020/1729 DE LA COMISIÓN de 17 de noviembre de 2020 relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión.

ESTUDIO DE RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN ALIMENTOS, METODOLOGÍA:

Muestreo: GUÍA EFSA MUESTREO ESTRATIFICADO

Aislamiento: METODO ESPECIFICO DISEÑADO Y VALIDADO POR EL EURL- AR PARA EL ESTUDIO

Caracterización fenotípica de las resistencias: ISO 20776-1



Empezamos a trabajar:

DECISIÓN DE
EJECUCIÓN
652/2013

2013- 2020

AÑOS PARES: 2014, 2016, 2018, 2020

✓ AVES

AÑOS IMPARES: 2015, 2017, 2019

✓ PORCINO

✓ BOVINO



DECISIÓN DE
EJECUCIÓN
1729/2021

2021- 2027

Años pares: 2022, 2024, 2026

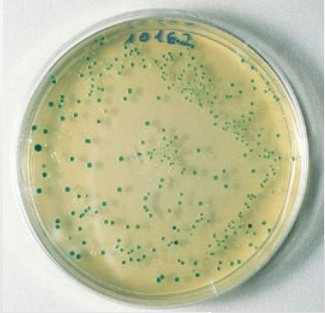
✓ Aves

*Años impares: 2021, 2023, 2025,
2027*

✓ Porcino

✓ Bovino

Estudio de resistencias antimicrobianas en alimentos, especies bacterianas:



Escherichia coli

Productor de betalactamasas de espectro ampliado (ESBL)

Productor de betalactamasas AmpC

Productor de carbapenemasas

Caracterización fenotípica de las resistencias: ISO 20776-1

Panel 1:

AMIKACINA
AMPICILINA
AZITROMICINA
CEFOTAXIMA
CEFTAZIDIMA
CLORANFENICOL
CIPROFLOXACINO
COLISTINA
GENTAMICINA
MEROPENEM
ÁCIDO NALIDÍXICO
SULFAMETOXAZOL
TETRACICLINA
TIGECICLINA
TRIMETOPRIM

Panel 2:

CEFEPIMA
CEFOTAXIMA
CEFOTAXIMA + ÁC.
CLAVULÁNICO
CEFOXITINA
CEFTAZIDIMA
CEFTAZIDIMA + ÁC.
CLAVULÁNICO
ERTAPENEM
IMIPENEM
MEROPENEM
TEMOCILINA



Antimicrobial	Class of antimicrobial	Species	Interpretative thresholds of AMR (mg/L)		Range of concentrations (mg/L) (No of wells in brackets)
			ECOFF	Clinical breakpoint	
Amikacin	Aminoglycoside	<i>Salmonella</i>	NA	> 16	4-128 (6)
		<i>E. coli</i>	> 8	> 16	
Ampicillin	Penicillin	<i>Salmonella</i>	> 8	> 8	1-32 (6)
		<i>E. coli</i>	> 8	> 8	
Azithromycin	Macrolide	<i>Salmonella</i>	NA	NA	2-64 (6)
		<i>E. coli</i>	NA	NA	
Cefotaxime	Cephalosporin	<i>Salmonella</i>	> 0.5	> 2	0.25-4 (5)
		<i>E. coli</i>	> 0.25	> 2	
Ceftazidime	Cephalosporin	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0.25-8 (6)
		<i>E. coli</i>	> 0.5	> 4	
Chloramphenicol	<u>Phenicol</u>	<i>Salmonella</i>	> 16	> 8	8-64 (4)
		<i>E. coli</i>	> 16	> 8	
Ciprofloxacin	Fluoroquinolone	<i>Salmonella</i>	> 0.06	> 0.06	0.015-8 (10)
		<i>E. coli</i>	> 0.06	> 0.5	
<u>Colistin</u>	<u>Polymyxin</u>	<i>Salmonella</i>	NA	> 2	1-16 (5)
		<i>E. coli</i>	> 2	> 2	
Gentamicin	Aminoglycoside	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0.5-16 (6)
		<i>E. coli</i>	> 2	> 4	
<u>Meropenem</u>	<u>Carbapenem</u>	<i>Salmonella</i>	> 0.125	> 8	0.03-16 (10)
		<i>E. coli</i>	> 0.125	> 8	
<u>Nalidixic acid</u>	Quinolone	<i>Salmonella</i>	> 8	NA	4-64 (5)
		<i>E. coli</i>	> 8	NA	
Sulfamethoxazole	Folate pathway antagonist	<i>Salmonella</i>	NA	NA	8-512 (7)
		<i>E. coli</i>	> 64	NA	
Tetracycline	Tetracycline	<i>Salmonella</i>	> 8	NA	2-32 (5)
		<i>E. coli</i>	> 8	NA	
<u>Tigecycline</u>	<u>Glycylcycline</u>	<i>Salmonella</i>	NA	NA	0.25-8 (6)
		<i>E. coli</i>	> 0.5	> 0.5	
Trimethoprim	Folate pathway antagonist	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0.25-16 (7)
		<i>E. coli</i>	> 2	> 4	

