



Noelia Hernando Parreño
Ángeles Sampere Martínez

Evaluación de dos técnicas fenotípicas y un panel molecular multiplex comercial para la detección de diferentes carbapenemasas

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario N. S. de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife (España)

Article history

Received: 25 April 2023; Revision Requested: 29 May 2023; Revision Received: 28 June 2023; Accepted: 20 July 2023; Published: 3 October 2023

RESUMEN

Introducción. La prevalencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas ha aumentado en los últimos años, considerándose un importante problema de salud pública.

Material y métodos. Se analizaron 106 muestras por distintas técnicas de detección de carbapenemasas: discos de inhibición (DI), test inmunocromatográfico (TIC) y una técnica genotípica, frente a una RT-PCR multiplex como método de referencia.

Resultados. Globalmente, las 3 técnicas superaron el 90% de sensibilidad, aunque con diferencias en el rendimiento de algunas de ellas por tipos de carbapenemasa. Los DI presentaron baja especificidad (62%) para OXA-48, mientras que con el TIC la sensibilidad para metalobetalactamasas tipo NDM (93%) fue ligeramente inferior que para OXA-48 (95%). Los mejores resultados se obtuvieron con la técnica genotípica (rendimiento global del 100%).

Conclusiones. A pesar de la menor sensibilidad de los TIC respecto a las técnicas moleculares, especialmente en carbapenemasas tipo NDM, con la modificación del protocolo conseguimos aumentar esta sensibilidad, y junto al menor precio, sencillez y rapidez convierte a esta técnica en una buena opción de screening.

Palabras clave: Carbapenemasas, diagnóstico, Enterobacteriales.

Evaluation of two phenotypic techniques and a commercial multiplex molecular panel for the detection of different carbapenemases

ABSTRACT

Introduction. The prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriales has increased in recent years and is considered an important public health problem.

Material and methods. A total of 106 clinical samples were analyzed by different carbapenemase detection techniques: inhibition discs (ID), immunochromatographic test (ICT) and a genotypic method, comparing them with a multiplex RT-PCR as a reference method.

Results. Overall, all 3 techniques exceeded 90% sensitivity, although with differences in the performance of some of them by carbapenemase type. DI had low specificity (62%) for OXA-48, while with TIC the sensitivity for NDM-type metallo-beta-lactamase (93%) was slightly lower than for OXA-48 (95%). The best results were obtained with the genotypic technique (100% overall performance).

Conclusions. Despite the lower sensitivity of TICs (especially in NDM carbapenemases) compared to molecular techniques, with the modification of the protocol we managed to increase this sensitivity and, together with the lower price, simplicity and speed, it makes this technique a good screening option.

Keywords: Carbapenemases, diagnosis, Enterobacteriales.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la prevalencia de infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) se ha incrementado de manera significativa, por lo que un diagnóstico adecuado y precoz para adecuar el tratamiento puede tener gran importancia, especialmente en pacientes de alto riesgo

Correspondencia:
Noelia Hernando Parreño
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario N. S. de Candelaria, 38010 Santa Cruz de Tenerife (España)
E-mail: noeliahernando@hotmail.com

Tabla 1 Distribución de carbapenemasas por las distintas técnicas.

Carbapenemasas	DI				TIC				BF						
	Sinergia con ADP + R TEM	Sinergia con ADP	Sinergia con BOR y ADP + R TEM	Sinergia con BOR + R TEM	R TEM	N	OXA-48	NDM	OXA 48/ NDM	N	OXA-48	NDM	OXA 48/ NDM	NDM/ VIM	N
OXA 48 (n=38)	0	0	4	2	31	1	37	0	0	1	38	0	0	0	0
NDM (n=36)	18	17	0	0	0	1	0	33	0	3	0	33	2	1	0
OXA 48/NDM (n=2)	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
Negativas (n=30)	0	0	0	0	0	30	0	0	0	30	0	0	0	0	30

DI: discos de inhibición; TIC: test inmunocromatográfico; BF: BioFire® BCID2; ADP: ácido dipicolínico; BOR: ácido borónico; R TEM: resistencia a temocilina; N: negativo.

[1]. Atendiendo a la clasificación molecular de Ambler, las más frecuentes son serin-carbapenemasas (Clase A), metalo-beta-lactamasas (MBL) de Clase B y las tipo OXA (Clase D) [2].

