

Original breve

Concepción Mediavilla-Gradolph
Rocío Sáinz-Rodríguez
Miriam Valverde-Troya
Inmaculada de Toro-Peinado
M^a Pilar Bermudez-Ruiz
Begoña Palop-Borrás

Evaluación de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de carbapenemasa OXA-48

Laboratorio de Microbiología. UGC de Microbiología, Enfermedades Infecciosas y Medicina Preventiva. Hospital Regional Universitario de Málaga

RESUMEN

Introducción. La detección y diferenciación de los distintos tipos de carbapenemasas es crucial para el control y diseminación de las mismas. OXA-48 es la carbapenemasa más frecuente en España y en nuestro medio. El objetivo del estudio fue evaluar el nuevo test inmunocromatográfico OXA-48 Card letitest (Coris, BioConcept Belgium) para detectar esta carbapenemasa a partir de medios sólidos.

Material y Métodos. Durante el último año se han aislado 151 cepas productoras de carbapenemasas, de las cuales 136 presentaban OXA-48 (126 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 5 *Escherichia coli*, 4 *Enterobacter cloacae*) y 15 productoras de otras carbapenemasas. Estas 15 cepas junto con otras 73 con distintos mecanismos de resistencia: 54 productoras de β -lactamasas de espectro extendido y 19 con otros mecanismos, fueron utilizadas como controles negativos.

Resultados. Las 136 cepas portadoras de OXA-48 resultaron positivas en la prueba OXA-48 Card letitest y las 88 especies utilizadas como controles fueron negativas, por lo que la sensibilidad y especificidad de la prueba OXA-48 Card letitest fue del 100%.

Discusión. La OXA-48 Card letitest resulta ser una prueba fácil, rápida, segura y barata (aproximadamente unos 6 € por test) que puede utilizarse en los laboratorios de Microbiología para confirmar la producción de carbapenemasa OXA-48 a partir de los aislamientos clínicos.

Palabras clave: Detección de carbapenemasa, OXA-48, Inmunocromatografía, Enterobacterias, Vigilancia epidemiológica

Evaluation of an immunochromatographic test for the detection of OXA-48 carbapenemase

ABSTRACT

Introduction. Detection and differentiation of various types of carbapenemases is crucial to their control and dissemination. OXA-48 is the most common carbapenemase in Spain and in our environment. The aim of this study is the evaluation of a new immunochromatographic test OXA-48 Card letitest (Coris, BioConcept Belgium) to detect this carbapenemase from solid media.

Material and Methods. During the last year 151 strains of carbapenemase producing bacteria have been isolated, of which 136 were OXA-48 (126 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 5 *Escherichia coli*, 4 *Enterobacter cloacae*), and 15 producing other carbapenemases. These 15 strains with other 73 carrying other resistance mechanisms (54 extended-spectrum β -lactamases producers and 19 with other mechanisms) were used as negative controls.

Results. One hundred and thirty six strains carrying OXA-48 were positive with the test OXA-48 Card letitest and the 88 species used as controls were negative, resulting in a sensitivity and specificity of 100%.

Discussion. The OXA-48 Card letitest is simple, quick, safe and cheap (approx. 6€/test) and can be used in microbiology laboratories to confirm the production of OXA-48 carbapenemase in clinical isolates.

Key words: carbapenemase detection, OXA-48, immunochromatography Enterobacteriaceae, surveillance

Correspondencia:
Begoña Palop-Borrás
Laboratorio de Microbiología
Hospital Regional Universitario de Málaga
Avda. Carlos Haya, s/n 29010 Málaga
E-mail: bpalop@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El incremento progresivo de la resistencia de las enterobacterias a carbapenémicos se ha convertido en un problema sociosanitario de primer orden. OXA-48 es una carbapenemasa tipo D (clasificación de Ambler) que confiere resistencia a penicilinas y débil resistencia a carbapenémicos. Fue descrita inicialmente en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en Turquía en 2001, y, posteriormente en otros países, fundamentalmente Oriente Medio, África y Europa. Recientes estudios epidemiológicos revelan que OXA-48 es la carbapenemasa más prevalente en España¹ y algunos países europeos². Estos estudios también demuestran que, entre las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) las especies más afectadas fueron *K. pneumoniae* (74,4%), *Enterobacter cloacae* (10,3%) y *Escherichia coli* (8,4%)³.

En la actualidad, se han detectado brotes de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa OXA-48 en la mayoría de las regiones españolas, algunos de ellos epidemiológicamente relacionados a pesar de encontrarse en diferentes provincias e incluso en diferentes comunidades autónomas³.