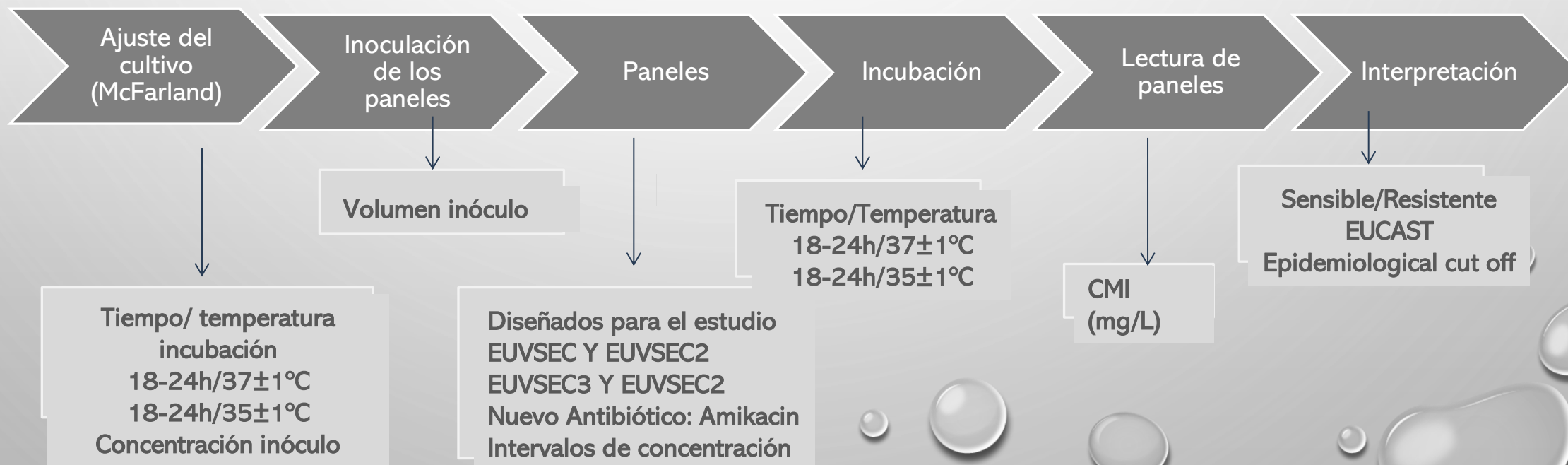
NA: not available.

Antimicrobial	Class of antimicrobial	Species	Interpretative thresholds of AMR (mg/L)		Range of concentrations (mg/L) (No of wells in brackets)
			ECOFF	Clinical breakpoint	
<u>Cefepime</u>	Cephalosporin	<i>Salmonella</i>	NA	> 4	0.06-32 (10)
		<i>E. coli</i>	> 0.125	> 4	
Cefotaxime	Cephalosporin	<i>Salmonella</i>	> 0.5	> 2	0.25-64 (9)
		<i>E. coli</i>	> 0.25	> 2	
Cefotaxime + clavulanic acid	Cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination	<i>Salmonella</i>	NA	NA	0.06-64 (11)
		<i>E. coli</i>	> 0.25	NA	
<u>Cefoxitin</u>	<u>Cephamycin</u>	<i>Salmonella</i>	> 8	NA	0.5-64 (8)
		<i>E. coli</i>	> 8	NA	
Ceftazidime	Cephalosporin	<i>Salmonella</i>	> 2	> 4	0.25-128 (10)
		<i>E. coli</i>	> 0.5	> 4	
Ceftazidime + clavulanic acid	Cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination	<i>Salmonella</i>	NA	NA	0.125-128 (11)
		<i>E. coli</i>	> 0.5	NA	
<u>Ertapenem</u>	<u>Carbapenem</u>	<i>Salmonella</i>	NA	> 0.5	0.015-2 (8)
		<i>E. coli</i>	NA	> 0.5	
Imipenem	<u>Carbapenem</u>	<i>Salmonella</i>	> 1	> 4	0.12-16 (8)
		<i>E. coli</i>	> 0.5	> 4	
<u>Meropenem</u>	<u>Carbapenem</u>	<i>Salmonella</i>	> 0.125	> 8	0.03-16 (10)
		<i>E. coli</i>	> 0.125	> 8	
<u>Temocillin</u>	Penicillin	<i>Salmonella</i>	> 16	NA	0.5-128 (9)
		<i>E. coli</i>	> 16	NA	