Tradicionalmente, para su diagnóstico los laboratorios han usado pruebas de inhibición con discos (DI), pero este método no es específico y presenta un tiempo medio de respuesta largo (24-48h) [3]. Por ello, a pesar de ser mucho más costosas, las pruebas moleculares se han considerado el "Gold standard". El panel comercial BioFire® BCID2 (BF) de bioMérieux es una PCR multiplex que integra extracción, amplificación y detección de patógenos y genes de resistencia, obteniendo resultados con sensibilidades y especificidades alrededor del 100% en aproximadamente hora y media [4].

En los últimos años, los test inmunocromatográficos (TIC) como el Coris Resist-4 O.K.N.V., han ganado terreno principalmente por la rapidez, siendo posible dar resultados en 15 minutos, con unos resultados de sensibilidad y especificidad cercanos al 100% [5].

En nuestro hospital, siguiendo la tendencia global, hemos observado un incremento en el diagnóstico de EPC, lo que nos ha llevado a implementar en cada momento aquellas técnicas disponibles más adecuadas. El objetivo de este estudio fue comparar 3 técnicas de detección de carbapenemasas frente a una PCR comercial considerada el método de referencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante dos años, se recogieron 106 cepas de enterobacterias pertenecientes a muestras clínicas de pacientes ingresados en nuestro hospital: 30 controles negativos y 76 EPC. Todas las muestras se procesaron siguiendo el procedimiento convencional de siembra e incubación. Las cepas se identificaron por MALDI-TOF Vitek®MS (bioMérieux) y se les realizó estudio de sensibilidad mediante el sistema comercial automatizado Vitek®2 (bioMérieux). Las concentraciones mínimas inhibitorias de carbapenémicos y ceftazidima/avibactam se evaluaron por tiras de gradiente (ETEST®bioMérieux y Liofilchem®MIC Test Strip, respectivamente).

A las 106 cepas se les realizaron todas las técnicas descritas a continuación.

a) Detección fenotípica con discos/inhibidores. Las

suspensiones bacterianas equivalentes a un 0,5 McFarland se incubaron 18-20 horas en placas de Mueller-Hinton (bioMérieux) con un disco de 10 µg de meropenem, discos combinados con éste y diferentes inhibidores y un disco de 30 µg de temocilina (Rosco Diagnostica). La interpretación se realizó atendiendo a las guías EUCAST.

b) Allplex™Entero-DR Assay (Seegene Inc). Método de referencia en el que una suspensión de 2-3 colonias bacterianas junto con un control interno se sometió a una temperatura de 98°C durante 10 minutos y una posterior centrifugación a 16.000g durante 2 minutos. Los sobrenadantes se usaron para la RT-PCR multiplex que detecta varios genes productores de carbapenemasas (bla-NDM, bla-KPC, bla-OXA-48, bla-VIM, bla-IMP) [6].

c) PCR multiplex BioFire®BCID2 Panel (FilmArray®bioMérieux). Una suspensión bacteriana entre 0,5-1 McFarland se utilizó como muestra para la carga del cartucho según las indicaciones del fabricante. Entre sus dianas se incluyen genes que codifican carbapenemasas (IMP, KPC, OXA-48-like, NDM y VIM)

d) Método inmunocromatográfico Lateral Flow O.K.N.V. RESIST-4 (Coris BioConcept®, Belgium). Según recomendaciones del fabricante, las colonias se suspenden en el buffer incorporado en el kit y tras vortear, se añaden 3 gotas a cada cassette y se leen los resultados en 15 minutos. Para mejorar la visualización de las bandas débiles en carbapenemasas tipo MBL, se incorporó un paso previo adicional no descrito en la técnica de incubación a 35-37°C durante 15 minutos tras la suspensión.

RESULTADOS

De las 106 muestras analizadas, 76 fueron positivas y pertenecían a 70 pacientes, 67% hombres (47/70) con una edad media de 67 años (30-94; IQR 18). Las carbapenemasas detectadas fueron tipo OXA-48 en el 50% de los casos (38/76), NDM en el 47% (36/76) y un 3% (2/76) de EPC que presentaban combinación de ambas carbapenemasas (OXA-48/NDM). En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con las distintas técnicas según el tipo de carbapenemasa.

