Bacterias productoras de carbapenemasas
Un reto para el siglo XXI

Diagnóstico microbiológico de microorganismos productores de carbapenemasa

Dra. María Isabel Morosini Reilly
Servicio de Microbiología y Parasitología

Hospital Ramón y Cajal
Madrid
instituto ramón y cajal de investigación sanitaria

5 de junio de 2014

Enterobacterias
Carbapenemasas adquiridas

Carbapenemes: puntos de corte 2014

Carbapenem	CLSI		EUCAST	
	S	R	S	R
Imipenem	≤1	≥4	≤2	>8
Meropenem	≤1	≥4	≤2	>8
Ertapenem	≤0.5	≥2	≤0.5	>1
Doripenem	≤1	≥4	≤1	>2

CARBAPENEMASAS

- Se asocian a:
  - microorganismos multirresistentes (clones de alto riesgo)
  - elementos genéticos transferibles (plásmidos, transposones)

- Su inferencia fenotípica puede ser compleja

- Elevada repercusión en el manejo del paciente, escasas opciones terapéuticas
  - *asociaciones carbapenemes + otros antimicrobianos:*
    colistina, tigeciclina, amicacina, fosfomicina, nitrofurantoína, rifampicina…

LAS CARBAPENEMASAS *in vivo*: breves consideraciones

- El valor de la **CMI** que informa el laboratorio es un **marcador subrogado** de la posible **actividad *in vivo*** de los **carbapenemes**

- La inferencia de la actividad *in vivo* del o de los carbapenem(es) puede no implicar éxito clínico

- Factores condicionantes: hospedador, antibiótico, microorganismo

La necesidad de emplear asociaciones de antibióticos para el tratamiento de las infecciones causadas por gramnegativos productores de carbapenemasas está demostrada clínicamente

RANGO DE CMI DE CARBAPENEMES *vs.* ENTEROBACTERIAS

Carbapenemasa	**Imipenem**	**Meropenem**	**Ertapenem**
KPC	0.5 – >32	0.5 – >32	0.5 – >32
IMP / VIM / NDM	0.5 – >32	0.5 – >64	0.38 – >32
OXA-48/181 y otras OXA-	0.25 – 64	0.38 – 64	0.38 – 64

Nordmand P *et al*. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 432-8

Carbapenemasas-Características

Clase molecular	A	B	D
Sitio activo	Serina-70	Zinc (Zn^{++}) (Metalo- β lactamasa)	Serina-67
Enzimas	KPC, GES…	VIM, IMI, NDM, GIM, SPM…	OXA….
Localización genética más frecuente	Plásmidos Transposones	Plásmidos Transposones	Plásmidos Transposones
Especies más frecuentes	Enterobacterias (*K. pneumoniae*) *Pseudomonas* spp.	*Pseudomonas* spp. Enterobacterias	*Acinetobacter baumannii* Enterobacterias
Inhibición *in vitro*	Ácido borónico (±Clavulánico)	EDTA (Ácido dipicolínico)	(NaCl)*
AZTREONAM	R	S	S
Nivel (tipo) de expresión de la resistencia	Alto (Heterogénea)	Medio (Heterogénea)	Medio-Bajo

* Todas las enterobacterias con carbapenemasa de tipo OXA son resistentes a temocilina (≥ 128 µg/ml)

CARBAPENEMASAS

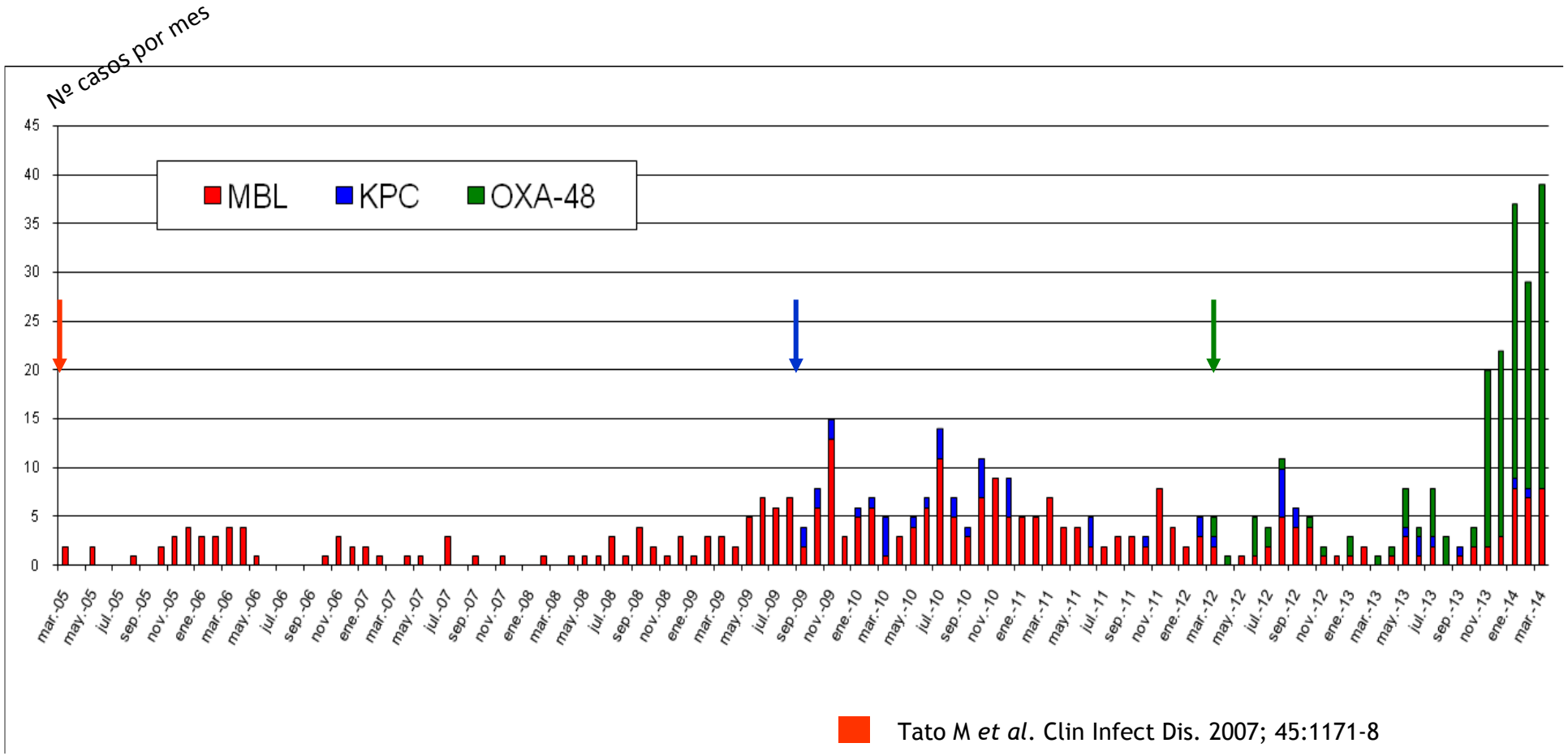
CLASE A	CLASE B	CLASE D
KPC-	VIM-, IMP-, NDM-	OXA-
Perfil de resistencia variable		
Sensibilidad a diferentes inhibidores		
Gran capacidad de dispersión		

Dispersión de las carbapenemasas

- MUNDIAL
- NACIONAL
- LOCAL

Enterobacterias productoras de carbapenemasas
Servicio de Microbiología- Hospital Universitario Ramón y Cajal-Madrid

Datos proporcionados por la Dra. Patricia Ruiz Garbajosa



Tato M *et al*. Clin Infect Dis. 2007; 45:1171-8

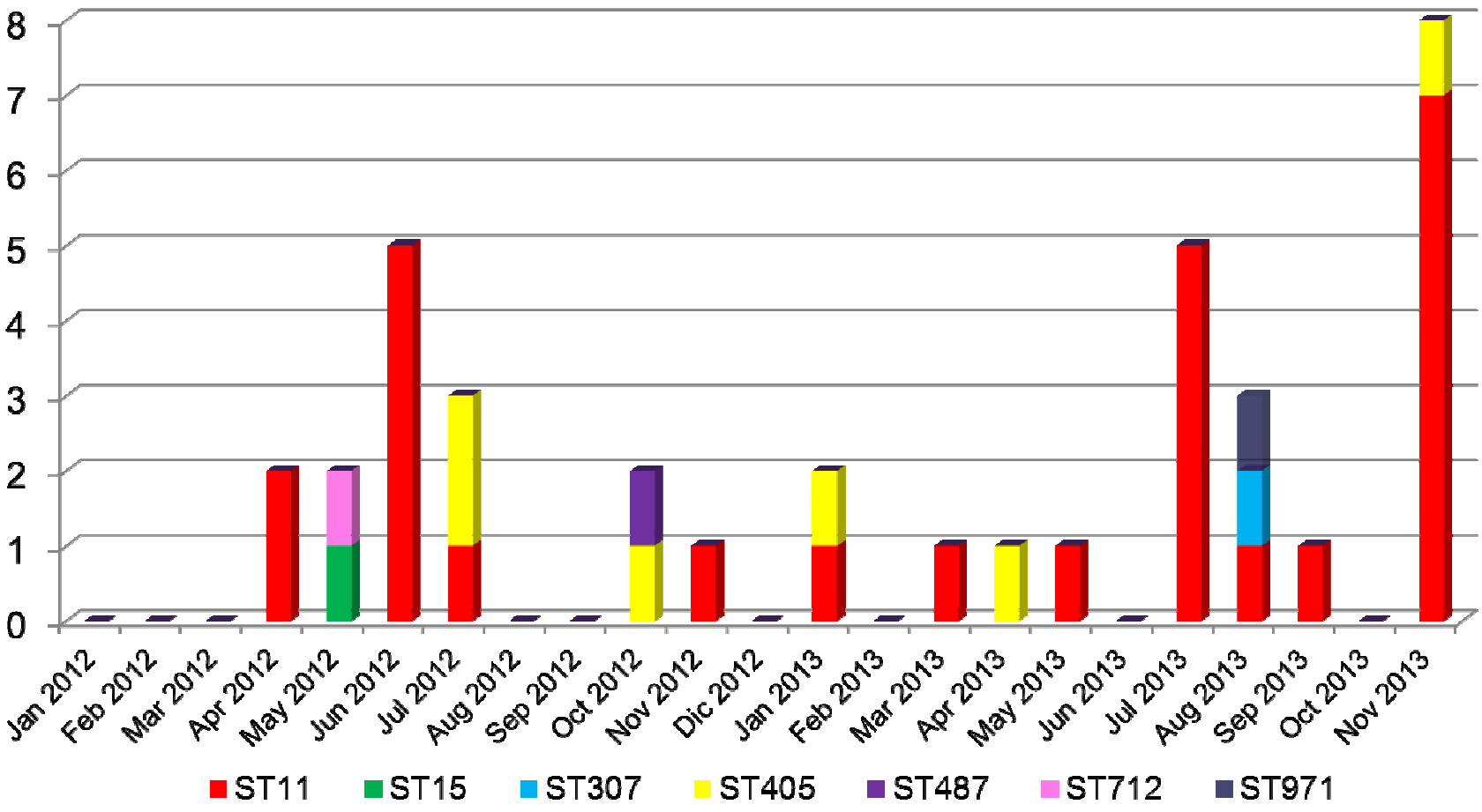
Curiao T *et al*. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1608-14