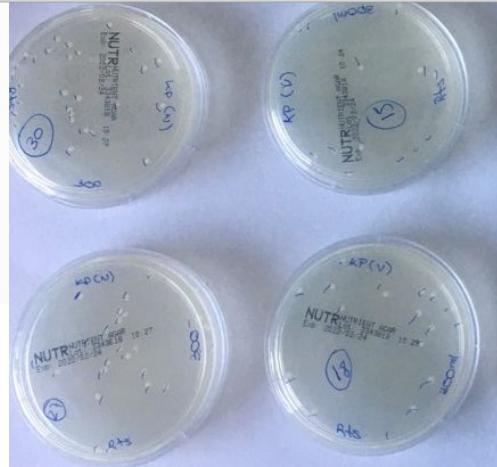
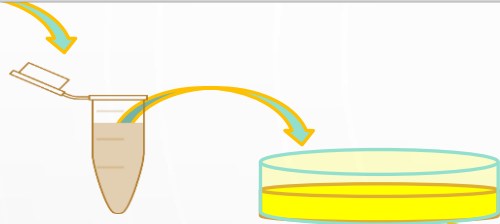
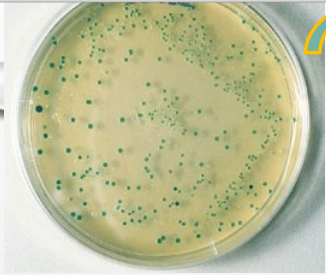
Estudio de resistencias antimicrobianas en alimentos, metodología:

Aislamiento: METODO ESPECIFICO DISEÑADO Y VALIDADO POR EL EURL-AR PARA EL ESTUDIO

Caracterización fenotípica de las resistencias: ISO 20776-1



Caracterización fenotípica de las resistencias: ISO 20776-1



3 – 5 colonias
morfológicamente
similares de un cultivo
puro de 18-24 horas



Agua destilada estéril ($1 - 2 \times 10^8$ ufc/ml)

Patrón McFarland 0,5

Tubo de caldo Müller Hinton (1×10^6 ufc/ml)