Para conocer el rendimiento de cada técnica se tomó co-

Tabla 2 Rendimiento de las distintas técnicas.

Carbapenemasas	DI				TIC				BF			
	S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN	S	E	VPP	VPN
Global	97%	58%	77%	94%	95%	100%	100%	88%	100%	100%	100%	100%
	[0,9-1,0]	[0,4-0,7]	[0,7-0,8]	[0,8-1,0]	[0,90-0,99]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,7-0,9]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]
OXA-48	97%	62%	69%	97%	95%	100%	100%	94%	97%	94%	95%	97%
	[0,9-1,0]	[0,5-0,7]	[0,5-0,8]	[0,9-1,0]	[0,8-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,8-1,0]	[0,9-1,0]	[0,8-1,0]	[0,8-1,0]	[0,9-1,0]
NDM	97%	88%	90%	97%	93%	100%	100%	91%	100%	97%	97%	100%
	[0,9-1,0]	[0,7-0,9]	[0,8-0,9]	[0,9-1,0]	[0,8-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]	[0,9-1,0]

DI: discos de inhibición; TIC: test inmunocromatográfico; BF: BioFire® BCID2; VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo

mo referencia el panel Entero-DR, obteniéndose de forma global una sensibilidad (S) del 97% para los DI, 95% para el TIC y un 100% para BF. Con respecto a la especificidad (E) y valor predictivo positivo (VPP) fueron del 100% para todas las técnicas, excepto para los DI (E=58%; VPP=77%). El valor predictivo negativo (VPN) fue del 94%, 88% y 100% para los DI, TIC y BF, respectivamente.

Estos mismos parámetros se estudiaron por tipo de carbapenemasa, observándose diferencias en el rendimiento de las técnicas (Tabla 2).

En el grupo de OXA-48, la E y VPP de los DI disminuyó por 18 cepas portadoras de NDM con resistencia a temocilina en las que no se confirmó la presencia de OXA-48. Además, se detectó un falso negativo (FN) en una *Klebsiella pneumoniae* (KP) OXA-48 en la que se apreciaba una doble población temocilina sensible con colonias dentro del halo. En las NDM, se encontró un FN en una KP-NDM y 4 falsos positivos (FP) por inhibición con los 2 inhibidores junto con resistencia a temocilina, confirmando por PCR sólo la detección de OXA-48.

Para el TIC, la mayoría de los falsos negativos se obtuvieron en carbapenemasas de tipo NDM. Por otro lado, en las 17 cepas en las que no se aplicó el paso previo de calentamiento se obtuvieron 2 FN (KP-NDM y KP-OXA-48) y 5 NDM débiles, sin embargo, tras aplicar la incubación en 59 cepas, obtuvimos 2 FN en KP-NDM pero ningún resultado indeterminado, mostrando diferencias significativas respecto al grupo sin incubación ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Desde hace varios años las EPC se consideran un problema importante de salud pública [2] y posiblemente, la pandemia del SARS-CoV-2 haya agravado su diseminación por el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, el traslado de pacientes entre instituciones y el uso inapropiado de equipos de protección [7].

Con la existencia de nuevos antimicrobianos con perfiles únicos para el tratamiento de las distintas carbapenemasas, como la ceftazidima-avibactam activa frente a carbapene-

masas tipo OXA-48 pero inactiva frente a MBL, gana peso la correcta identificación de las mismas [8]. Es por ello que técnicas rápidas como los TICs están siendo ampliamente implantadas en el medio hospitalario. Sin embargo, según nuestros resultados, este método presentó falsos negativos, especialmente en cepas portadoras de NDM, tal y como se describe en los ensayos de la propia técnica y en la literatura [9]. El paso previo de calentamiento de las cepas con el buffer de lisis descrito en este estudio mejoró sustancialmente la visualización de las bandas inmunocromatográficas, evitando confirmación con otras técnicas en un alto porcentaje, y con el consiguiente ahorro económico y disminución del tiempo de respuesta.

En la detección de OXA-48 mediante DI, la especificidad disminuyó un 38% debido al elevado número de cepas portadoras de NDMs falsamente positivas para OXA-48. Por ello, aunque de forma global las 2 técnicas fenotípicas mostraron resultados similares, la baja especificidad de los DI para la detección de OXA-48 deja a esta técnica en clara desventaja, como se ha demostrado en otros estudios [10].