Gijón Cordero D *et al*. ECCMID. Berlín. P1272-2013

K. pneumoniae OXA-48 ± BLEE- Servicio de Microbiología

Hospital Universitario Ramón y Cajal-Madrid

Datos proporcionados por la Dra. Desirèe Gijón Cordero



*Enero-febrero 2014: 12/28 *K. pneumoniae* corresponden a ST11

OXA-48: Hospital Ramón y Cajal

Mayo 2014

- Hospital Universitario Ramón y Cajal-Madrid (2012-….)

  K. pneumoniae: OXA-48 ± CTX-M15 ± VIM-1 ±…..

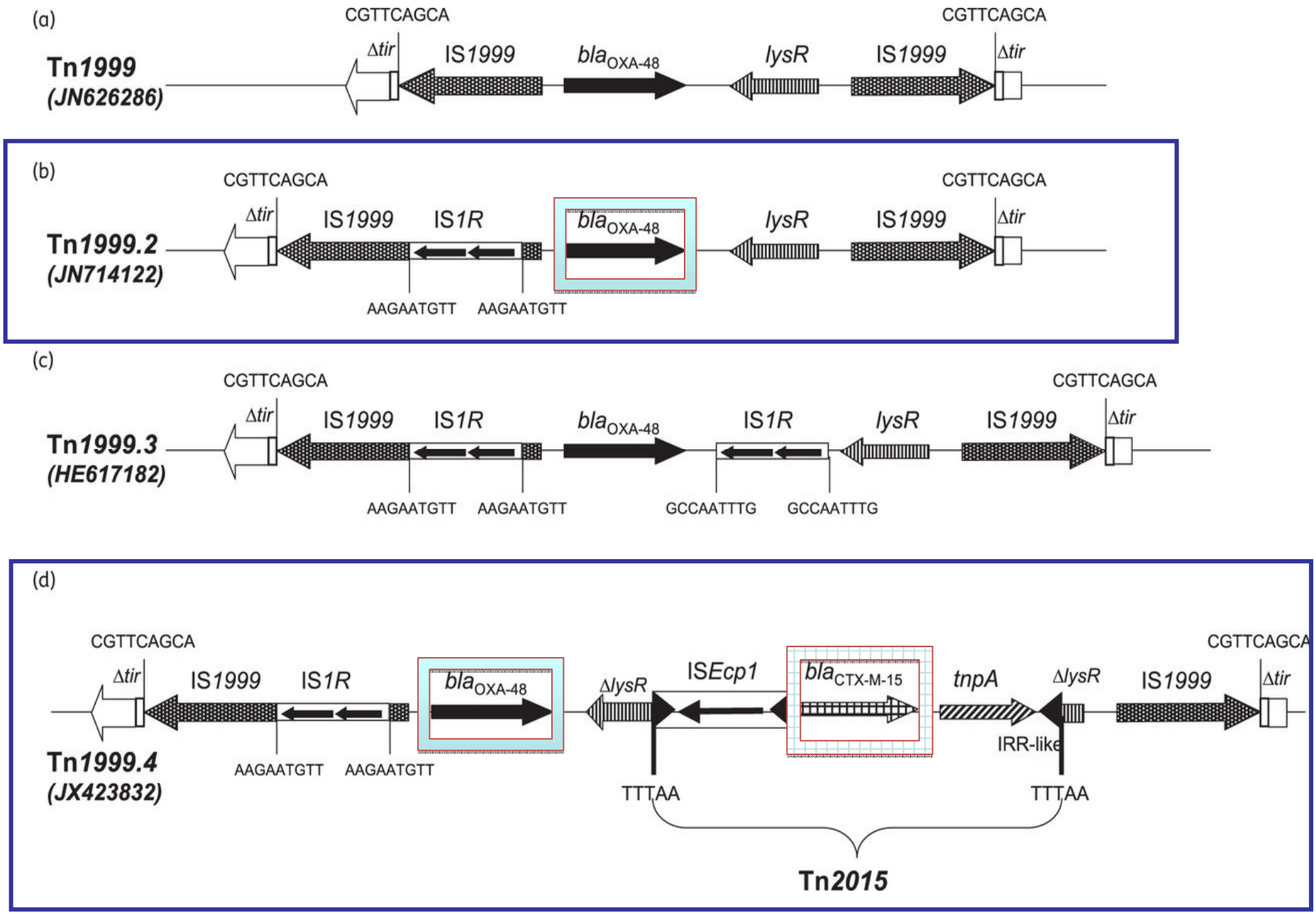
  Clon predominante de *K. pneumoniae*: ST11 (y otros clones)

  Otras enterobacterias: *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. cloacae, E. aerogenes*, *S. marcescens,*

  C. koseri, C. amalonaticus…

Papel de los diferentes STs de *K. pneumoniae*?

Tsouvelekis et al. AAC. 2013; 57: 5144-46



Potron et al. J Antimicrob Chemother. 2013; 68:476-7

Potron et al. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:467-71

Diagnóstico microbiológico de microorganismos productores de carbapenemasa

Carbapenemasas: métodos para su detección *in vitro*

- CMI
- Medios cromógénicos
- Test de Hodge modificado
- Sinergia de carbapenemes frente a inhibidor(es)
- Métodos colorimétricos rápidos
- Método espectrofotométrico (referencia)
- Espectrometría de masa
- Métodos moleculares

CMI

- Puntos de corte: productoras de carbapenemasas pueden ser "S"
- EUCAST: ECOFF (*Screening cut-off*) www.eucast.org
  Meropenem: mejor relación sensibilidad-especificidad
  Ertapenem: buena sensibilidad pero menor especificidad (cepas AmpC^{+})

CARBAPENEM	PUNTO CORTE (S, μg/ml)	*Screening cut-off* (μg/ml) *
Imipenem	≤ 2	> 0,125
Meropenem	≤ 2	> 1
Ertapenem	≤ 0,5	> 0,125

* Atención: rango de concentraciones de los paneles comerciales

“The carbapenem breakpoints for *Enterobacteriacea*e will detect all clinically important resistance mechanisms (including the majority of carbapenemases). Some isolates that produce carbapenemase are categorised as susceptible with these breakpoints and should be reported as tested, *i.e.* the presence or absence of a carbapenemase does not in itself influence the categorisation of susceptibility. In many areas, carbapenemase detection and characterisation is recommended or mandatory for infection control purposes.”

EUCAST-2014 y CLSI 2014

Medios cromogénicos

- Cribado, portadores (rectales). Control epidemiológico

"La concentración de carbapenem en algun(os) medios es elevada y pueden tener menor sensibilidad. Utilizar como concentración el valor del ECOFF propuesto por EUCAST"

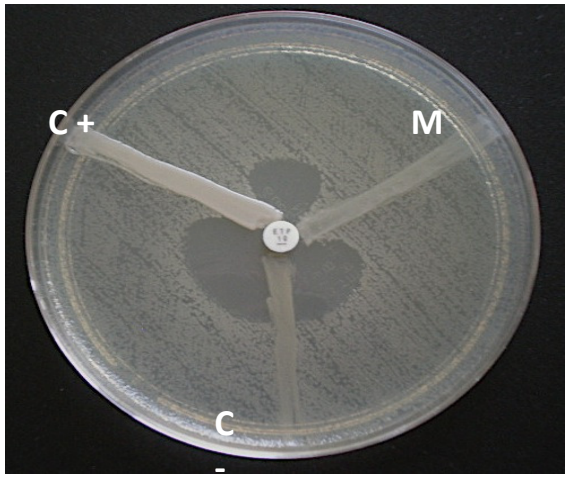
C. Giske. ECCMID 2014

Girlich *et al*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 75: 214-7

Test de Hodge modificado

- Realización: CLSI-M100 S24 (Tabla 3B)