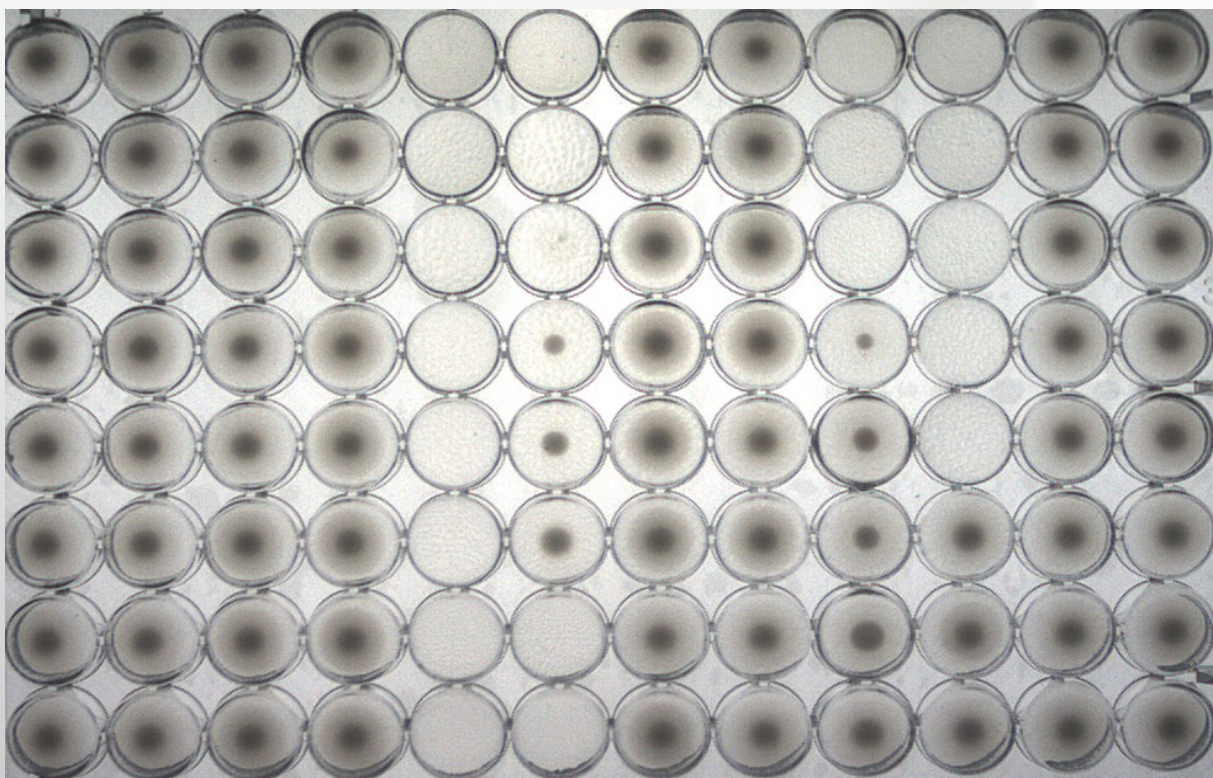


Tiempo/Temperatura
18-24h/ $35 \pm 1^\circ\text{C}$

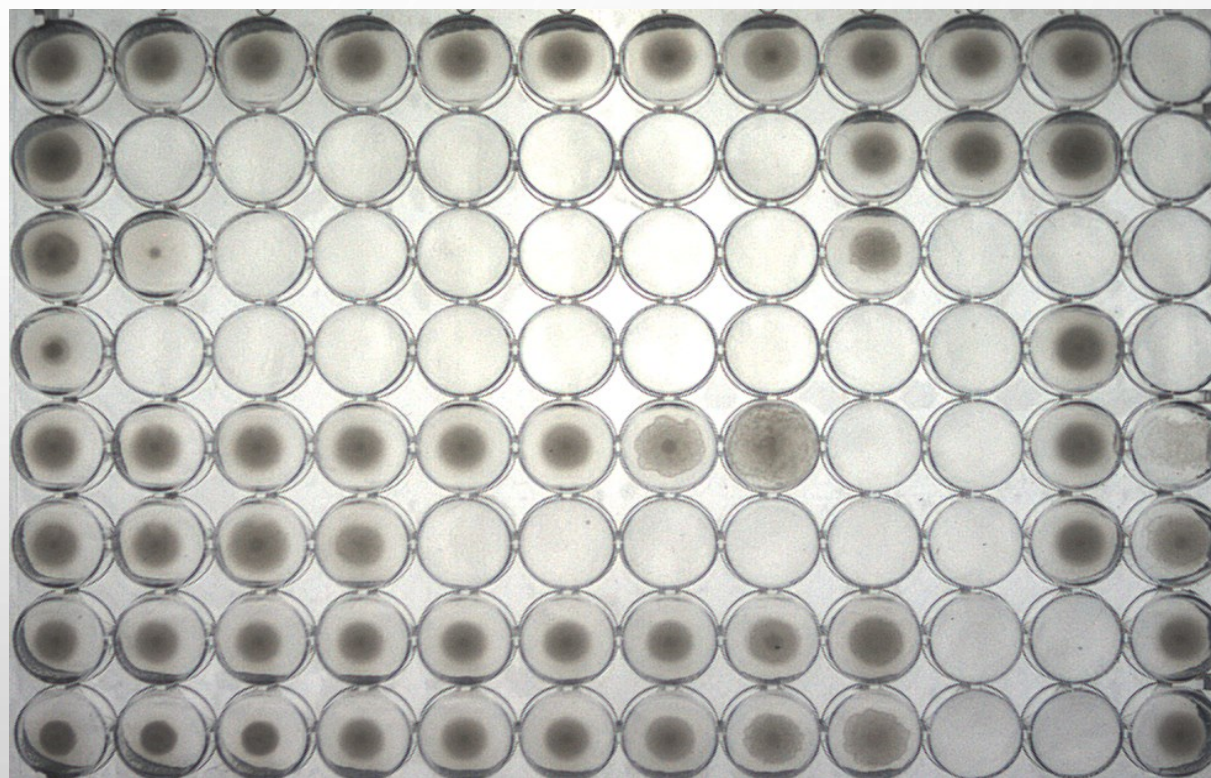


Caracterización fenotípica de las resistencias: Determinación de la CMI mg/L

Panel 1: Varios grupos antibacterianos



Panel 2: Antibióticos b-lactámicos y carbapenems



Caracterización fenotípica de las resistencias: Determinación de la CMI mg/L

Clave

- Sensible
- Intermedio
- Resistente
- No hay interpretación

Vizion Review Stored Image - UVSEC2, Sec. 1 (BA-EC-150875, A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FOX 0.5	FOX 1	FOX 2	FOX 4	FOX 8	FOX 16	FOX 32	FOX 64	FOT 0.25	FOT 0.5	FOT 1	TEMOCI 128
B	ERTAPE 0.015	ERTAPE 0.03	ERTAPE 0.06	ERTAPE 0.12	ERTAPE 0.25	ERTAPE 0.5	ERTAPE 1	ERTAPE 2	FOT 2	FOT 4	FOT 8	TEMOCI 64
C	IMI 0.12	IMI 0.25	IMI 0.5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	FOT 16	FOT 32	FOT 64	TEMOCI 32
D	MERO 0.03	MERO 0.06	MERO 0.12	MERO 0.25	MERO 0.5	MERO 1	MERO 2	MERO 4	MERO 8	MERO 16	TEMOCI 2	TEMOCI 16
E	TAZ 0.25	TAZ 0.5	TAZ 1	TAZ 2	TAZ 4	TAZ 8	TAZ 16	TAZ 32	TAZ 64	TAZ 128	TEMOCI 1	TEMOCI 8
F	FEP 0.06	FEP 0.12	FEP 0.25	FEP 0.5	FEP 1	FEP 2	FEP 4	FEP 8	FEP 16	FEP 32	TEMOCI 0.5	TEMOCI 4
G	TAXCLA 0.06	TAXCLA 0.12	TAXCLA 0.25	TAXCLA 0.5	TAXCLA 1	TAXCLA 2	TAXCLA 4	TAXCLA 8	TAXCLA 16	TAXCLA 32	TAXCLA 64	POS
H	TAZCLA 0.12	TAZCLA 0.25	TAZCLA 0.5	TAZCLA 1	TAZCLA 2	TAZCLA 4	TAZCLA 8	TAZCLA 16	TAZCLA 32	TAZCLA 64	TAZCLA 128	POS

