

Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae

Jorge Anibal Reyes-Chacón^{1,3,5,*}, José E. Villacís-Acuña^{1,2}, Santiago Chicaiza-Alomoto³, Carolina Satán-Salazar¹, Stephanie Salas-Iglesias¹, Liliana Ushiña-Cueva¹, Fernando Villavicencio-Zambrano¹, Rafael Tamayo-Trujillo¹, Ruth Rivera-Villalba¹, Germán Esparza -Sánchez⁴, Santiago Escalante-Vanoni²

Resumen

Objetivo: Evaluar al método de inactivación del carbapenémico (MIC*) frente a técnicas como el Test de Hodge modificado (THM), ácido 3-aminofenilborónico (APB) y la reacción en cadena de la polimerasa en enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) tipo KPC.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 88 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.coli*, *S. marcescens*, *C. freundii* sensibles y 91 resistentes a los carbapenémicos. El APB y el método MIC* se realizaron siguiendo las publicaciones originales. El THM se realizó de acuerdo al CLSI 100S Edición 26-2016. El gen blaKPC se identificó por multiplex PCR.

Resultados: El MIC* en EPC tipo KPC presentó una sensibilidad/especificidad cercana al 100% y kappa de 1 comparado con la PCR; se observó la ausencia de halo en todas los aislados EPC tipo KPC a diferencia de los aislados sensibles a los carbapenémicos que presentaron halo > 19mm. Se observó el 3 % de resultados falsos positivos y el 5 % de falsos negativos en THM y ABP respectivamente.

Discusión y conclusiones: El MIC* y la PCR demuestran superioridad al THM y ABP para identificar carbapenemasas tipo KPC en EPC. Se recomienda su uso de forma rutinaria dentro del algoritmo para la contención de infecciones por este tipo de patógenos.

Palabras clave: carbapenemasa, Enterobacteria, reacción en cadena de la polimerasa, inactivación.

Carbapenem inactivation, an alternative method to detect carbapenemase type KPC in Enterobacteriaceae

Abstract

Objective: To compare the carbapenem inactivation method (CIM *) with the Modified Hodge Test (MHT), the acid 3-aminophenylboronic test (APB) and the polymerase chain reaction (PCR) detection of the blaKPC gene for the identification of KPC carbapenemase producing Enterobacteriaceae (ECP).

Materials and Methods: We selected 88 susceptible and 91 carbapenems resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*. We performed APB and CIM* according to previously published methods and the MHT according to CLSI 100S Edition 26-2016. The blaKPC gene was identified by PCR multiplex.

Results: The CIM* had a sensitivity and specificity close to 100% and a kappa score of 1 compared with gold standard PCR. The absence of zone diameter was observed in all isolated KPC producers, unlike in isolates susceptible to carbapenems, where a zone diameter > 19mm was observed. Three percent of false positive and five percent of false negative was observed in THM and ABP respectively.

Discussion and conclusions: The CIM* and the PCR were better than MHT and ABP at identifying carbapenemasas in ECP. We recommend the routine use of the CIM* within the algorithm for ECP infection control.

Keywords: carbapenemase, Enterobacteriaceae, polymerase chain reaction, inactivation.

Introducción

La emergencia de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial, con un alto impacto tanto en la morbilidad como en el incremento de los costos en la

atención relacionados con estancias hospitalarias prolongadas y uso de antibióticos de amplio espectro^{1,2}. La detección y diferenciación de las ERC productoras de carbapenemasas (EPC) facilita la implementación de precauciones de contacto y permite un abordaje terapéutico adecuado³.

1 Centro de Referencia Nacional de Resistencia los Antimicrobianos, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez"

2 Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador

3 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

4 Pontificia Universidad Javeriana Colombia

5 Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito.

* Autor para correspondencia.

Cód. Postal 170403 - Correo electrónico: jorgereyes83@gmail.com

Teléfono (593)99451824

Recibido: 10/10/2016; Aceptado: 03/02/2017

Cómo citar este artículo: J.A. Reyes-Chacón, et al. Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. Infectio 2017; 21(4): 251-254

Con el propósito de detectar las ERC y optimizar el uso de los carbapenémicos a través de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD), el Instituto de Estándares Clínicos y de laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) disminuyó los puntos de corte en 2010, y recomendó realizar pruebas fenotípicas confirmatorias como el test de Hodge modificado (THM) para el control de la diseminación de las carbapenemasas. En el año 2015, la versión M100-S25 de los estándares para pruebas de susceptibilidad, incorporaron el test bioquímico Carba NP para la detección de carbapenemasas, siendo la primera vez que se recomienda su aplicación además de Enterobacteriaceae en no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*⁴. Los métodos de detección basados en el uso de discos con inhibidores como ácido fenilborónico (APB) presentan sensibilidad y especificidad cercanas al 100% en la detección de carbapenemasas clase A de Ambler 5, grupo funcional 2b. Sin embargo, se han reportado resultados falsos positivos con cepas productoras de beta-lactamasa tipo AmpC como *Enterobacter spp* y *Serratia spp*. A pesar de que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sigue siendo la metodología más sensible y específica para la determinación de este tipo de enzimas, su acceso a los laboratorios de rutina no se encuentra masificado debido a los costos y el entrenamiento requerido para su implementación.