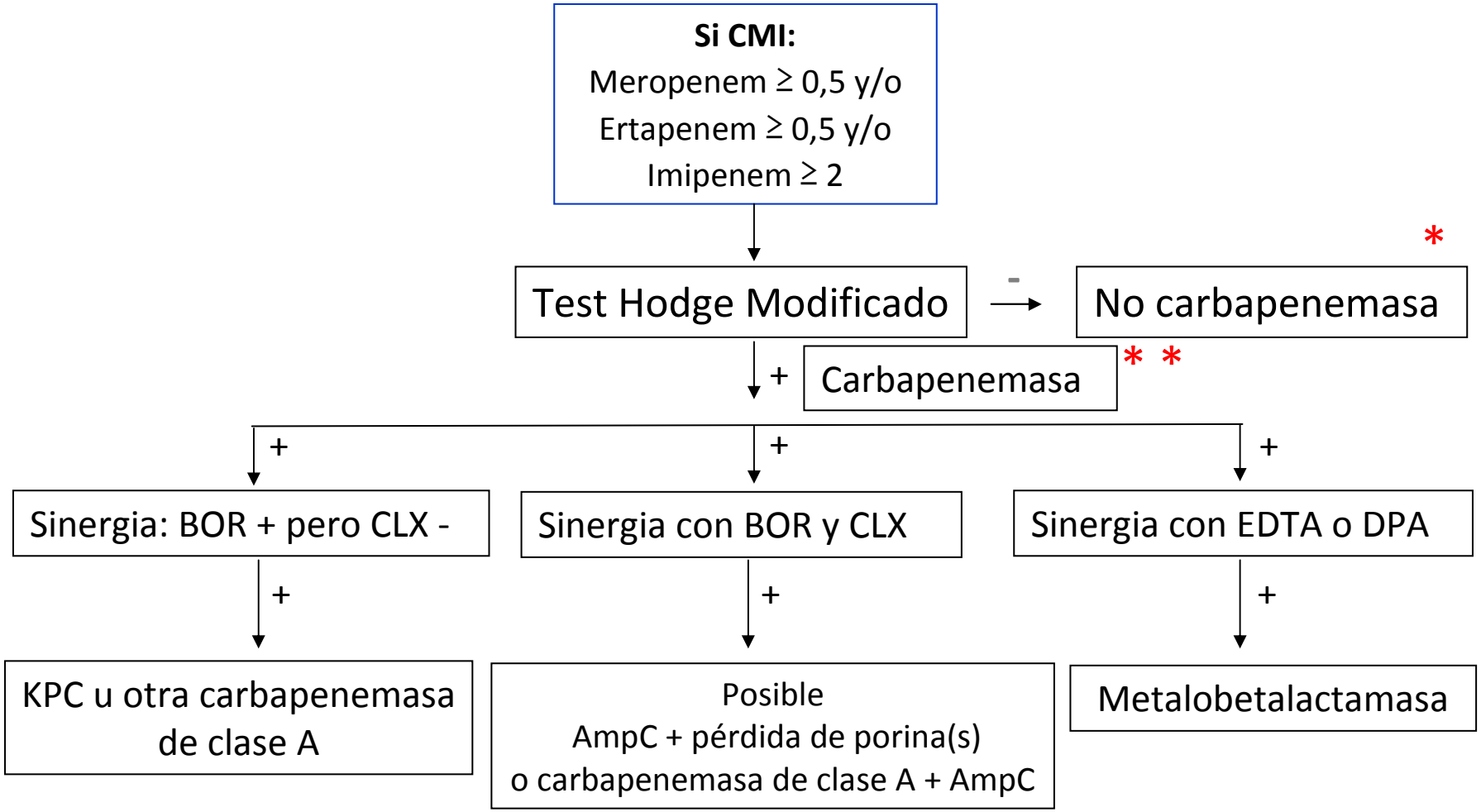
- Cepa indicadora: *E. coli* ATCC 25922
- Control +: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705
- Control -: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706



- ✓ CLSI 2014: si se usan los nuevos puntos de corte, el MHT sólo debería hacerse por razones epidemiológicas o de control de infecciones
- ✓ No todas las enterobacterias productoras de carbapenemasa dan MHT positivo (ej. NDM, 11%) (y viceversa)

Enterobacterias
Algoritmo para la detección de carbapenemasas *in vitro*

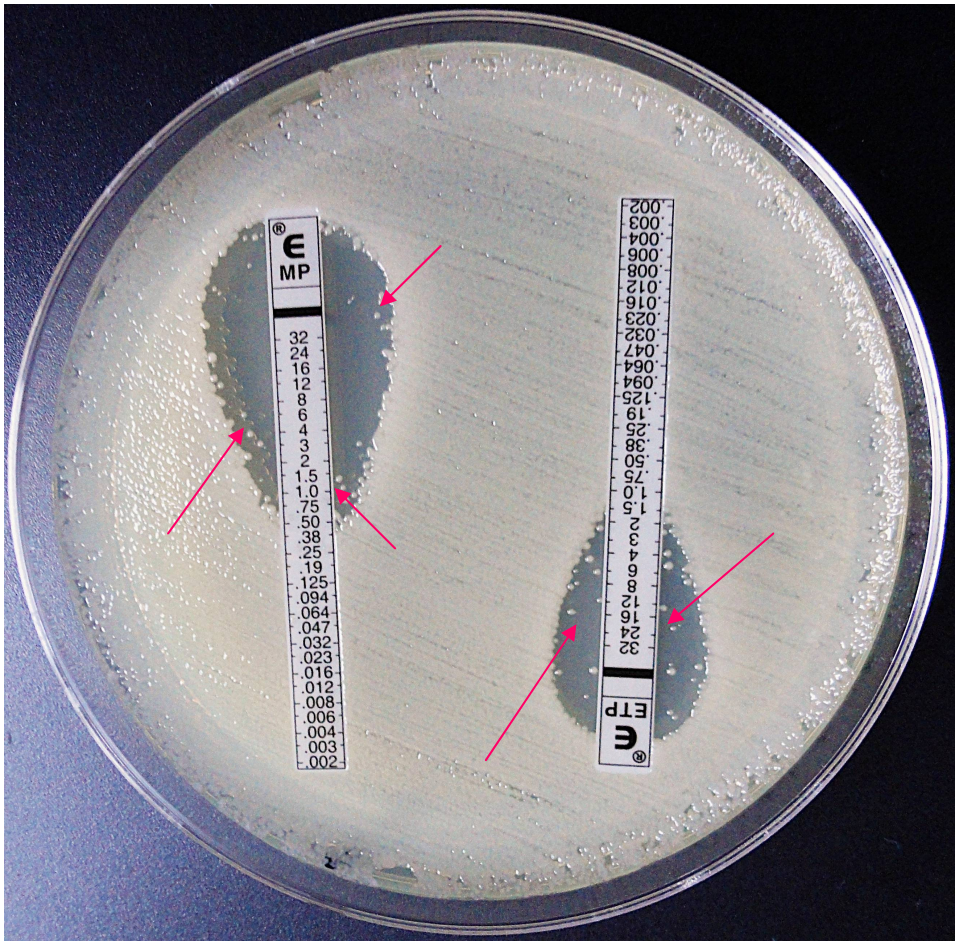
Adaptado de Navarro F *et al*. Enf Inf Microbiol Clin 2011; 29: 524-34



*Posibilidad de falsos negativos

** Posibilidad de falsos positivos

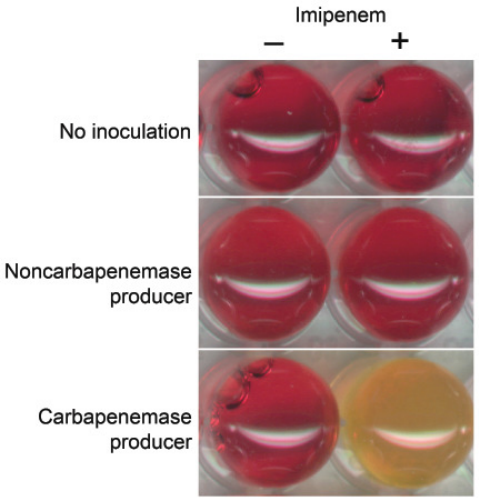
K. pneumoniae-carbapenemasa: tira de gradiente de CMI



Lectura a las 18-20 h (48 h temperatura ambiente

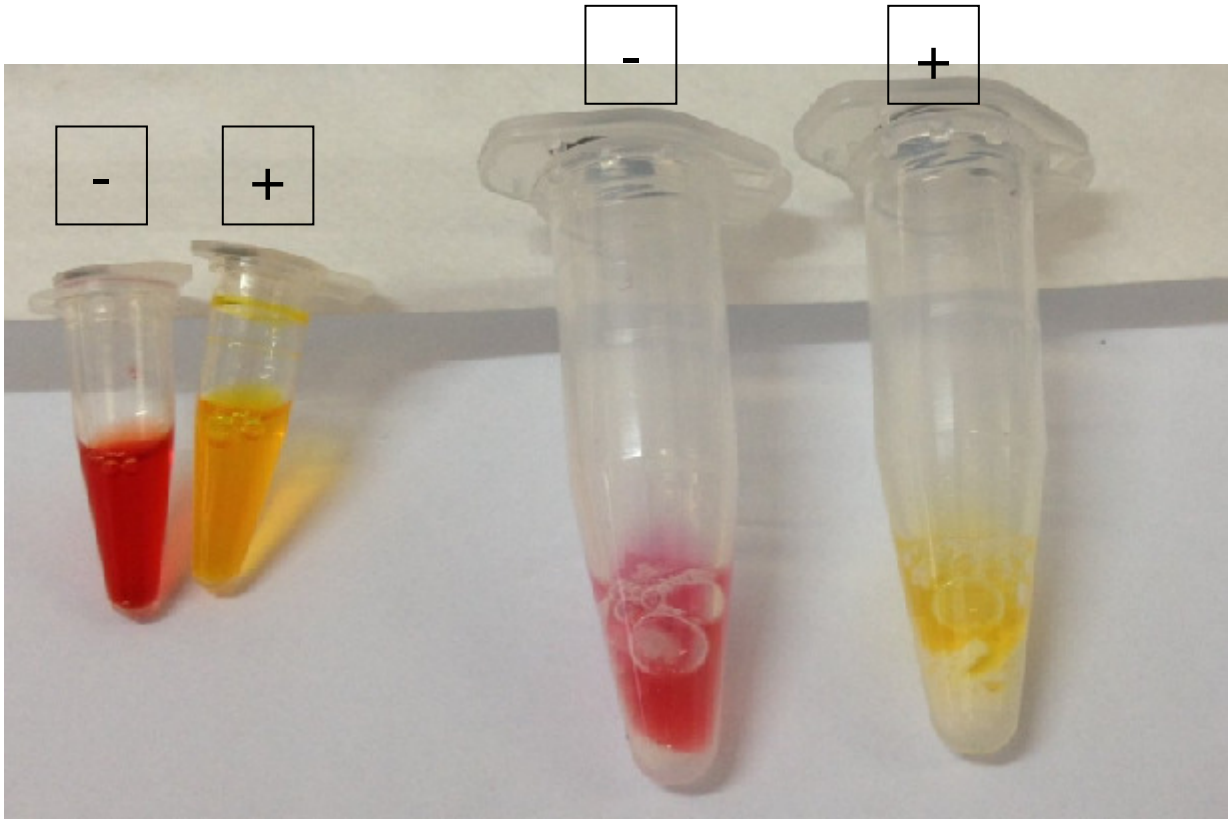
Métodos colorimétricos (rápidos)