Caracterización fenotípica de las resistencias: Interpretación

SUSCEPTIBLE

CTX - CAZ – FOX- MEM ≤ ECOFF

1. ESBL-Phenotype

- CTX or CAZ > 1 mg/L AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX ≤ 8 mg/L AND
- SYN CTX/CLA and/or CAZ/CLA

2. AmpC-Phenotype

- CTX or CAZ > 1 mg/L AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX > 8 mg/L AND
- NO SYN CTX/CLA nor CAZ/CLA
- (Not excluded presence of ESBLs)

3. ESBL + AmpC-Phenotype

- CTX or CAZ > 1 mg/L AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX > 8 mg/L AND
- SYN CTX/CLA and/or CAZ/CLA

4. Carbapenemase-Phenotype

- MEM > 0.12 mg/L
- Needs confirmation
- (Not excluded presence of ESBLs or AmpC)

5. Other Phenotypes

- 1) IF CTX or CAZ > 1 mg/L AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
 - FOX ≤ 8 mg/L AND
 - NO SYN CTX/CLA nor CAZ/CLA
 - Not excluded CPs (consult EURL)

- 3) IF CTX and CAZ ≤ 1 mg/L AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
 - FOX > 8 mg/L
- *cAmpCs could be included here

- 2) IF CTX and/or CAZ ≤ 1 mg/L AND > ECOFF AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
 - FOX ≤ 8 mg/L AND

- 4) IF MEM ≤ 0.12 mg/L BUT
- ETP > ECOFF AND/OR
 - IMI > ECOFF
 - Not excluded CPs, needs confirmation (consult EURL)

- 5) Any other combinations not described in previous boxes (consult EURL)

Pero ¿qué pasa a partir de la modificación de la Decisión?

- Decisión de Ejecución de la Comisión (2013/652/UE) sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos
- DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2020/1729 DE LA COMISIÓN de 17 de noviembre de 2020 relativa a la vigilancia y la notificación de la resistencia a los antimicrobianos de las bacterias zoonóticas y comensales y por la que se deroga la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión.

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems¹

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)^{2,3}

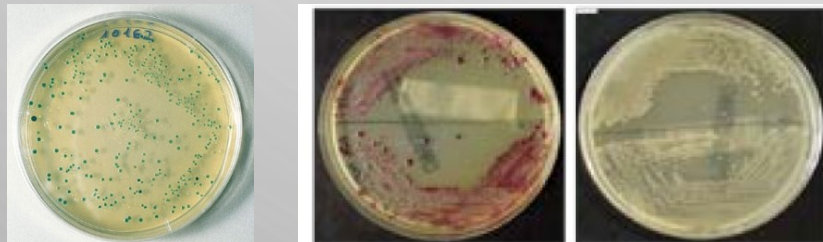
European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

Pero ¿qué pasa a partir de la modificación de la Decisión?

Muestreo: GUÍA EFSA MUESTREO ESTRATIFICADO

Aislamiento: MODIFICACIÓN DEL METODO - VALIDADO POR EL EURL- AR

Caracterización fenotípica de las resistencias: ISO 20776-1



Pero ¿qué pasa a partir de la modificación de la Decisión?

Vigilancia de microorganismos productores de ESBL, AmpC y carbapenemasas:

- Vigilancia rutinario en *Salmonella*, *E. coli*
- Vigilancia **específica** de *E. coli* productoras de ESBL/AmpC/carbapenemasas
- Vigilancia **específica** de *E. coli* productoras de



[Isolation of ESBL, ampC and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat \(version 8, April 2024\)](#)

(PDF document, 350 KB)



[Validation of selective macConkey agar plates supplemented with 1 mg/L cefotaxime for monitoring of ESBL and ampC-producing *E. coli* in meat and animals - November 2017](#)