En contraste con otras carbapenemasas, OXA-48 hidroliza los carbapenémicos débilmente; sin embargo, cuando se asocia con otros mecanismos de resistencia como la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o problemas de impermeabilidad, el nivel de resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos es considerablemente más alto⁴.

La detección segura y posterior diferenciación de los distintos tipos de carbapenemasas es crucial para el control y diseminación de estos mecanismos entre las enterobacterias. Está basada en la detección fenotípica de la sensibilidad reducida a los carbapenémicos, y se confirma mediante el test de Hodge, aunque éste tiene el inconveniente de no discriminar entre los distintos tipos de carbapenemasas e incluso producir falsos positivos en cepas que poseen hiperproducción de AmpC asociada a pérdida de porinas^{5,6}.

La prueba Carba NP es un ensayo bioquímico simple y seguro recomendado por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S25 para la búsqueda de producción de carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas* spp., sin embargo en cepas productoras de OXA-48 su interpretación puede resultar difícil^{3,6}. Una modificación de este test, el BYG Carba Test⁷, detecta las variaciones de conductividad de polianilina unida a un electrodo, que es extremadamente sensible a las modificaciones de pH y actividad redox que ocurren en la reacción de hidrólisis enzimática del imipenem, permitiendo el establecimiento de criterios de medición e interpretación objetivas en tiempo real. Estas pruebas seguidas de técnicas moleculares pueden diferenciar los distintos tipos de carbapenemasas.

Algunos laboratorios utilizan las pruebas de inhibición con discos de ácido fenilborónico y dipicolínico, para diferenciar las carbapenemasas tipo A y B. En el caso de las carbapenemasas tipo D, principalmente OXA-48, utilizan la resistencia de alto nivel a temocilina (>64 mg/L) y piperacilina/tazobactam, pero este método no es específico. Es por esto, y por no existir

un inhibidor específico de las carbapenemasas tipo D, que los métodos moleculares siguen siendo el "gold standard" para su detección y clasificación. Sin embargo, estos métodos además de no detectar eficazmente variantes tipo OXA-48 son caros, requieren experiencia y laboratorios especializados que no siempre se encuentran disponibles^{8,9}.

Tsakris et al. utilizan una nueva prueba fenotípica, la prueba de disco OXA-48, que está basada en un disco de imipenem y dos discos en blanco adyacentes al mismo, cargados con la cepa a testar e impregnados con EDTA Y EDTA más ácido fenilborónico (PBA), respectivamente. La prueba tiene una sensibilidad de 96% y una especificidad de 97%⁴.

Actualmente están disponibles distintos protocolos que demuestran la detección de actividad carbapenemasa por MALDI-TOF MS. Sin embargo, la variabilidad en dichos protocolos demuestra la dificultad de definir un método universal para ensayos de hidrólisis de antibióticos mediante espectrometría de masas¹⁰.

En los últimos meses se han desarrollado tests inmunocromatográficos que permiten la detección rápida de algunas de estas carbapenemasas a partir de colonias aisladas. En el presente estudio nos proponemos evaluar la eficacia diagnóstica del nuevo método inmunocromatográfico OXA-48 Card letitest (Coris, BioConcept Belgium) para detectar esta carbapenemasa a partir de aislamientos de cultivos sólidos. Esta prueba parece reconocer únicamente las enzimas tipo OXA-48 que son capaces de hidrolizar carbapenemas¹¹.

En el Hospital Regional Universitario (HRU) de Málaga y desde el año 2012 es frecuente el aislamiento de bacterias, fundamentalmente *K. pneumoniae*, productoras de carbapenemasa tipo OXA-48; es por ello de gran utilidad una prueba rápida que nos permita confirmar este mecanismo de resistencia y realizar las actuaciones oportunas ante el aislamiento de una de estas cepas. OXA-48 Card letitest® (O48L) es una inmunocromatografía que se puede realizar en colonias aisladas a partir de medios sólidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido en el estudio 224 cepas, 103 (45,98%) aisladas a partir de muestras para estudios de vigilancia epidemiológica de gérmenes multirresistentes y 121 (54,02%) de muestras clínicas de pacientes ingresados en el HRU de Málaga en el periodo comprendido entre mayo de 2015 a mayo de 2016. De estas, 151 eran productoras de carbapenemasa (136 productoras de OXA-48 y 15 con otros tipos de carbapenemasa) y 73 con otros mecanismos de resistencia (54 productoras de BLEE y 19 con otros mecanismos). Del conjunto de las muestras sólo se ha incluido un aislamiento por paciente.