Carba NP Test



Nordmann P *et al*. Emerging Infectious Diseases 2012;18:1503-7

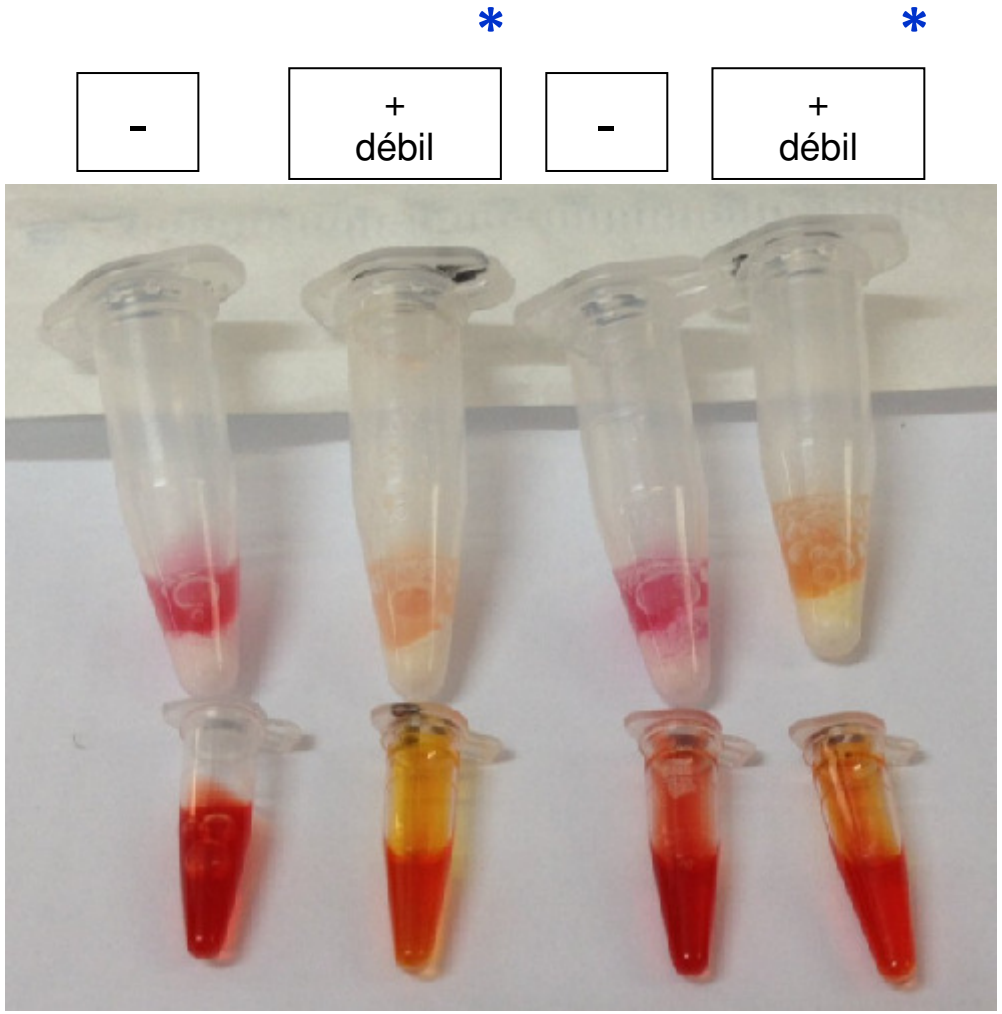
Carba NP Test



"Convencional"
según Nordmann *et al*.

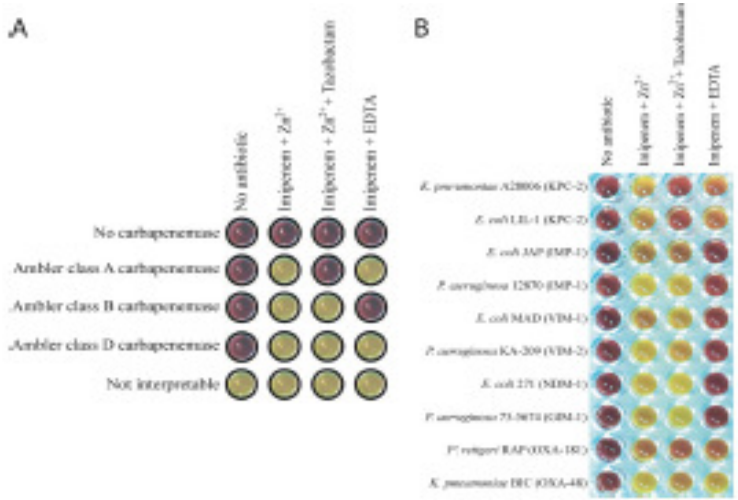
Rapid CARB Screen kit
ROSCO DIAGNOSTICA

Carba NP Test. Cont.



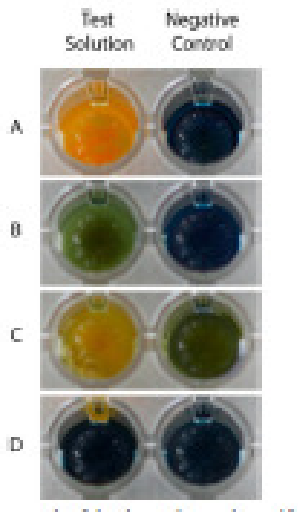
*Frecuente con OXA-48 y variantes

Carba NP Test II



Dortet *et al*. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: 6437-40

Blue Carba



Pires *et al*. J Clin Microbiol. 2013; 51: 4281-3

Métodos moleculares (no fenotípicos) para la detección de carbapenemasas

- PCR

  - Convencional-*Multiplex*-Secuenciación
  - Tiempo real

- SECUENCIACIÓN "MASIVA"