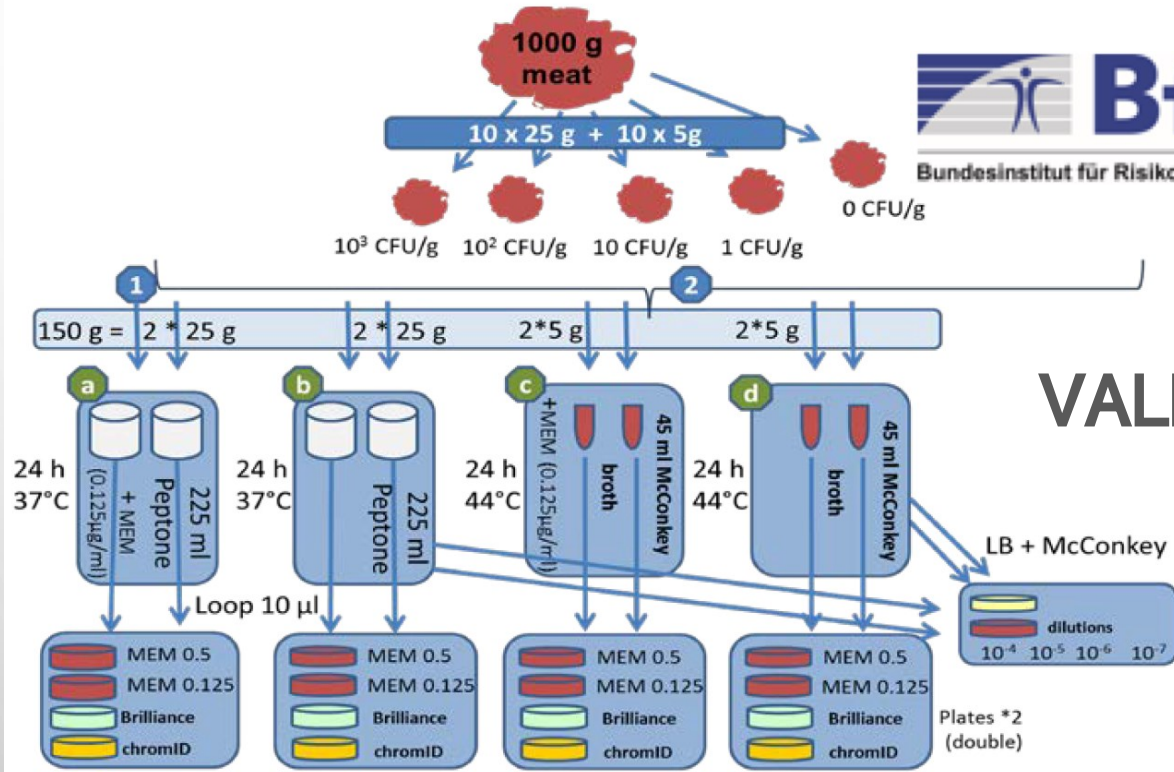
(PDF document, 80 KB)



[Validation of selective and indicative agar plates for monitoring of carbapenemase-producing *E. coli*](#)

(PDF document, 50 KB)

Aislamiento: MODIFICACIÓN DEL METODO



VALIDADO

Pre-enriquecimiento
 Agua de peptona
 37°C

Agar selectivo
 (mejor ChromIDCarba+ChromOXA-48)
 37°C

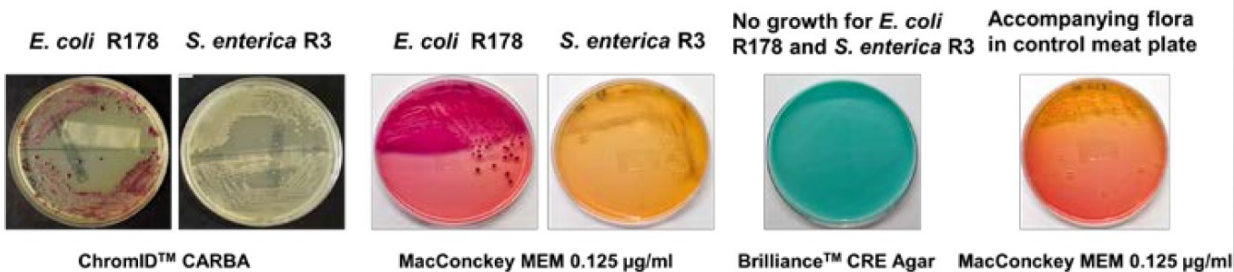


Figure 2: Morphology of the different bacteria in the selected media for the detection

Aislamiento: VALIDACIÓN DEL METODO

A European multicenter evaluation study to investigate the performance on commercially available selective agar plates for the carbapenemase producing *Enterobacterales*

Cindy Dierikx ^a, Stefan Börjesson ^{b, c}, Agnès Perrin-Guyomard ^d, Marisa Haenni Divon ^e, Hanna Karin Ilag ^f, Sophie A. Granier ^d, Annette Hammerum ^g, Jette Sej Randall ^j, Muna F. Anjum ^j, Aleksandra Smialowska ^k, Alessia Franco ^l, Kees Velders ^m, One Health EJP IMPART project ¹



> Front Microbiol. 2020 Aug 11;11:1678. doi: 10.3389/fmicb.2020.01678. eCollection 2020.

