

# Bacteriología

Emilia Cercenado

## Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio

Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón

### RESUMEN

La detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el laboratorio requiere un análisis pormenorizado del antibiograma y de la sensibilidad a todos los beta-lactámicos, la implementación con métodos fenotípicos de cribado y la confirmación mediante detección de la hidrólisis del carbapenem, inhibición de la actividad de la enzima con inhibidores específicos y mediante métodos moleculares.

**Palabras clave:** Enterobacterias, carbapenemasas, detección de carbapenemasas

### Laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

### ABSTRACT

Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the laboratory requires an exhaustive analysis of the antibiogram and susceptibility to all beta-lactams, the implementation with phenotypic methods of screening as well as confirmatory procedures including the detection of the carbapenem hydrolysis, the inhibition of the enzyme activity with several specific inhibitor compounds and by molecular methods.

**Keywords:** Enterobacteriaceae, carbapenemases, detection of carbapenemases

### INTRODUCCIÓN

La emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) constituye un reto para la salud pública, tanto en las instituciones sanitarias como en la comunidad. Las carbapenemasas son beta-lactamasas que hidrolizan las penicilinas, y en la mayoría de los casos también a las cefalosporinas y, en varios grados, a las carbapenemas. En definitiva, pueden conferir resistencia a todos los beta-lactámicos, con la excepción del aztreonam, que no se hidroliza por las metalo-beta-lactamasas. Además, en muchas ocasiones las EPC son también resistentes a múltiples antimicrobianos de otras familias como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y el cotrimoxazol, lo que reduce las opciones terapéuticas a colistina, aztreonam, fosfomicina y tigeciclina<sup>1</sup>. En un documento técnico publicado por el *European Center for Disease Control and Prevention* (ECDC) en 2013, se detectaron EPC en 36 de los 39 países europeos participantes, incluyendo a España, pero la situación era particularmente preocupante en Grecia y en Italia, debido a la alta prevalencia de *K. pneumoniae* productora de la carbapenemasa KPC<sup>2</sup>. Actualmente en España, la carbapenemasa más prevalente es la OXA-48<sup>3,4</sup>.

La detección de carbapenemasas también supone un reto para los laboratorios de Microbiología Clínica debido a que su detección fenotípica no es fácil, ya que en muchos casos los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de las carbapenemas frente a las EPC se encuentran en el rango de sensibilidad, por debajo de los puntos de corte clínicos. Por tanto, es necesario establecer una metodología que facilite su detección.

### PRINCIPALES TIPOS DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS

Se conocen 3 tipos moleculares de carbapenemasas, denominados A, B y D. Las de las clases A y D son serina-beta-lactamasas, mientras que las de clase B, son metalo-beta-lactamasas, es decir, su actividad hidrolítica depende de la presencia de zinc. Las carbapenemasas también hidrolizan otros beta-lactámicos, además de carbapenemas, pero el perfil de sustrato

Correspondencia:  
Emilia Cercenado  
Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas.  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dr Esquerdo 46. 28007 Madrid  
Telf: 915868459  
FAX: 915044906  
Email: emilia.cercenado@salud.madrid.org

concreto depende de la enzima considerada. En general, las de clase A se inhiben en mayor o menor medida por ácido clavulánico y por ácido fenilborónico, mientras que las de clase B no hidrolizan a los monobactámicos (aztreonam), y se inhiben por quelantes del zinc (EDTA y ácido dipicolínico). Entre las de clase D, las oxacilinasas, también denominadas de tipo OXA, se inhiben parcialmente por ácido clavulánico, no afectan a los monobactámicos, producen alto nivel de resistencia a la temocilina y presentan una baja eficiencia hidrolítica frente a las carbapenemas, por lo que en muchas ocasiones aparecen como sensibles a estos antimicrobianos. Es frecuente que las EPC de tipo OXA, sean portadoras además de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), y por tanto aparezcan como resistentes a cefalosporinas de tercera y de cuarta generación y frente a las carbapenemas, por lo que en muchas ocasiones aparecen como sensibles a estos antimicrobianos. Actualmente, las carbapenemasas más importantes de clase A son las KPC, las de clase B son las de tipo VIM, IMP y NDM, y las de clase D, OXA-48 y similares. No es raro que las EPC contengan además otros genes de resistencia a beta-lactámicos, y presenten fenotipos complejos de resistencia a beta-lactámicos<sup>4,6</sup>.