Recientemente Zwaluw y col. (2015) y Melano R. y col. (2016), han reportado buenos resultados al evaluar un nuevo método de inactivación de carbapenémico (MIC*) como alternativa costo efectiva para la detección de carbapenemasas en EPC 6,7 al compararlo con métodos colorimétricos y la PCR. Este método está basado en la capacidad de la enzima carbapenemasa de hidrolizar la concentración de 10µg de Meropenem (MEM) contenida en un sensidisco de papel de filtro mediante la elución del mismo en agua destilada estéril. En el presente estudio se pretende evaluar al MIC* en EPC tipo KPC frente a técnicas como el APB, THM y la PCR.

Metodología

Aislados clínicos: Se tomaron 179 aislados procedentes de muestras clínicas de diferentes instituciones de salud y que se encuentran dentro del sistema de vigilancia de resistencia bacteriana del Ecuador. 88 cepas entre *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.coli*, *S. marcescens*, *C. freundii* con CMI \leq 1 µg/mL para imipenem (IMI) y meropenem (MER) y negativas para el gen *blaKPC* por PCR y 91 cepas de las mismas especies con CMI \geq 4 µg/mL para imipenem (IMI) y meropenem (MER) y positivas para *blaKPC* por reacción en cadena de la polimerasa. (Tabla 1) Todas las cepas fueron debidamente caracterizadas mediante el Vitek2 compact® (BioMerieux Inc.).

Pruebas moleculares: En todas las cepas sensibles y resistentes a los carbapenémicos se buscó la amplificación del gen *blaKPC* por medio de una PCR múltiple siguiendo los protocolos previamente reportados por Poirel y col. 8 e implementados en el sistema de vigilancia de resistencia antimicrobiana del Ecuador.

Ensayos de susceptibilidad y pruebas fenotípicas: Todas las cepas fueron sometidas a Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por microdilución a los carbapenémicos tomando como referencia normas CLSI 2016 utilizando Vitek2 (BioMerieux Inc.). Discos de IMI 10ug (Oxoid) fueron utilizados para todas las pruebas fenotípicas realizados agar Mueller Hinton (Oxoid). Para el test de Hodge modificado (THM) se siguió el protocolo recomendado por el CLSI M100S-26th. Para la prueba de la sinergia de carbapenémicos con ácido 3-aminofenilborónico (APB), se aproximaron a una distancia de 20-mm los discos de Imipenem (IMI) y de papel filtro sin antibiótico impregnados con 300µg de (APB) (Sigma, Chemicals) siguiendo las recomendaciones de Pasterán y col⁵.

Método de inactivación de los carbapenémicos (MIC*).

Se siguió el protocolo descrito por Zwalow y col. 2015. Con un asa de 10 µL se tomó el aislado previamente cultivado en agar Mueller-Hinton e incubadas durante 24 horas a 35°C y se resuspendió en 400 µL agua destilada estéril; de forma inmediata se sumergió un disco de Meropenem (MEM) 10µg (Oxoid®) dentro de la suspensión y se incubó durante 2 horas a 35°C. Luego se retiró el disco con pinza estéril para ser colocado sobre una placa de agar Mueller-Hinton previamente sembrada de forma masiva con la cepa *E.coli* ATCC 25922 a una turbidez de 0,5 McFarland. Se utilizaron *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 como controles positivo y negativo respectivamente. Se incubó a 35°C durante 6 horas. La interpretación se basó en la presencia (negativo para carbapenemasas) o ausencia de halo de inhibición (positivo para carbapenemasas)

Resultados

El 100% de los aislamientos incluidos en el estudio, tuvieron una relación directa entre la presencia o ausencia del gen *blaKPC* con las pruebas de susceptibilidad a los carbapenémicos. Los resultados del THM mostraron falsos positivos, *K. pneumoniae* (n=2) y *S. marcescens* (n=1), y falsos negativos *E. coli* (n=1) y *S. marcescens* (n=1). Resultados similares fueron encontrados con el APB y no se observaron resultados falsos positivos o negativos en el MIC* en EPC (Tabla 1). El MIC* demostró una concordancia kappa de 1 con las pruebas moleculares y con sensibilidad - especificidad que supera el 99% (Tablas 1 y 2).