ChromID[®] CARBA Agar Fails to Detect Carbapenem-Resistant *E. coli*



nann¹⁰,
14,

LABORATORY PROTOCOL

Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat

April 2024
Version 8

Version 8 reviewed and updated by: Rene Hendriksen

Authors of the document: Henrik Hasman, Yvonne Agersø, Rene Hendriksen, Lina M. Cavaco (DTU Food) and Beatriz Guerra-Roman (external expert)

- Algunas diferencias según la metodología de aislamiento.
- No se detectó *E. coli* _{bla^{VIM-1}} utilizando el método de aislamiento con meropenem.
- Se puede seguir utilizando el método de aislamiento con meropenem, pero podría fallar en la detección de algunos aislamientos con muy baja resistencia a meropenem.

key de la casa con cefotaxima y

uimiento de ARM, sabiendo que

Pero teniendo en cuenta que:

Tenga en cuenta que el crecimiento bacteriano en las placas de agar indicativas y selectivas para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas no significa necesariamente que las bacterias en crecimiento produzcan realmente una enzima carbapenemasa. Esto se debe a que otros mecanismos moleculares, como la sobreproducción de enzimas AmpC en combinación con deficiencias de porinas, pueden provocar una menor susceptibilidad a uno o más de los carbapenémicos. Lea la opinión científica sobre la resistencia a los carbapenémicos en los ecosistemas de animales destinados al consumo humano en la sección de referencias a continuación para obtener más detalles.

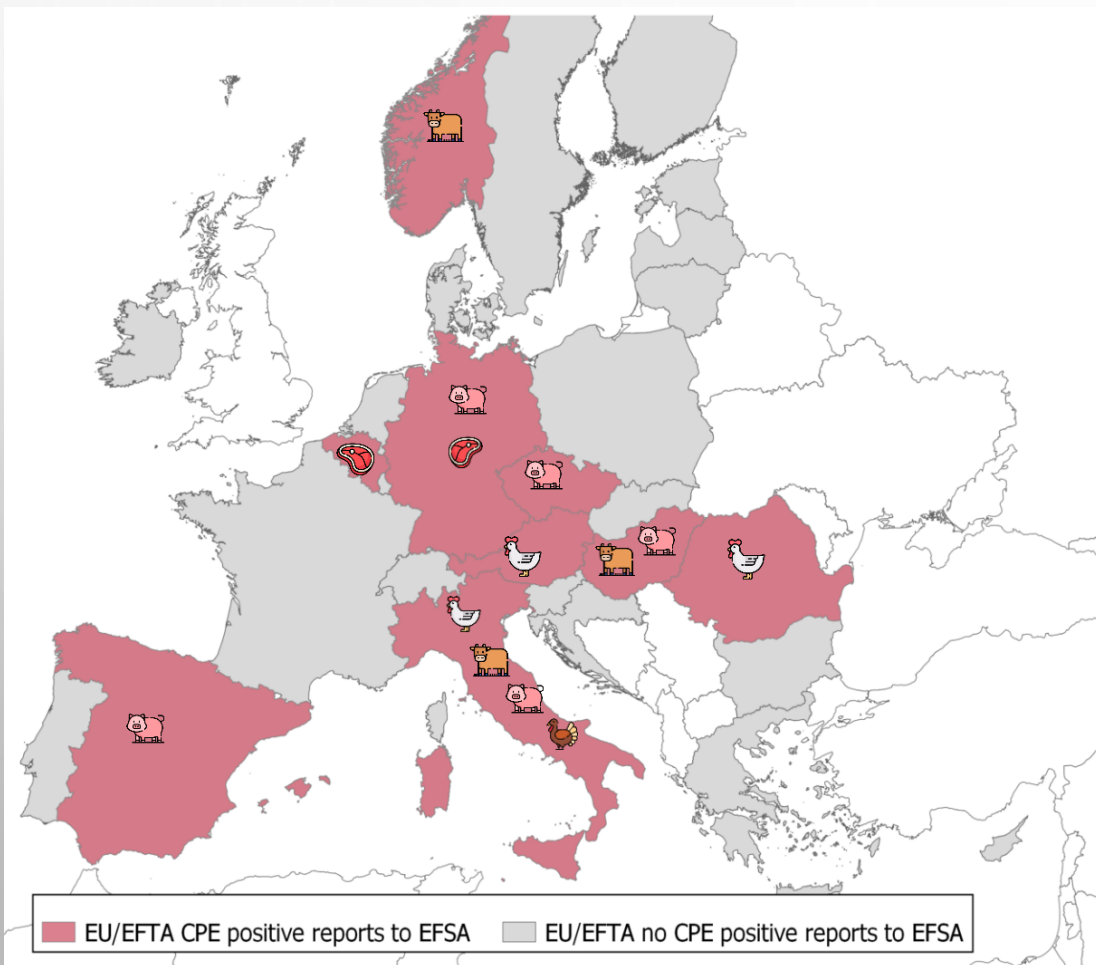


[Validation of selective and indicative agar plates for monitoring of carbapenemase-producing *E. coli*](#)

(PDF document, 50 KB)

¿Qué está pasando?