Estos resultados de baja especificidad con los DI y el tiempo de detección más prolongado nos llevaron a utilizar el TIC (modificado con calor) como técnica de elección para el cribado de carbapenemasas, dejando a las técnicas genotípicas, las cuales proporcionaron el mejor rendimiento, como demuestran los datos de BF [11], únicamente para confirmación de cepas dudosas con antibiograma compatible.

Por otro lado, hasta el momento, en nuestro hospital no se han detectado carbapenemasas de tipo IMP ni KPC en Enterobacterales, por lo que no ha sido posible su evaluación, lo que supondría una de las limitaciones de nuestro estudio. Además, el tamaño muestral de otro tipo de MBL no NDM, fue muy pequeño y poco valorable. Por todo ello, es necesario continuar evaluando estas técnicas en todos los tipos de carbapenemasas, y especialmente el nuevo Kit Coris Resist-5 O.K.N.V.I. que incorpora la detección de IMP, empleando además un buffer modificado para mejorar la visualización de las bandas de MBL.

AGRADECIMIENTOS

A bioMérieux, por proporcionarnos parte de los reactivos utilizados en este estudio.

FINANCIACIÓN

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

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Berneking, L., Both, A., Berinson, B., Hoffmann, A., Lütgehetmann, M., Aepfelbacher, M. et al.. Performance of the BD Phoenix CPO detect assay for detection and classification of carbapenemase-producing organisms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 40(5), 979-985. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04094-1>.
- Oteo, J., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Oliver, A., Hornero, A., Ruiz-Garbajosa, P., et al. . La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2014; 32(10), 666-670. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.011>
- Mediavilla-Gradolph, C., Sainz-Rodríguez, R., Valverde-Troya, M., De Toro-Peinado, I., Bermúdez-Ruiz, M. P. & Palop-Borrás, B.. Evaluación de un ensayo inmunocromatográfico para la detección de carbapenemasa OXA-48. *Rev Esp Quimioter.* 2017; 30(1), 45-49. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6317069>.
- Peri, A. M., Bauer, M. J., Bergh, H., Butkiewicz, D., Paterson, D. L. & Harris, P. N.. Performance of the BioFire Blood Culture Identification 2 panel for the diagnosis of bloodstream infections. *Heliyon.* 2022; 8(7), e09983. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09983>.
- Song, W., Park, M. J., Jeong, S., Shin, D. H., Kim, J. S., Kim, H. S., et al.. Rapid Identification of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae From Culture: Evaluation of the RESIST-4 O.K.N.V. Multiplex Lateral Flow Assay. *Ann Lab Med.* 2020; 40(3), 259-263. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.3.259>.
- Mojica, M. F., De La Cadena, E., Correa, A., Appel, T. M., Pallares, C. J. & Villegas, M. V.. Evaluation of Allplex™ Entero-DR assay for detection of antimicrobial resistance determinants from bacterial cultures. *BMC Res. Notes.* 2020; 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04997-4>.
- Rezasoltani S, Yadegar A, Hatami B, Asadzadeh Aghdaei H, Zali MR. Antimicrobial Resistance as a Hidden Menace Lurking Behind the COVID-19 Outbreak: The Global Impacts of Too Much Hygiene on AMR. *Front Microbiol.* 2020 Dec 15;11:590683. doi: 10.3389/fmicb.2020.590683.
- Zhu, Y., Jia, P., Li, X., Wang, T., Zhang, J., Zhang, G., et al.. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis. *Ann. Transl. Med.* 2021; 9(9), 769-769. <https://doi.org/10.21037/atm-20-8216>.
- Greissl, C., Saleh, A. & Hamprecht, A.. Rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM carbapenemases in Enterobacterales by a new multiplex immunochromatographic test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 38(2), 331-335. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3432-2>
- Koroska, F., Göttig, S., Kaase, M., Steinmann, J., Gatermann, S., Sommer, J., et al.. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(3), 877-883. <https://doi.org/10.1128/jcm.01929-16>.
- Baeza, L. L., Pfennigwerth, N., Greissl, C., Göttig, S., Saleh, A., Stelzer, Y., et al.. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 25(10), 1286.e9-1286.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.003>.