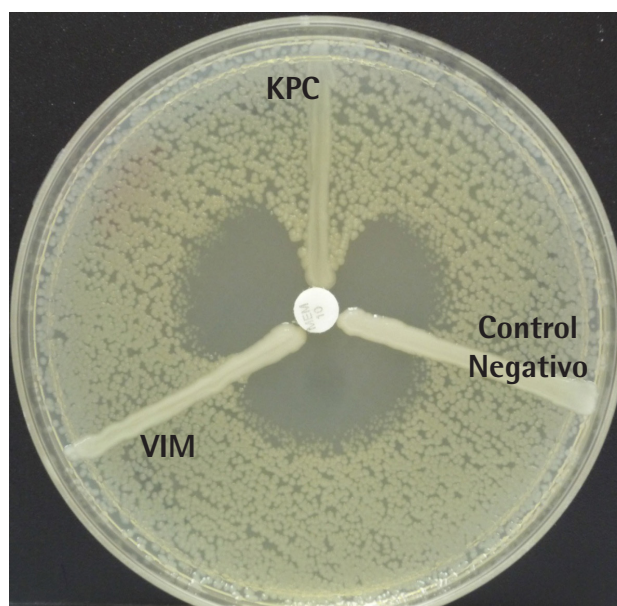
## DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN EL LABORATORIO

Como se indicó anteriormente, en muchas ocasiones es difícil la detección de EPC en el laboratorio, ya que los puntos de corte clínicos no son útiles, y pueden aparecer como sensibles en el antibiograma, además pueden presentar diferentes niveles de expresión y aparecer como heterorresistentes, y esto hace que las pruebas de sensibilidad tengan una baja reproducibilidad, lo que junto a la presencia frecuente de otros mecanismos de resistencia (BLEE, AmpC cromosómico o plasmídico) pueden enmascarar la presencia de la carbapenemasa. Por tanto, la detección de la presencia de una EPC requiere un análisis pormenorizado del antibiograma y de la sensibilidad a todos los beta-lactámicos, la implementación con métodos fenotípicos de cribado y la confirmación mediante detección de la hidrólisis del carbapenem, la inhibición de la actividad de la enzima con inhibidores específicos y la diferenciación del tipo de carbapenemasa mediante métodos moleculares basados principalmente en técnicas de PCR<sup>7</sup>.

El *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) define unos puntos de corte de cribado para detectar posibles cepas productoras de carbapenemasas que se indican en la tabla 1. La sensibilidad a meropenem ofrece el mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. El ertapenem presenta excelente sensibilidad pero baja especificidad, especialmente en especies de *Enterobacter* spp., debido a su relativa inestabilidad frente a beta-lactamasas de espectro extendido y beta-lactamasas de tipo AmpC en combinación con pérdida de porinas. En el caso del imipenem, la separación entre la población salvaje y la productora de carbapenemasas estableciendo este punto de corte no está bien diferenciada, por tanto, no se recomienda el uso único de este carbapenem para realizar el cribado<sup>8</sup>.

**Tabla 1** Puntos de corte de cribado para la detección de EPC (EUCAST)

Carbapenem	CMI (mg/L)	Diámetro de halo (mg) con discos de 10 mg
Ertapenem	>0,12	<25
Imipenem	>1	<23
Meropenem	>0,12	<25



**Figura 1** Test de Hodge modificado. Siembra de una bacteria sensible a carbapenemas con un disco de meropenem + cloxacilina. Las estrias corresponden a una EPC de tipo KPC, otra de tipo VIM y otra no productora de carbapenemasa. Se observa la inactivación del carbapenem por la extensión del crecimiento de la bacteria sensible cerca del disco del carbapenem y a lo largo de las estrias de la cepas productoras de la carbapenemasa.

Existen excepciones a los criterios establecidos en la tabla 1, como es el caso de los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*, en los que solamente se deben valorar meropenem y ertapenem, y excluir aquellos casos con CMI de imipenem  $\geq 0,5$  mg/L. Por otra parte, en el género *Enterobacter* solamente se deben valorar imipenem y meropenem y excluir aquellos casos con CMI de ertapenem  $\geq 0,25$  mg/L. Las EPC portadoras de enzimas de tipo KPC suelen presentar valores elevados de CMI de carbapenemas, cefalosporinas y aztreonam, mientras que en las portadoras de enzimas de tipo metalo-beta-lactamasas, los valores de CMI son inferiores y presentan sensibilidad a aztreonam. Finalmente, las EPC portadoras de la enzima

OXA-48, suelen aparecer como sensibles en el antibiograma a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, al aztreonam y también a las carbapenemas, con la excepción de ligeras elevaciones de CMI en el caso de ertapenem, pero presentan elevada resistencia a amoxicilina-clavulánico y a piperacilina-tazobactam<sup>1,6,7</sup>.