Para la detección de cepas productoras de BLEE las muestras se sembraron en medio cromogénico Chromid®ESBL (bioMérieux) y se incubaron a 35-37°C, 24-48h. A las cepas seleccionadas se les realizó estudio de sensibilidad mediante el sistema comercial automatizado Vitek® (bioMérieux) y aquellas con CMI a ertapenem > 0,5 mg/L (según criterios del European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) se les realizó el test modificado de Hodge. Para la confirmación del tipo de carbapenemasa se realizó PCR a tiempo real utilizando el sistema comercial Xpert® Carba-R (Cepheid) y se confirmaron mediante tipado en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda).

O48L es una prueba inmunocromatográfica que se basa en una tecnología de membrana con nanopartículas de oro coloidal. Se sensibiliza una membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo monoclonal frente a un epítipo de la carbapenemasa OXA-48. Otro anticuerpo monoclonal frente a un segundo epítipo carbapenemasa OXA-48 se conjuga con las partículas de oro coloidal. El test se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. La lectura e interpretación se realizó transcurridos 15 minutos.

Como controles negativos se incluyeron cepas que habían sido caracterizadas molecularmente con anterioridad: 54 productoras de BLEE, 15 portadoras de otras carbapenemasas (distintas de OXA-48) : 6 productoras de KPC (5 *K. pneumoniae*, 1 *Serratia marcescens*), 6 VIM (5 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *K. pneumoniae*) y 3 *Acinetobacter baumannii* portadores de OXA-51 (uno de ellas producía también OXA-23) y 19 con otros mecanismos de resistencia distintos de BLEE o carbapenemasas, fundamentalmente mecanismos de impermeabilidad asociados o no a producción de AmpC (12 *P. aeruginosa*, 2 *E. cloacae*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *S. marcescens* y 1 *Citobacter freundii*).

RESULTADOS

De las 151 cepas productoras de carbapenemasas 136 (90%) eran portadoras de OXA-48; 126 *K. pneumoniae* (de estas 120 también eran productoras de BLEE CTX-M-15), 5 *E. coli* (4 de ellas además producían BLEE), 4 *E. cloacae* (3 además productores de BLEE) y 1 *Klebsiella oxytoca* (tabla 1).

Las 136 cepas productoras de OXA-48 fueron positivas por la inmunocromatografía O48L coincidiendo con los resultados obtenidos en los estudios moleculares. Las 15 cepas productoras de otro tipo de carbapenemasas (6 KPC, 6 VIM, 3 OXA-51, una de las cuales también portaba 1 OXA-23) resultaron negativas al realizar la técnica inmunocromatográfica. Asimismo, todas las cepas control productoras únicamente de BLEE y las 19 cepas con mecanismos de resistencia diferentes a CPE o BLEE también resultaron negativas mediante la inmunocromatografía O48L.

Así pues, los valores de sensibilidad y especificidad resultantes fueron del 100%.

Tabla 1 Resultados de O48L y mecanismos de resistencia de las 224 cepas.

Test O48L	Tipo carbapenemasa	Microorganismos	Otros mecanismos asociados
Positivas 136	136 OXA-48	126 <i>K. pneumoniae</i>	120 ESBL (CTX-M-15)
		5 <i>E. coli</i>	4 ESBL (CTX-M-15)
		4 <i>E. cloacae</i>	3 ESBL
		1 <i>K. oxytoca</i>	
Negativas 88	6 KPC	5 <i>K. pneumoniae</i>	
		1 <i>S. marcescens</i>	
	6 VIM	5 <i>P. aeruginosa</i>	
		1 <i>K. pneumoniae</i>	
	3 OXA-51	3 <i>A. baumannii</i>	(1 además OXA-23)
	54 BLEE	53 <i>K. pneumoniae</i>	53 ESBL (CTX-M-15)
		1 <i>E. coli</i>	1 ESBL (CTX-M-15)
	19 no BLEE no CPE (Impermeabilidad +/- AmpC)	12 <i>P. aeruginosa</i>	
		2 <i>E. cloacae</i>	
		2 <i>K. pneumoniae</i>	
	2 <i>S. marcescens</i>		
	1 <i>C. freundii</i>		

DISCUSIÓN

La O48L resulta ser una prueba fácil, rápida, segura y barata (aproximadamente unos 6€ por test) que puede utilizarse en los laboratorios de Microbiología para confirmar la producción de carbapenemasa OXA-48 a partir de los aislamientos clínicos.