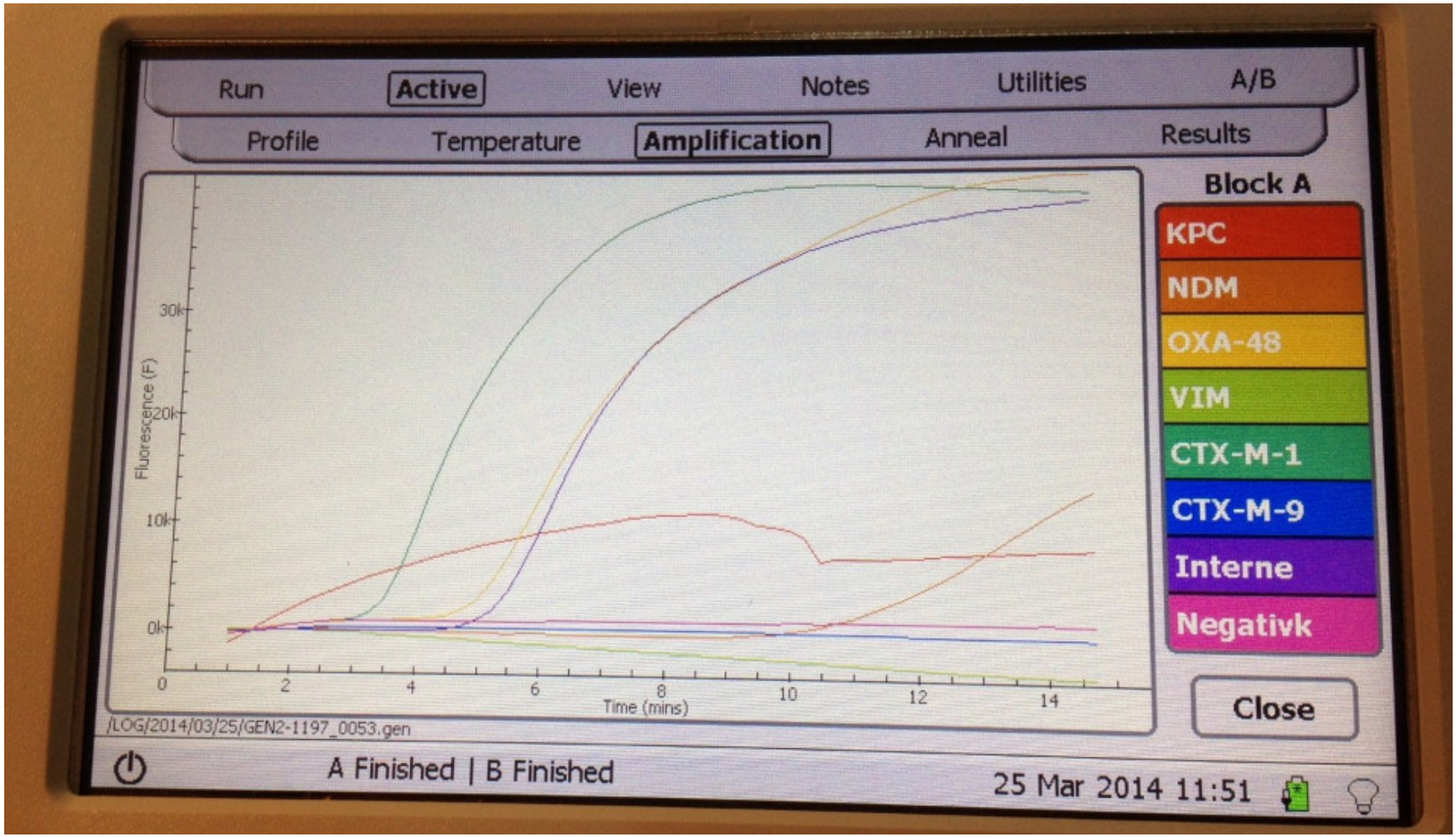
- *MICROARRAYS*

- ESPECTROMETRÍA DE MASA

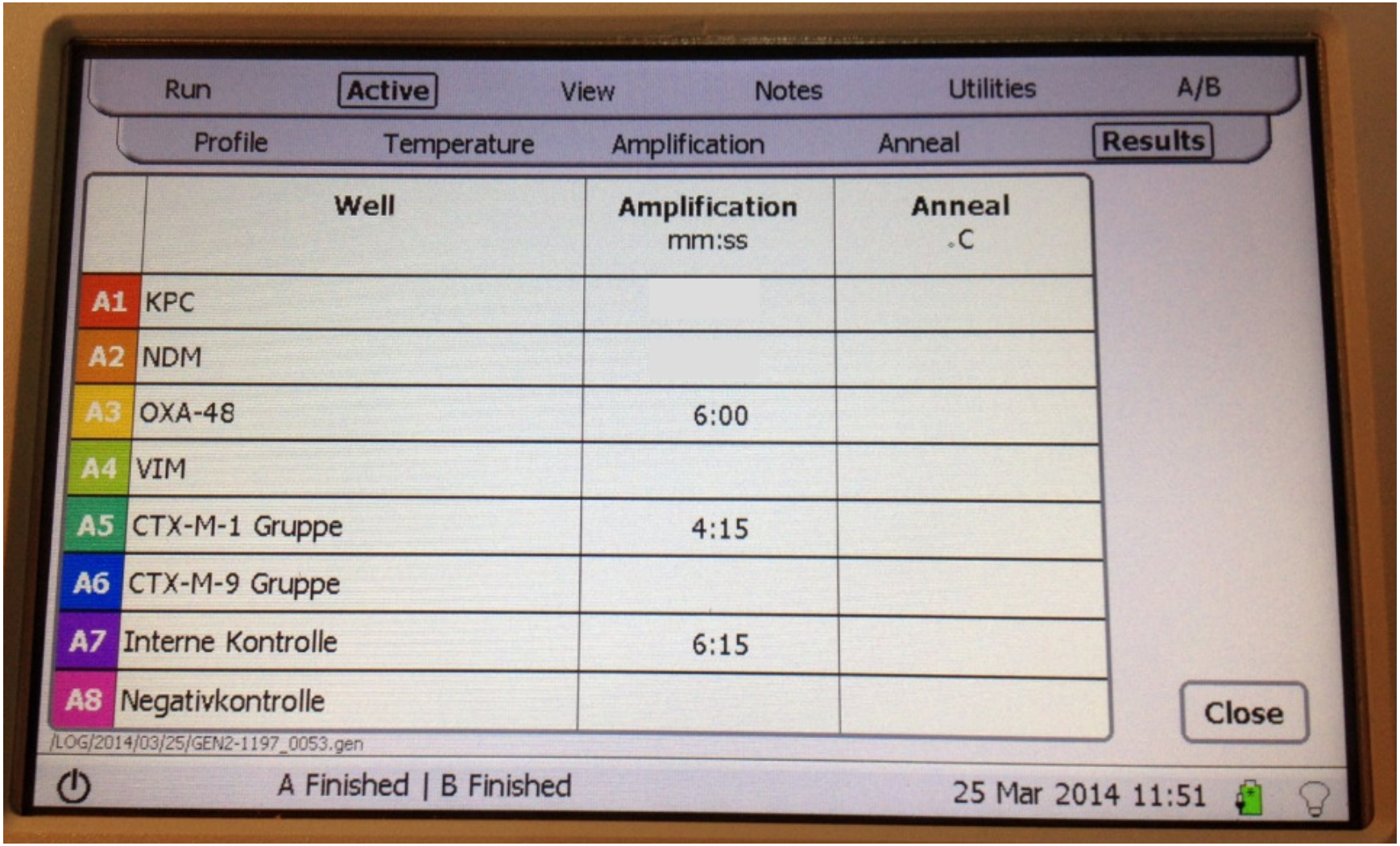
  - MALDI-TOF MS
  - PCR/ESI MS

Lupo A *et al*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 77: 179-94

Amplificación isotérmica (tiempo real)



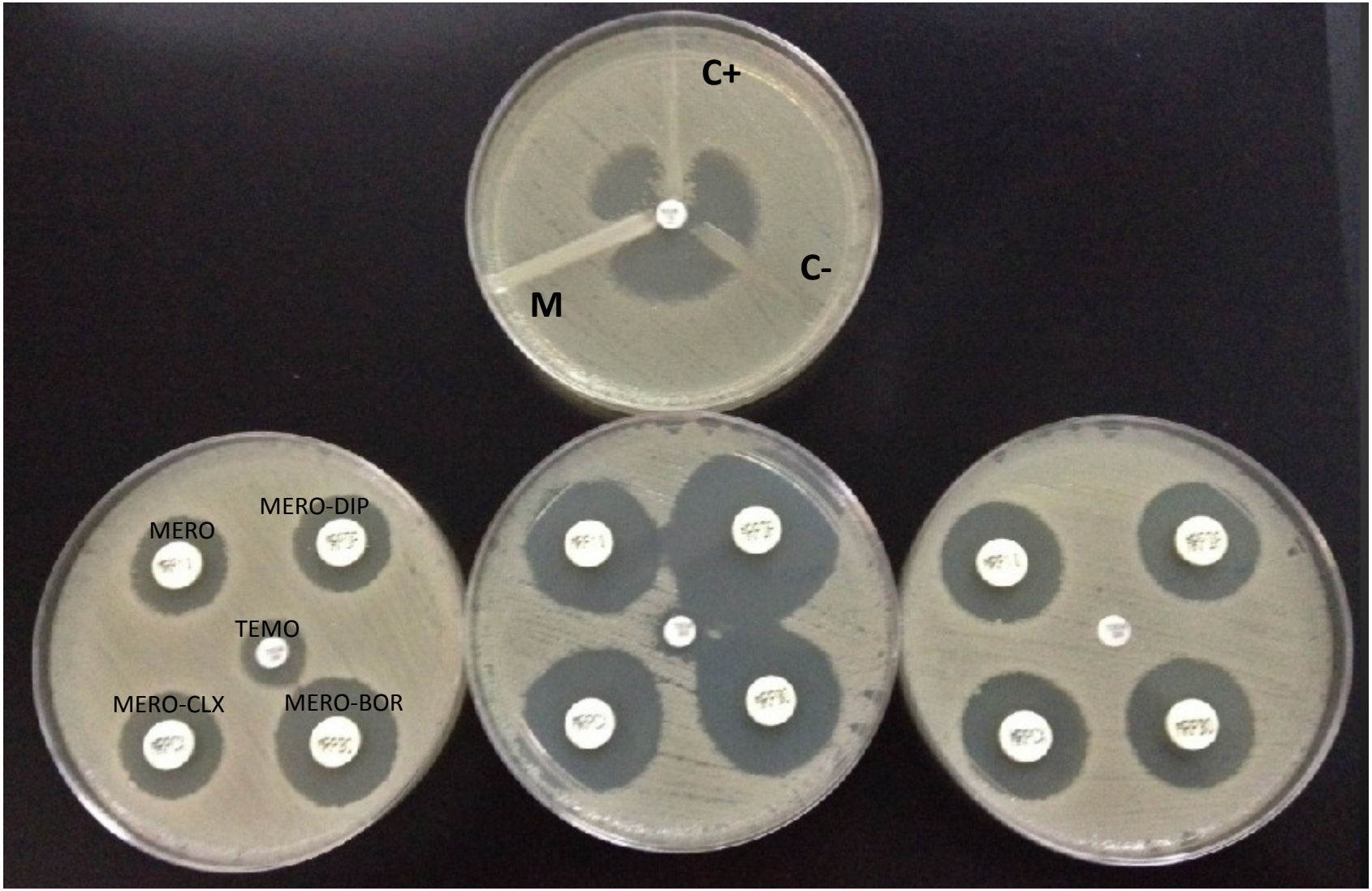
eazyplex® SuperBug CRE-amplex BIOSYSTEMS


Run
Active
View
Notes
Utilities
A/B
Profile
Temperature
Amplification
Anneal
Results
Well
Amplification mm:ss
Anneal °C
A1 KPC
A2 NDM
A3 OXA-48 6:00
A4 VIM
A5 CTX-M-1 Gruppe 4:15
A6 CTX-M-9 Gruppe
A7 Interne Kontrolle 6:15
A8 Negativkontrolle
Close
/LOG/2014/03/25/GEN2-1197_0053.gen
A Finished | B Finished
25 Mar 2014 11:51

Inferencia de los tipos de carbapenemasas
Interpretación fenotípica

- ✓ Perfil de sensibilidad antibiótica (CMIs)
- ✓ Uso de inhibidores
- ✓ *Test* de Hodge modificado

RyC-Aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasa



M1: KPC M2: MBL M3: OXA-48

SERVICIO:	ONCOLOGIA MEDICA H	**AISLADO (1):**	99.3% 3001 KLEBSIELLA PNEUMONIAE
Nº MUESTRA:	09138475	**BIOTIPO:**	77744372
Nº PETICION:			
MUESTRA:	ORINA	**PANEL:**	95B
ANALISIS:	UROCULTIVO	**HEMOLISIS:**	**CATALASA:** **OXIDASA:** -

ANTIMICROBIANOS	C.M.I.	REAL
AMOXICILINA	>16	R
AMOXICILINA/CLAVULANICO	>16/8	R
PIPERACILINA/TAZOBACTAM	>64/4	R
CEFALOTINA	>8	R
CEFUROXIMA	>16	R
CEFOXITINA	>16	R
CEFTAZIDIMA	>16	R
CEFTAZIDIMA/CLAVULANICO	>8/4	-
CEFOTAXIMA	>8	R
CEFOTAXIMA/CLAVULANICO	>8/4	-
CEFEPIME	>8	R
AZTREONAM	>8	R
IMIPENEM	>8	R
MEROPENEM	>8	R
ERTAPENEM	>4	R
GENTAMICINA	<=2	S
TOBRAMICINA	<=4	S
AMIKACINA	<=4	S
NITROFURANTOINA	<=64	S
ACIDO NALIDIXICO	<=16	S
CIPROFLOXACINA	<=0.12	S
MINOCICLINA	8	I
TRIMETOPRIM/SULFAMETOXAZOL	<=2/38	S
FOSFOMICINA	>64	R
COLISTINA	<=4	S

M1: CARBAPENEMASA
CLASE A: KPC-3

Servicio de Microbiología

Nombre		Nº Muestra		Estado	**Final**
Historia		Muestra	HERIDA (TORUNDA)	Fecha	29/10/2013
F. Nacimiento		Servicio	CIR. MAXILOFACIAL H	Sección	EXUDADOS 1
Procedencia - - -		Habitación	""		

Aislamiento	Microorganismo	Fecha Resultado	Estado
E1	**Klebsiella pneumoniae**	02/11/2013	Final
E2	**Klebsiella pneumoniae Carbapenemasa**	02/11/2013	Final

E1 K. pneumoniae

Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	<=8/4	S
Pip/Tazo	<=8	S
Cefalotina	<=8	S
Cefazolina	<=8	S
Cefuroxima	16	S
Cefoxitina	<=8	S
Cefotaxima	<=1	S
Cefotaxima/A C...	<=0.5	- - -
Ceftazidima	<=1	S
Ceftazidima/A ...	<=0.25	- - -
Cefepima	<=1	S
Imipenem	<=1	S
Ertapenem	<=0.5	S
Aztreonam	<=1	S
Gentamicina	<=2	S
Tobramicina	<=2	S
Amicacina	<=8	S
Ciprofloxacina	<=0.5	S
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