El punto de corte utilizado (>19mm) para interpretar una prueba como positiva o negativa fue capaz de separar 100% las ERC-PC *blaKPC* (+) de aquellas *blaKPC* (-), se notó ausencia de halo en todas las cepas *blaKPC* (+) (Figura 1 y 2)

Discusión

Enterobacterias productoras de carbapenemasas y en especial aquellas que producen carbapenemasas tipo KPC son cada vez más frecuentes en muchos países a nivel mundial^{9,10}. El hallazgo de un paciente con infecciones producidas por EPC reduce las opciones terapéuticas y promueve el inicio de combinaciones de antibióticos, algunos de alta toxicidad y la aplicación de medidas de prevención y contención, por lo cual su

Tabla 1. Comparación de pruebas moleculares y fenotípicas en ERC-PC tipo KPC.

Especie	N	CMI ug/mL		blaKPC	THM + N (%)	APB + N (%)	MIC* + N (%)
		MEM	IMI				
Susceptible							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	≤ 1	≤ 1	-	2/63 (3)	3/63 (5)	0/63
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	≤ 1	≤ 1	-	0/2	2/2	0/2
<i>Escherichia coli</i>	14	≤ 1	≤ 1	-	0/14	0/14	0/14
<i>Serratia marcescens</i>	8	≤ 1	≤ 1	-	1/8	0/8	0/8
<i>Citrobacter freundii</i>	1	≤ 1	≤ 1	-	0/1	0/1	0/1
Resistente							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	≥ 4	≥ 4	+	64/64	64/64	64/64
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	≥ 4	≥ 4	+	6/6	6/6	6/6
<i>Escherichia coli</i>	13	≥ 4	≥ 4	+	12/13 (93)	13/13	13/13
<i>Serratia marcescens</i>	7	≥ 4	≥ 4	+	6/7 (93)	7/7	7/7
<i>Citrobacter freundii</i>	1	≥ 4	≥ 4	+	1/1	1/1	1/1

APB: ácido fenilborónico, CMI Concentración mínima inhibitoria. MIC*: método de Inactivación de carbapenémicos THM: Test de Hodge modificado

Tabla 2. Rendimiento de las pruebas fenotípicas en ERC-PC tipo KPC

	THM	APB	MIC*
Sensibilidad	98%	>99%	>99%
Especificidad	97%	94%	>99%
VPP	97%	95%	>99%
VPN	98%	>99%	>99%

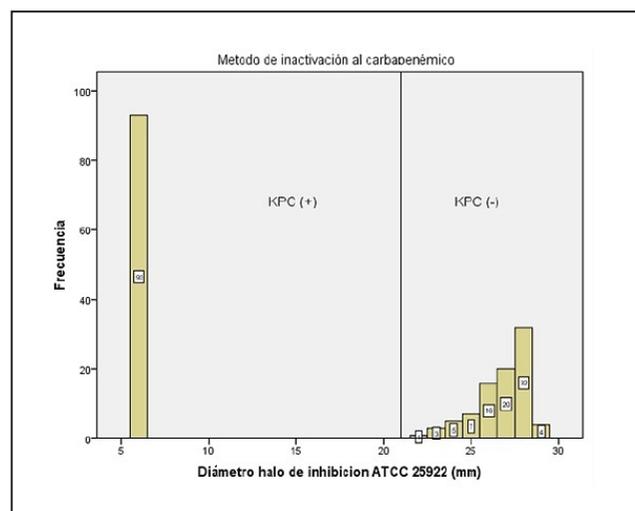
APB: ácido fenilborónico, MIC*: método de inactivación de carbapenémicos, THM Test de Hodge modificado, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

sospecha y confirmación son fundamentales para reducir la mortalidad y la expansión de estos microorganismos¹².

La descripción del MIC* por Zwaluw y col. (2015) para la detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos, ha despertado mucho interés por la serie de ventajas que presenta, como reactivos de fácil disponibilidad en laboratorios de baja complejidad, su bajo costo y su alta reproducibilidad⁶. En nuestro estudio se demostró un factor adicional en EPC tipo KPC, que fue la alta concordancia entre el MIC* y la PCR, esta última considerada como el "gold standard", pero que presenta inconvenientes como su costo elevado, la necesidad de equipos y reactivos de difícil acceso especialmente en los laboratorios asistenciales de países en vías de desarrollo¹¹. La sospecha de EPC se realiza en las pruebas de susceptibilidad rutinarias, observando la CMI a los carbapenémicos por encima de los puntos de corte establecidos por CLSI o los puntos de corte epidemiológicos establecidos por EUCAST, junto con la presencia de multi o inclusive pan resistencia a los antibióticos. De forma inmediata es necesaria la intervención mediante medidas de contención epidemiológica y sumando evidencia que se trate de una carbapenemasa¹³. Para la confirmación de que han demostrado ser muy útiles en la detección de serín - carbapenemasas, sin embargo en nuestro estudio como en otros reportes, la presencia de resultados falsos positivos producidos por la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o cefalosporinasas