La comprobación de la hidrólisis de las carbapenemas se puede realizar mediante ensayos espectrofotométricos, que miden la hidrólisis del carbapenem en presencia de la bacteria presuntamente productora de la carbapenemasa, o bien mediante métodos proteómicos que comparan el espectro MALDI-TOF generado por un antibiótico carbapenémico, no hidrolizado, con el que se obtiene tras la hidrólisis del anillo beta-lactámico por la carbapenemasa<sup>7</sup>. También se puede determinar si existe hidrólisis del carbapenem mediante un ensayo biológico como el test de Hodge modificado. Este test se basa en la inactivación del carbapenem por la carbapenemasa producida por una bacteria, lo que permite a una cepa indicadora y sensible a las carbapenemas extender su crecimiento cerca del disco del carbapenem y a lo largo de la estría de la cepa productora de la carbapenemasa (figura 1). Este test no está recomendado por el EUCAST por su baja especificidad y por la dificultad en la interpretación de los resultados en bacterias con otros mecanismos de resistencia a beta-lactámicos.

Recientemente se ha desarrollado un test colorimétrico rápido (2 horas), denominado Carba NP test, basado en la detección colorimétrica de la hidrólisis del imipenem. Cuando se produce esta hidrólisis, hay un cambio de pH y, en consecuencia, un cambio de color rojo a amarillo/naranja que confirma la producción de carbapenemasa. Este test tiene una buena especificidad pero baja sensibilidad para la detección del enzima OXA-48<sup>9</sup>.

En cuanto a la diferenciación del tipo de carbapenemasa, los métodos basados en la inhibición de la enzima en presencia de compuestos inhibidores específicos para las beta-lactamasas de clase A, B y C, tienen una buena sensibilidad. La inhibición con ácido fenilborónico indica la presencia de una carbapenemasa de clase A (KPC u otras); la inhibición con ácido fenilborónico y con cloxacilina indica la presencia de una beta-lactamasa de tipo AmpC; la inhibición con ácido dipicolínico o con EDTA indica la presencia de una metalo-beta-lactamasa (clase B, tipos VIM, IMP, NDM), y la ausencia de inhibición con los inhibidores anteriormente descritos indica la presencia de una beta-lactamasa de clase D (OXA-48 y derivados). Los algoritmos recomendados por EUCAST resultan de gran utilidad para la diferenciación de los distintos tipos de enzimas<sup>7,8</sup>.

Cada vez se describen con más frecuencia cepas que producen dos tipos de carbapenemasas distintas e incluso cepas que producen dos tipos de carbapenemasas y además una BLEE. En estas situaciones la utilización de los métodos fenotípicos con inhibidores proporciona resultados variables, ya que la producción en mayor cantidad de una de las enzimas puede enmascarar los efectos de la otra y dar falsos negativos en estas pruebas, por tanto, es necesario detectar las carbapenemasas mediante métodos moleculares<sup>10</sup>. Estos métodos están

basados en técnicas de PCR, multiplex-PCR y PCR en tiempo real, y también microarrays de ADN y muchos de ellos están comercializados. Los métodos moleculares presentan una gran sensibilidad y especificidad cuando se realizan a partir de colonias bacterianas, pero actualmente todavía están poco evaluados para su aplicación a partir de muestras clínicas, aunque hay algunos comercializados que presentan una buena sensibilidad y especificidad para detectar diferentes tipos de carbapenemasas a partir de muestras de heces<sup>7</sup>.

Finalmente, tan importante como la detección de CPE en la rutina del laboratorio es la detección de portadores, ya que los pacientes colonizados por CPE tienen riesgo de una infección invasiva. La muestra biológica más apropiada para la detección de portadores de EPC son las heces o los hisopados rectales. Estas muestras se pueden sembrar en medios líquidos o sólidos suplementados con imipenem a una concentración de 1-2 mg/L. Además, se han desarrollado diversos medios cromogénicos suplementados con agentes que inhiben el crecimiento de microorganismos sensibles a las carbapenemas, que están comercializados y que presentan una buena sensibilidad para detectar EPC con cualquier tipo de carbapenemasa.

En resumen, la detección de EPC en el laboratorio debe realizarse inicialmente por métodos fenotípicos, con los que se obtendrían resultados en 48-72 h, que se deben confirmar con métodos moleculares. Para los estudios de vigilancia epidemiológica es recomendable utilizar medios cromogénicos (24-48 h) o bien realizar métodos moleculares directamente de las muestras de heces (1-3 h tras la recogida de la muestra). La utilización de unos métodos u otros dependerá de las características de cada hospital, de los recursos y de la necesidad de una respuesta rápida ante situaciones epidemiológicas concretas.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

La autora declara no presentar ningún conflicto de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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; 25:682-707.
2. Carbapenemase-producing bacteria in Europe. 2013. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>.
3. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Campos J; Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:6344-6347.
4. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniad-

- kowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413-31.
5. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E230-2.
  6. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:432-8.
  7. Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32 (Supl 4):24-32.
  8. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf) (July 2014, data last accessed).
  9. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1503-7.
  10. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E412-5.