E2 K pneumoniae CAR

Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	R
Cefoxitina	>16	R
Cefotaxima	>32	R
Cefotaxima/A C...	>4	- - -
Ceftazidima	>16	R
Ceftazidima/A ...	>2	- - -
Cefepima	>16	R
Imipenem	4	R
Ertapenem	4	R
Aztreonam	<=1	S
Gentamicina	<=2	S
Tobramicina	8	R
Amicacina	<=8	I
Ácido Nalidíxico	<=16	S
Ciprofloxacina	<=0.5	S
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

M2: CARBAPENEMASA
CLASE B: MBL

M3: CARBAPENEMASA CLASE D: OXA-48

Klebsiella pneumoniae OXA-

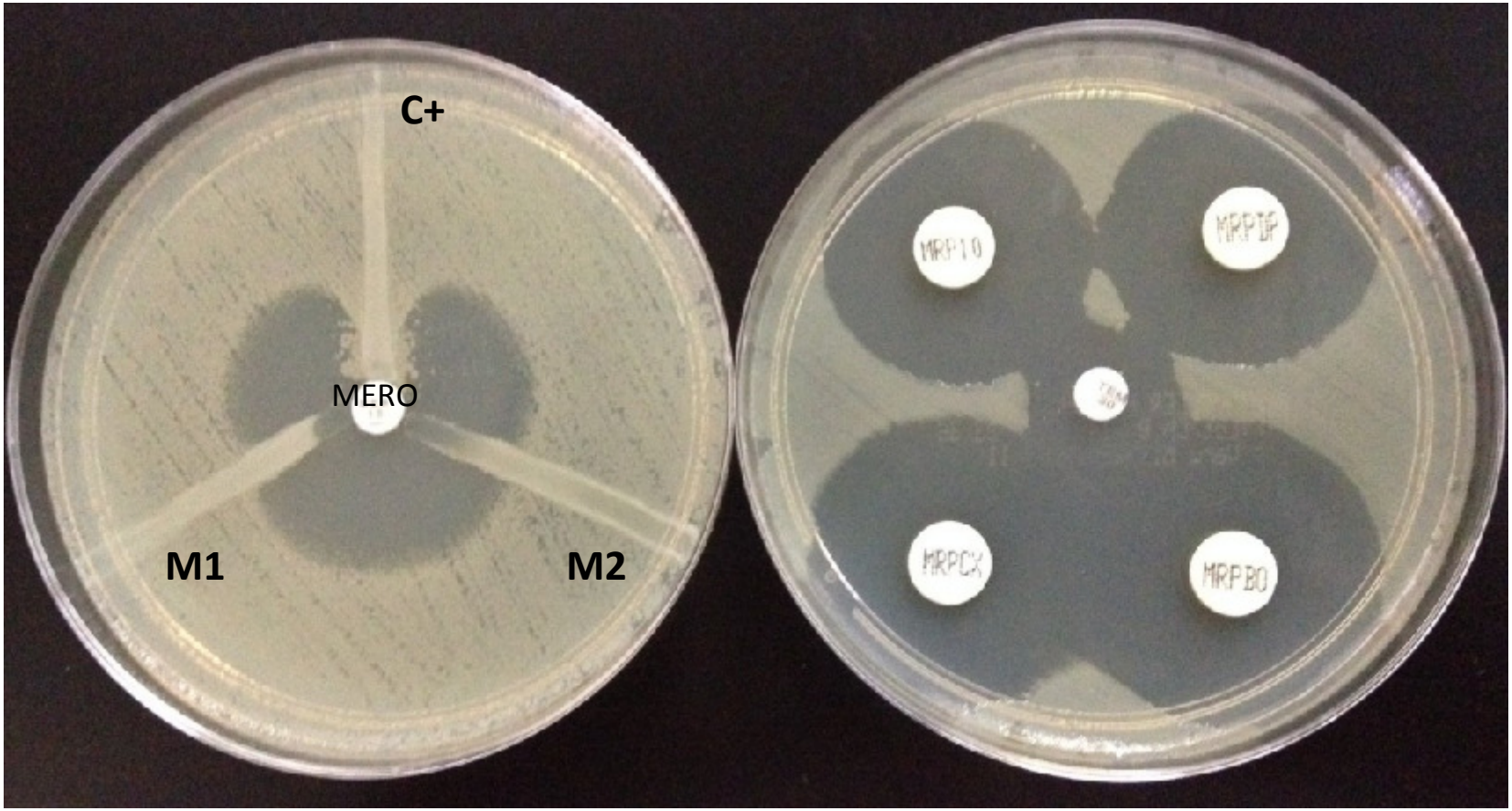
Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	16	I
Cefuroxima	8	S
Cefoxitina	<=8	S
Cefotaxima	<=1	S
Cefotaxima/A C...	<=0.5	- - -
Ceftazidima	<=1	S
Ceftazidima/A ...	<=0.25	- - -
Cefepima	<=1	S
Imipenem	2	S
Ertapenem	2	R
Aztreonam	<=1	S
Gentamicina	>8	R
Tobramicina	<=2	S
Amicacina	<=8	S
Ciprofloxacina	>2	R*
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

Klebsiella pneumoniae OXA-48+BLEE

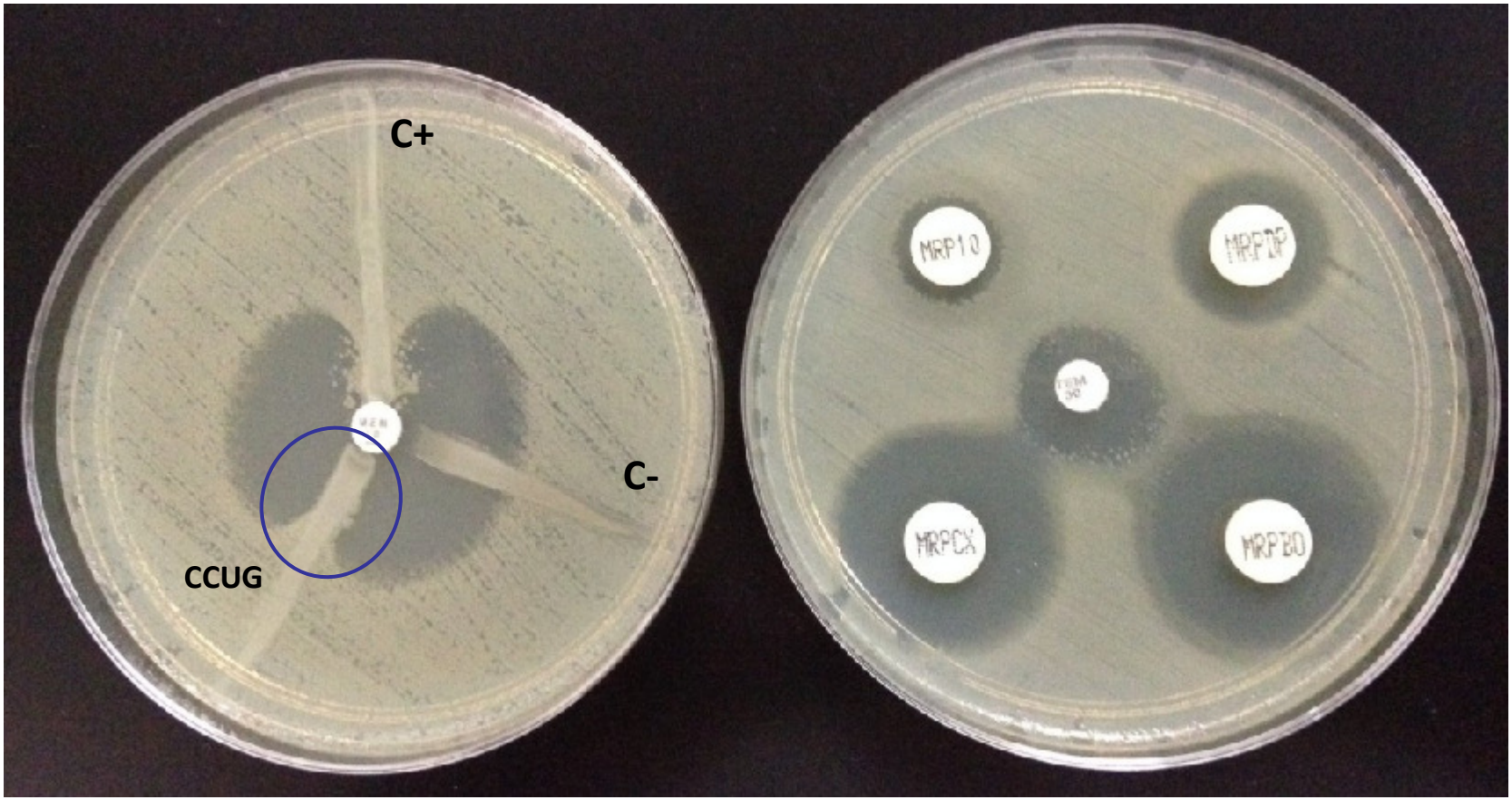
Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	R
Cefoxitina		R
Cefotaxima		R
Cefotaxima/A C		- - -
Ceftazidima		R
Ceftazidima/A ...		- - -
Cefepima	16	R
Imipenem	2	R
Ertapenem	>1	R
Gentamicina	>8	R
Tobramicina	>8	R
Ácido Nalidíxico	>16	R
Norfloxacina	>1	R*
Ciprofloxacina	>2	R*
Nitrofurantoina	>64	R
Fosfomicina	>64	R
Trimet/Sulfa	>4/76	R

S
Amicacina
Colistina
Tigeciclina

RyC: ***E. cloacae*** isogénicos-M1: AmpC hiperproducida-M2: AmpC basal



E. cloacae (CCUG 59627) * hiperproductor de AmpC + déficit de expresión de porina(s)



* Gentileza Dr. C. Giske-EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms www.eucast.org

Servicio de Microbiología

Nombre		Nº Muestra	CCUG59627	Estado	
Historia	CG	Muestra		Fecha	
F. Nacimiento		Servicio		Sección	
Procedencia	- - -	Habitación	- - -		