Ocurrencia de *E.coli* productor de carbapenemasas en la cadena alimentaria / UE - 2015 - 2023:



Dispersión de aislados de *E.coli*_{bla^{NDM-5}} rápida y a gran escala geográfica. Fte. ECDC report

- **AT:** VIM-1 in broilers 2020, 2022
- **BE:** VIM-1 in minced pork, 2020
- **CZ:** 1) NDM-5 pigs; 2) another report in pigs. 1) 2021; 2) 2023
- **DE:** 1) VIM-1 in pigs; 2) VIM-1 pig meat; OXA-48, GES-5 pigs 1) 2015, 2017; 2) 2019
- **HU:** NDM-5 pigs, cattle 2021
- **IT:** 1) OXA-181 bovines, pigs; OXA-48 pigs, NDM-5 calf; 2) VIM-1 broilers, OXA-181 turkeys; 3) OXA-181 pigs, bovines 1) 2021; 2) 2022; 3) 2023
- **NO:** NDM-5 cattle 2023
- **RO:** OXA-162, broilers, 2016
- **ES:** OXA-48 pigs 2021, 2023



Pero teniendo en cuenta que:



En humanos, en varios EM, al analizar los datos de aislamientos clínicos (EARSS-Net), las prevalencias más altas se encuentran en *K.pneumoniae* y *A. baumannii*.



- En el caso de *Salmonella* (sector humano/productor de alimentos) y *E. coli* comensal (sector veterinario), la prevalencia es muy baja, pero en el sector productor de alimentos, incluido su entorno, está aumentando.



- También se encuentran en el entorno europeo, pero no hay un **seguimiento armonizado en curso**.



- Necesitamos continuar con su vigilancia, utilizando métodos armonizados, y proceder con **estudios específicos** en algunos sectores/bacterias donde hay menos información disponible o no hay información disponible.

Data generation on Carbapenemase-producing Enterobacterales (CPEs) in the food chain in the EU/EFSA.

ToR 2. Trabajo coordinado por el EURL AR (DTU Food) con los EEMM participantes con el fin de generar nuevos datos (más allá de los ya recopilados a través del monitoreo actual de la RAM) a través de diferentes grupos de trabajo:

WG1.

Diseñar un protocolo de alta sensibilidad para el aislamiento y/o detección y caracterización de *E. coli* productoras de carbapenemasas (y otras enterobacterias a determinar) para su evaluación, validación y futura implementación en estudios específicos dentro de la cadena alimentaria y/o el medio ambiente.

WG2.

Realizar investigaciones epidemiológicas de *E.coli* productoras de carbapenemasas y otras especies de enterobacterias a determinar al inicio del proyecto, utilizando muestreos y análisis más específicos, con el objetivo de identificar posibles fuentes y vías de diseminación.

WG3.

Ampliar el análisis genético (clonalidad, plásmidos, IS, Tn, ICE) de los aislamientos de *E. coli* disponibles a partir del programa de vigilancia actual y de los aislamientos que se vayan obteniendo de *E.coli* productor de carbapenemasas y otras enterobacterias.

Investigar la aparición de resistencia a múltiples fármacos en estos aislamientos, que podría contribuir a la coselección mediante el uso de otras clases de antimicrobianos/metales.

WG4.

Realizar análisis genómicos comparativos de los aislamientos recopilados en este proyecto de diferentes países/regiones/especies animales, incluidos los aislamientos de diferentes fuentes, como humanos y mascotas One Health

WG2.

Realizar investigaciones epidemiológicas de *E. coli* productoras de carbapenemasas y otras especies de enterobacterias a determinar al inicio del proyecto, utilizando muestreos y análisis más específicos, con el objetivo de identificar posibles fuentes y vías de diseminación.



Diseño del nuevo estudio:

- Muestreo, método de aislamiento, pruebas de identificación y confirmación...
- Planificar la toma de muestras,
- Implementar y evaluar los nuevos métodos de aislamiento, identificación de especies bacterianas,
- Confirmar la susceptibilidad/resistencia a carbapenémicos: ensayo AST, confirmación del gen por PCR/WGS
- Análisis de los resultados



Estos resultados e información recopilada servirán de base para el desarrollo de los objetivos del WG2: estudios de epidemiología molecular de las enterobacterias productoras de carbapenemasas, incluidas en el estudio, en la cadena alimentaria.

ENFOQUE ONE HEALTH

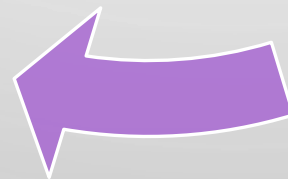
Clínica humana

Animales –
producción
primaria



Medioambiente

Alimentos



SCIENTIFIC OPINION



ADOPTED: 29 April 2021
doi: 10.2903/j.efsa.2021.6651

Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ),
Konstantinos Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Álvarez-Ordóñez, Declan Bolton,
Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly, Robert Davies, Alessandra De Cesare, Lieve Herman,
Friederike Hilbert, Roland Lindqvist, Maarten Nauta, Giuseppe Ru, Marion Simmons,

¡MUCHAS GRACIAS!

50

50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

*Cuidando de ti
desde el laboratorio*



Centro
Nacional de
Alimentación