En nuestra experiencia, en estos últimos años *K. pneumoniae* productora de OXA-48 es la enterobacteria productora de carbapenemasa que con más frecuencia se aísla. Su diseminación es amplia en nuestro entorno, y la rapidez en implementar las medidas que impidan su diseminación, como parte de los programas de control (Programa PIRASOA: Programa integral de prevención, control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, y uso apropiado de los antimicrobianos. <https://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/>), es de máxima importancia para que puedan resultar exitosos.

El uso de anticuerpos monoclonales frente a OXA-48 en la prueba inmunocromatográfica le confieren una muy alta especificidad a la técnica. Ninguna cepa que no produjera OXA-48 resultó ser positiva en nuestra experiencia, coincidiendo con los datos publicados por otros autores^{5,11,12}. De hecho, Glupczynski et al recomiendan en áreas de alta endemicidad, un algoritmo en el que se realizaría la O48L en un primer paso sobre los aislamientos de CPE⁵.

Una posible limitación de la misma podría ser su eficacia para detectar las diferentes variantes de OXA-48. En nuestro estudio todas las cepas resultaron ser OXA-48 cuando se secuenciaron, por lo que no se ha confirmado la existencia de ninguna variante de OXA-48. En años anteriores, en nuestro

hospital se han aislado algunas variantes de OXA-48, fundamentalmente 245 y alguna 244¹³, si bien ambas variantes parece ser que son detectadas por O48L⁸.

La principal debilidad que presenta esta prueba es que solo está validada para su realización sobre colonias aisladas a partir de medios sólidos. Wareham et al, han probado esta inmunocromatografía inoculando frascos de hemocultivos con diluciones seriadas de *K. pneumoniae* y detectaron que el límite de sensibilidad del ensayo era de 2,41 x10⁶ UFC/ml. Los resultados se leían claramente, y no se oscurecían por la presencia de hematíes cuando se usaban lisados de hemocultivos para la realización del test¹⁴. Sarriá et al. presentan un protocolo a partir de hemocultivos con una sensibilidad del 100%¹⁵. Xpert Carba-R presenta la ventaja de poder utilizarse sobre muestra directa a la vez que detecta otras carbapenemasas, aunque el precio es bastante más elevado y necesita un personal cualificado¹⁶.

También, a partir de estas experiencias y en casos seleccionados, se podría utilizar en conjunción con la espectrometría de masas MALDI TOF, a partir de muestras de orina o líquidos biológicos estériles, produciendo en una hora aproximadamente una información de gran relevancia en el manejo de los pacientes graves.

OXA-48 está relacionada con brotes y casos aislados en todo el mundo. La transferencia de elementos genéticos móviles portadores del gen tipo OXA-48 conduce a su rápida diseminación¹⁶. En áreas con alta prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas OXA-48, la posibilidad de disponer de una técnica capaz de identificar estas cepas de una forma rápida y sencilla, puede generar un gran beneficio en términos socio-sanitarios ya que facilitaría aislamientos precoces y tratamientos eficaces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa de Vigilancia de la Resistencia a Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología por la caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos y a Noelia Lara por su apoyo técnico.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3406–12.
- Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries. *Euro Surveill* 2013;18:1–7. [pii:20525]
- Bou Arevalo G, Chaves Sánchez F, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. 55. Oteo Iglesias J (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
- Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, and Glupczynski Y. Evaluation of a New Phenotypic OXA-48 Disk Test for Differentiation of OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 1245–51.
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, Leclipteux T and Bogaerts P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemasas from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 1217–22.
- CLSI M100S. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th Edition.
- Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang TD, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2016; 54:349–58.
- Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemasas. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2357–9.
- Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence* 2016; 11:1-13.
- Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier JP, van Belkum, Welker M, et al. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34:2225–34.
- Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48 type carbapenemasas. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:1834–40.
- Fernández J, Fleites A, Rodicio MR, Vazquez F. Evaluation of OXA-48 K-Se T: an immunochromatographic assay for rapid detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85:12–5.
- Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Saéz D, bautista V et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemasas OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:317–21.
- Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Haziq MF, Momin A. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay

(OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2016; 54:471-3.

15. Sarriá A , Gomez-Gil R, Ruiz G, Romero MP, Garcia- Rodríguez J." Preliminary study of the oxa-48 card letitest method for the direct detection of oxa-48 carbapenemase in blood and plates culture". Poster 669. 23th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Boston February 2016.
16. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory detection and clinical implication of oxacillinase-48 like carbapenemase: The hidden threat. *J Global Infect Dis* 2016;8:41-50.