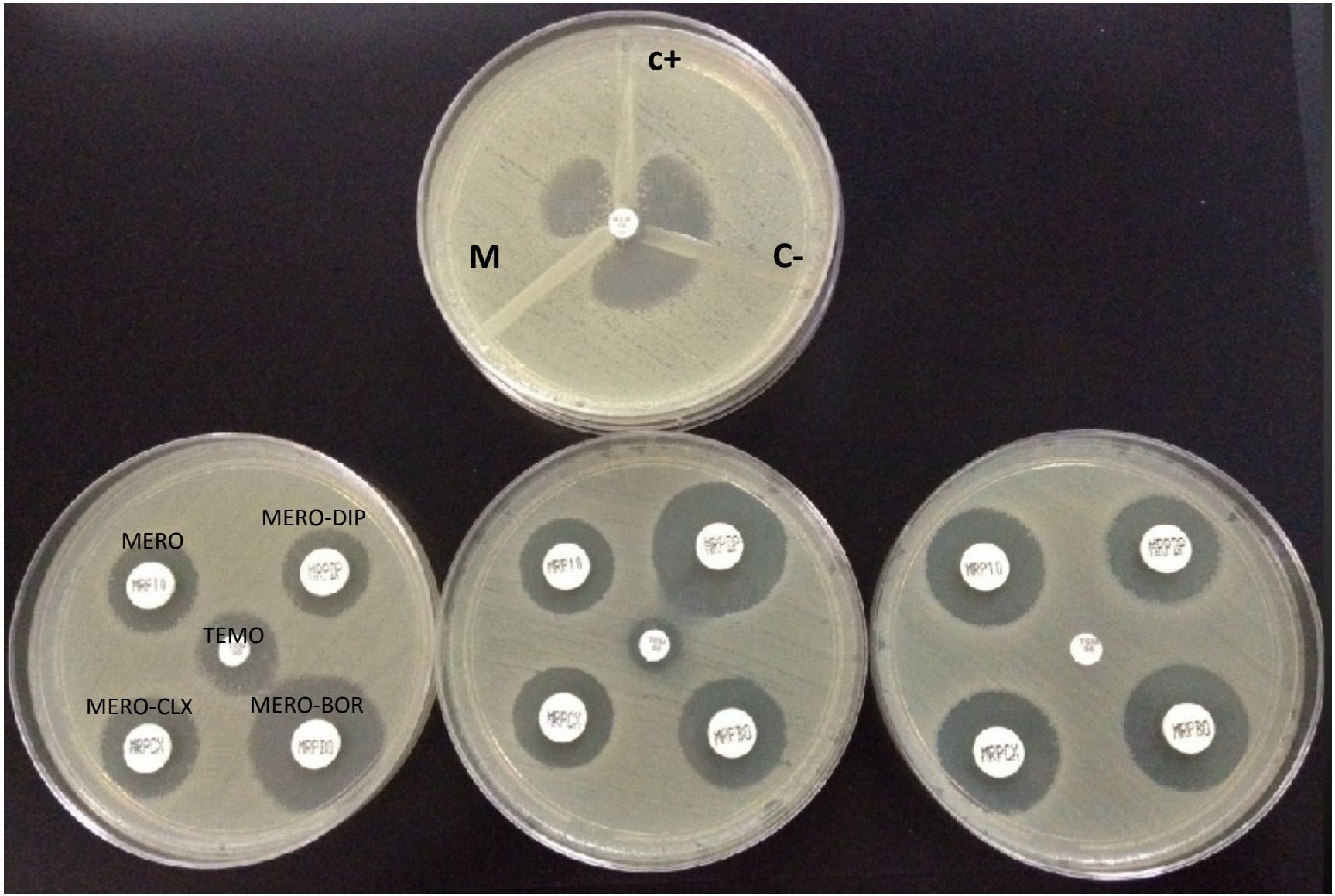
Aislamiento	Microorganismo	Fecha Resultado	Estado
1	**Enterobacter cloacae**	29/03/2013	Final

1 E. cloacae

Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	R
Cefoxitina	>16	R
Cefotaxima	>32	R
Cefotaxima/A C...	>4	- - -
Ceftazidima	>16	R
Ceftazidima/A ...	>2	- - -
Cefepima	8	I
Imipenem	>8	R
Ertapenem	>4	R
Aztreonam	>16	R
Gentamicina	<=2	S
Tobramicina	<=2	S
Amicacina	<=8	S
Ciprofloxacina	<=0.5	S
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

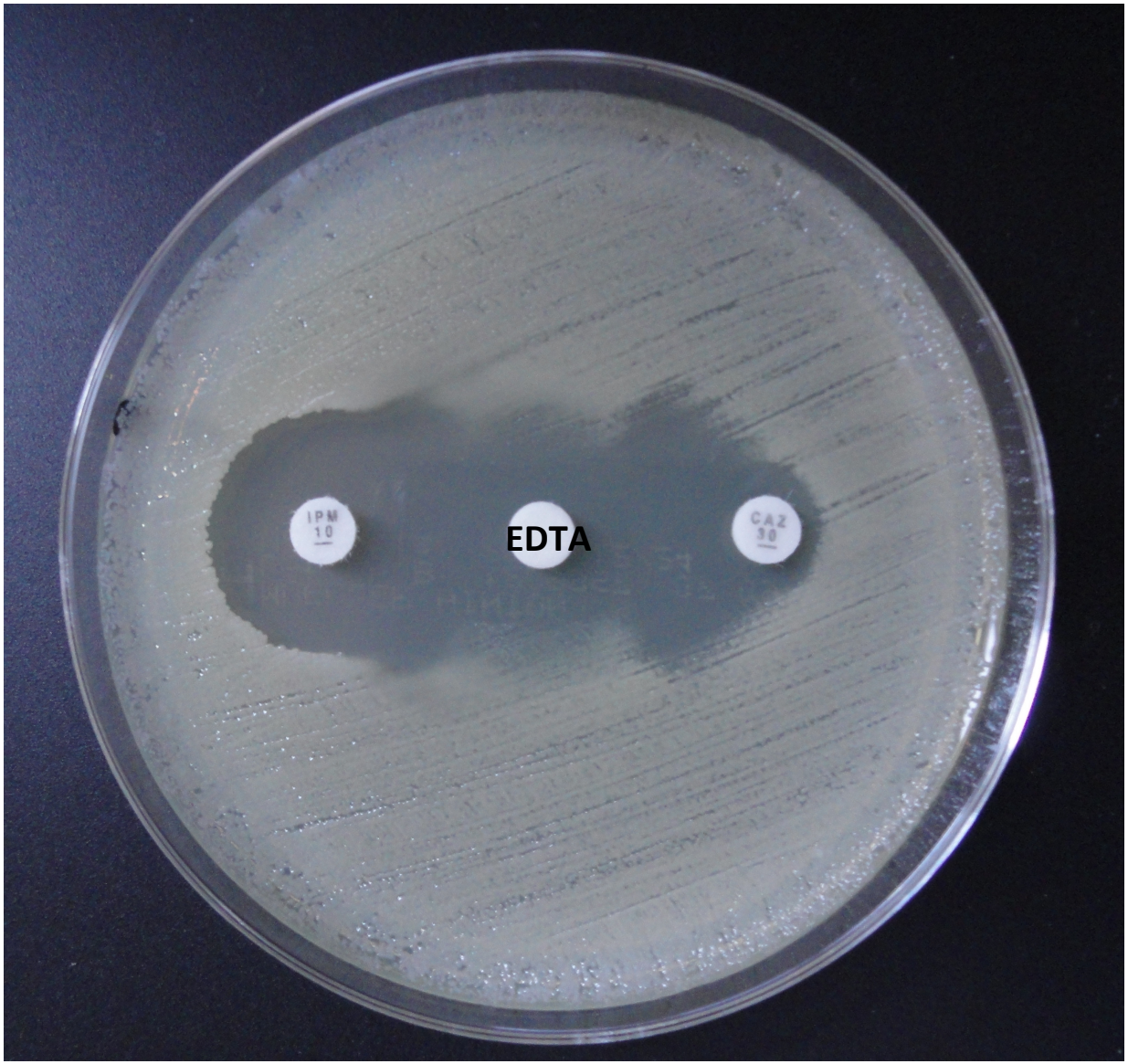
Hiperproducción AmpC +por -

RyC-Aislados de *E. cloacae* productores de carbapenemasa



M1: KPC M2: MBL M3: OXA-48

E. cloacae productor de MBL



Servicio de Microbiología

Nombre		Nº Muestra	**14069347**	Estado	
Historia		Muestra	CONTROL EPIDEMIOLOGICO	Fecha	
F. Nacimiento	22/07/1949	Servicio	HEMATOLOGIA H	Sección	
Procedencia	MEDICINA PREVENTIVA	Habitación	802		

Aislamiento	Microorganismo	Fecha Resultado	Estado
E1	**Enterobacter cloacae Carbapenemasa**	29/04/2014	Final

E1 E.cloacae CAR

Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	R
Cefoxitina	>16	R
Cefotaxima	>32	R
Cefotaxima/A C...	>4	- - -
Ceftazidima	>16	R
Ceftazidima/A ...	>2	- - -
Cefepima	>16	R
Imipenem	>8	R
Ertapenem	>4	R
Aztreonam	>16	R
Gentamicina	<=2	S
Tobramicina	<=2	S
Amicacina	<=8	S
Ácido Nalidixico	>16	- - -
Ciprofloxacina	<=0.5	S
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

M1: KPC

Servicio de Microbiología

Nombre		Nº Muestra		Estado
Historia		Muestra	CONTROL EPIDEMIOLOGICO	Fecha
F. Nacimiento	18/11/1954	Servicio	NEUMOLOGIA H	Sección
Procedencia	- - -	Habitación	5I24-1	

Aislamiento	Microorganismo	Fecha Resultado	Estado
E1	**Enterobacter cloacae Carbapenemasa**	26/05/2014	Final

E1 E.cloacae CAR

Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	- - -
Cefoxitina	>16	R
Cefotaxima	>32	R
Cefotaxima/A C...	>4	- - -
Ceftazidima	>16	R
Ceftazidima/A ...	>2	- - -
Cefepima	>16	R
Imipenem	>8	R
Ertapenem	>4	R
Aztreonam	<=1	S
Gentamicina	<=2	S
Tobramicina	8	R
Amicacina	<=8	I
Ácido Nalidíxico	>16	- - -
Ciprofloxacina	>2	R*
Trimet/Sulfa	<=2/38	S
Tigeciclina	<=1	S