tipo AmpC con impermeabilidad continúan siendo un inconveniente^{16,17,5}. Por su parte el MIC*, en nuestro estudio no se demostró este tipo de resultados, presentando una sensibilidad y especificidad muy cercana al 100% para detectar carbapenemasas *blaKPC* en enterobacterias. Ensayos colorimétricos como el Carba NP, ya sea de cultivo puro 18 o directamente de hemocultivos¹⁹ han demostrado buenos resultados con sensibilidad superior al 90% y recomendados en enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Sin embargo también presentan varias dificultades como la detección de carbapenemasas tipo OXA-48 20 junto con su accesibilidad al método y los costos en ciertos países en vías de desarrollo.

La interpretación de los resultados del MIC* es un tema pendiente por resolver, se demostró que el 100% de las EPC *blaKPC* (+) no presentaban halo de inhibición, mientras que las cepas *blaKPC* (-) presentan halos superiores a los 20mm, resultados

**Figura 1.**

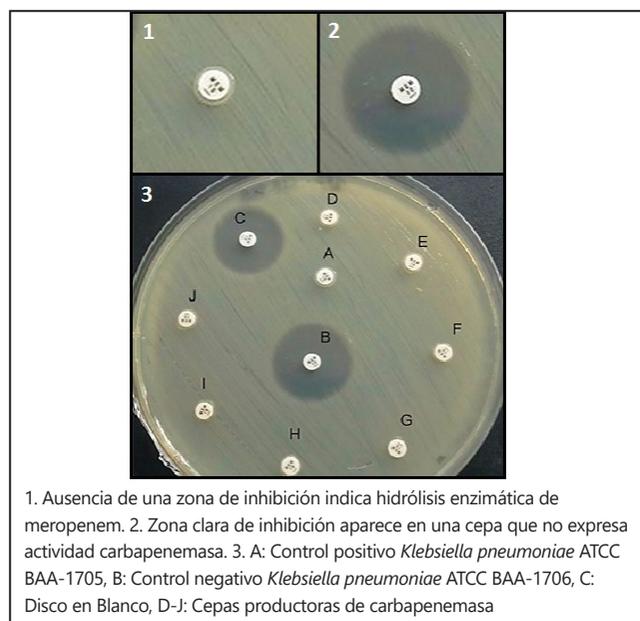


Figura 2. Halos de inhibición en el MIC*

que concuerdan con los reportados por Tijet 2016; no se evidenciaron resultados entre 6-20mm, sin embargo de ocurrir este evento se recomienda el uso de otra técnica disponible.

En conclusión, el test MIC* es una técnica que puede reemplazar al THM y APB empleados para determinar la presencia de carbapenemasas tipo KPC en EPC, por su bajo costo, disponibilidad de reactivo y su rendimiento frente a pruebas moleculares.

Declaración de conflicto de interés

No existen conflictos de interés en los participantes de la presente publicación

Financiamiento

Fondos públicos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública "Leopoldo Izquieta Pérez"

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos que permitan la identificación de los pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de los pacientes.

Autoría/colaboradores. Todos los autores participaron en el diseño del estudio, adquisición, análisis e interpretación de resultados, así como en la redacción del manuscrito y aprobaron la versión final

Agradecimientos

Agradecemos a Red Nacional de Resistencia los Antimicrobianos del Ecuador por el apoyo y colaboración en la vigilancia de microorganismos multirresistentes.

Bibliografía

1. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(7):2133–43.
2. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": Global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2013;4(MAR):1–17.
3. Lutgring JD, Limbago BM. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):529–34.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement M100-S26. CLSI, Wayne, PA, USA, 2016
5. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1631–9.
6. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
7. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: Comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):274–6.
8. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. Elsevier Inc.;* 2011;70(1):119–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
9. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis [Internet]. Elsevier Ltd;* 2009;9(4):228–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
10. 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;25(4):682–707.
11. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487–9.
12. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Natl Cent Emerg Zoonotic Infect Dis.* 2015;(November):24. Available from: https://www.osha.gov/SLTC/ebola/control_prevention.html
13. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503–7.
14. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(7):1319–21.
15. Girgis SA, Othman HB, Kassem NN, Abdou SM. Evaluation of Boronic Acid Disk for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*. *IntJCurrMicrobiolAppSci.* 2015;4(5):772–83.
16. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2009;65(2):249–51.
17. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petrusson S, Waley SG, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem J.* 1983;209(1):229–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1154076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends Mol Med [Internet]. Elsevier Ltd;* 2012;18(5):263–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
19. Dortet L, Brécharde L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing "Enterobacteriaceae" from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2013;20(4):340–4.
20. Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(12):7553–6.