M2: VIM-1 (MBL)

Servicio de Microbiología

Nombre	..	Nº Muestra		Estado
Historia		Muestra	ABSCESO/EX.PURULENTO...	Fecha
F. Nacimiento 01/08/1994		Servicio	TRAUMATOLOGIA H	Sección
Procedencia MEDICINA PREVENTIVA		Habitación	203	

Aislamiento	Microorganismo	Fecha Resultado	Estado
1	**Enterobacter cloacae**	10/08/2012	Final

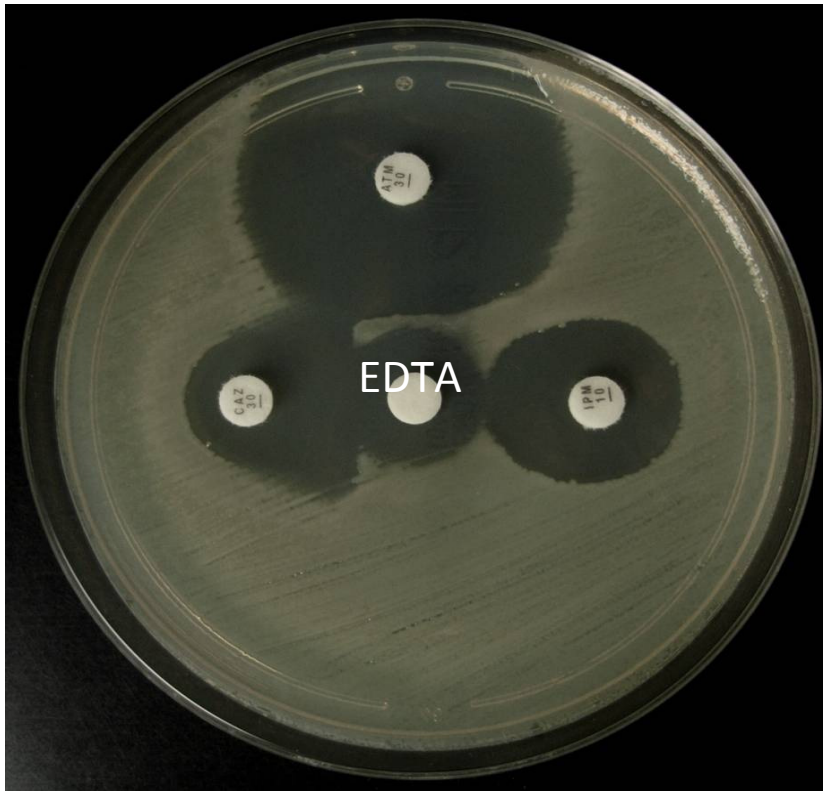
1 E. cloacae

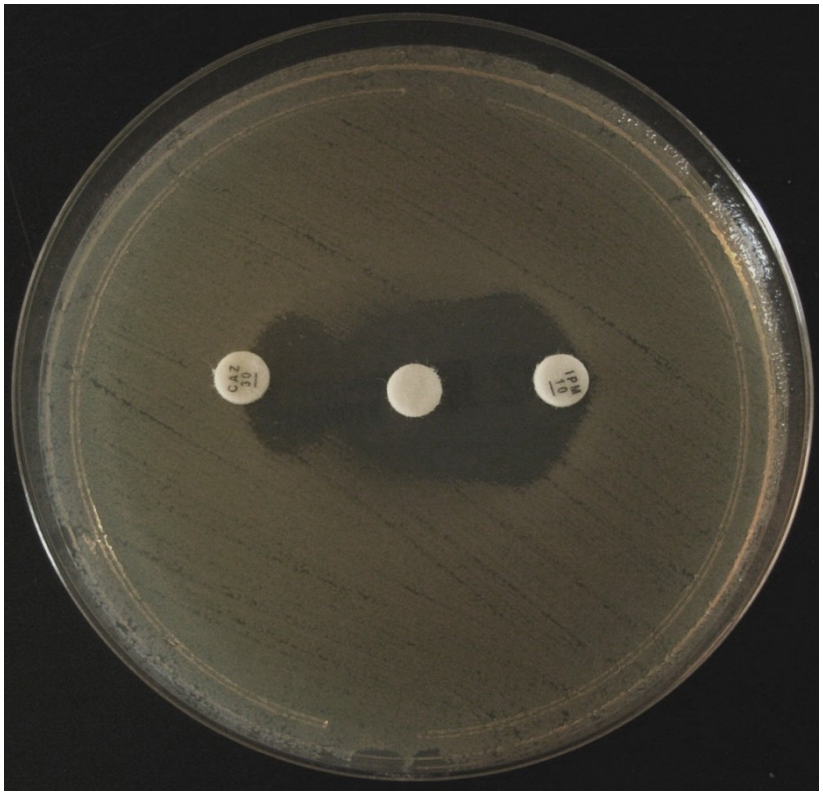
Antimicrobiano	CIM	Final
Ampicilina	>16	R
Amox/A Clav	>16/8	R
Pip/Tazo	>64	R
Cefalotina	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefuroxima	>16	R
Cefoxitina	>16	R
Cefotaxima	32	R
Cefotaxima/A C...	>4	- - -
Ceftazidima	>16	R
Ceftazidima/A ...	>2	- - -
Cefepima	8	R
Imipenem	<=1	R
Ertapenem	4	R
Aztreonam	>16	R
Gentamicina	>8	R
Tobramicina	8	R
Amicacina	<=8	S
Ciprofloxacina	>2	R*
Trimet/Sulfa	>2/38	R
Tigeciclina	<=1	S

M3: OXA-48

Sinergia con disco de EDTA
(“no comerciales”)

K. pneumoniae VIM-1: Sinergia con EDTA

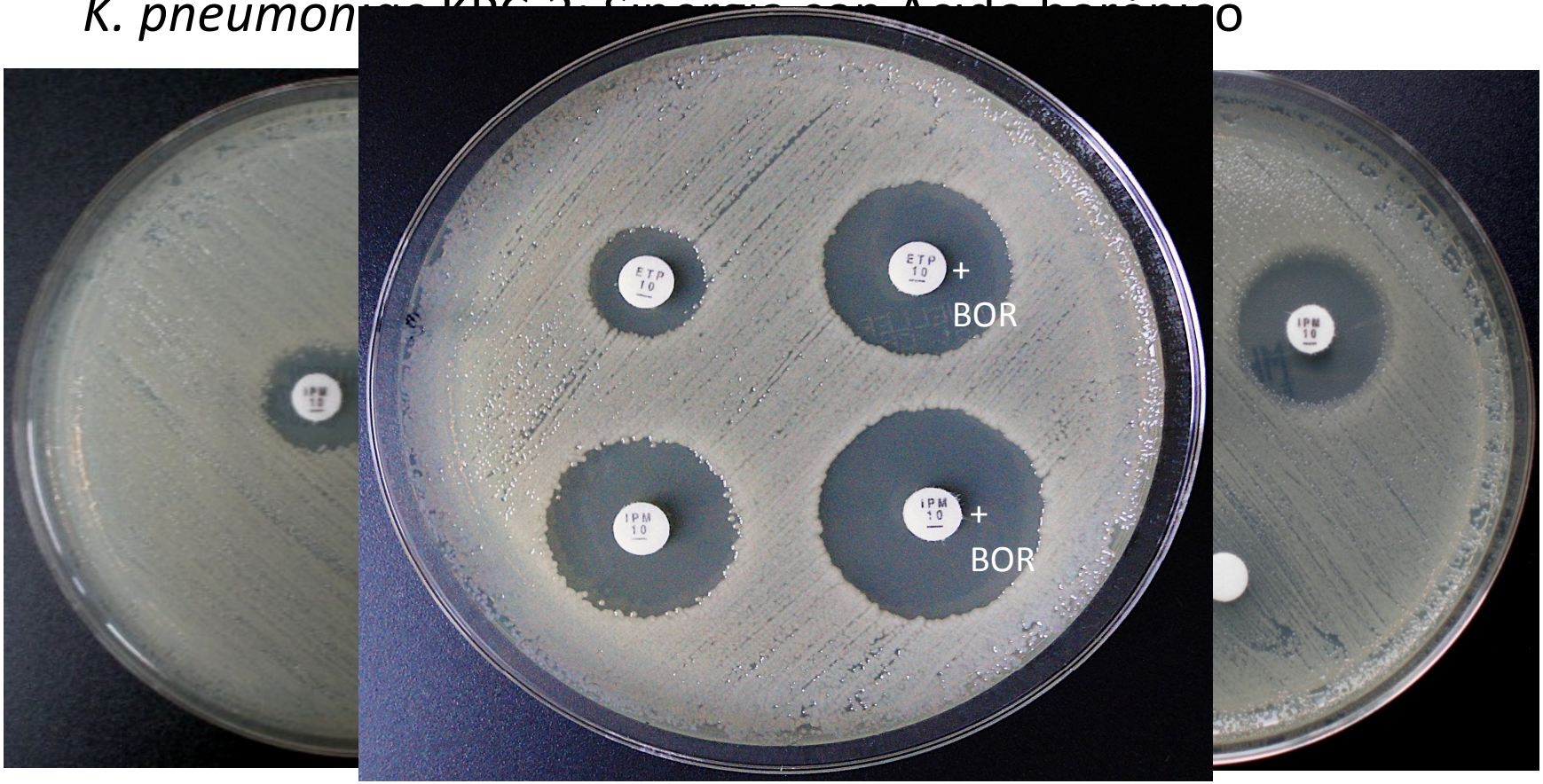




Giske *et al*. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 552-6

Sinergia con Ácido borónico
(discos “no comerciales”)

K. pneumonia KPC 2: Sinergia con Ácido borónico



IMP y ácido borónico
(aproximación)

IMP + ácido borónico
(impregnación)

“Critical to the success of interrupting cross-transmission of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a health care facility is the timely identification of colonized and/or infected patients. Thus, <u>every clinical microbiology laboratory should establish reliable detection methodology</u>”

Tzouvelekis LS *et al*. Clin Microbiol Rev. 2012; 25: 682-707