



Características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Paula Losada Pardo

Estudiante de Bacteriología

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

Bacterióloga

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Bacteriología

Bogotá, D.C., Colombia

2018

Características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*.



Directora

Beatriz Elena Ariza Ayala

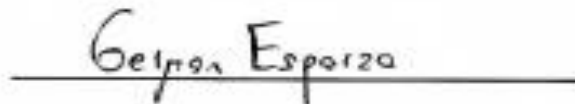
Bacterióloga Magister Microbiología.
Coordinadora de investigación y Desarrollo del Laboratorio Clínico del Hospital
Universitario San Ignacio



Codirectora

Alba Alicia Trespalacios

Bacterióloga
Directora Posgrados Facultad de Ciencias Básicas Pontificia Universidad
Javeriana, Bogotá, Colombia



Par evaluador

German Francisco Esparza Sánchez

Bacteriólogo
Especialista en microbiología clínica

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23, resolución N°13 de julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia que siempre me apoyo en este arduo camino, gracias por enseñarme que puedo conseguir cualquier sueño, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A la Dra. Beatriz Ariza y Dra. Alba Alicia Trespacios por ser mis mentoras y un gran pilar en el desarrollo de este trabajo.

A las todas las doctoras del área de microbiología del Hospital Universitario San Ignacio, muchas gracias por su apoyo.

Pero, sobre todo... a Dios por ser mi pilar más grande.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN.....	11
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. DISEÑO METODOLÓGICO	20
6.1. Tipo de estudio	20
6.2. Criterios de inclusión.....	20
6.3. Criterios de exclusión.....	20
6.4. Tamaño de la muestra	20
6.5. Control de calidad	20
6.6. Análisis estadístico.....	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1. Viabilidad de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos del cepario de un hospital de cuarto nivel de complejidad.....	22
7.2. Método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM)	22
7.3. Test de sinergismo con EDTA.....	23
7.4. Método GeneXpert.....	23
8. RESULTADOS.....	25
8.1. Sensibilidad y especificidad del método modificado de inactivación de carbapenémicos comparado con GenXpert	28

8.2. Sensibilidad y especificidad del test de sinergismo con EDTA con GenXpert	29
8.3. Comparación de los resultados obtenidos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos y el test de sinergismo con EDTA	29
8.4. Comparación de los resultados obtenidos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos y GenXpert	30
8.5. Comparación de los resultados obtenidos por el test de sinergismo con EDTA y GenXpert	31
9. DISCUSIÓN	36
10. CONCLUSIÓN	40
11. RECOMENDACIONES	40
12. BIBLIOGRAFÍA.....	41

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Frecuencia del tipo de muestra	26
Ilustración 2. Frecuencia del servicio.....	26

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación de valores de Kappa. Landis y Koch en 1971.....	21
Tabla 2. Variables del estudio.....	24
Tabla 3. Porcentaje de resistencia a meropenem por año	25
Tabla 4 Porcentaje de intermedio a meropenem por año	25
Tabla 5. Porcentaje de cada una de las MIC para Meropenem	27
Tabla 6. Porcentaje de resistencia a carbapenémicos (Meropenem, Imipenem y Doripenem)	27
Tabla 7. Porcentajes de los resultados del test de sinergismo con EDTA.....	28
Tabla 8. Sensibilidad y especificidad del método modificado de inactivación de carbapenémicos comparado con GenXpert	28
Tabla 9. Sensibilidad y especificidad del test de sinergismo con EDTA comparado con GenXpert.....	29
Tabla 10. Cálculo de índice Kappa de cohen para el método modificado de inactivación de carbapenémicos en comparación con el test de sinergismo con EDTA	30
Tabla 11. Cálculo del índice Kappa de cohen para el método modificado de inactivación de carbapenémicos en comparación con el GenXpert.....	30
Tabla 12. Cálculo del índice Kappa de cohen para el test de sinergismo con EDTA en comparación con el GenXpert.....	31
Tabla 13. Falsos negativos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos.....	32
Tabla 14. Falsos positivos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos.....	32
Tabla 15. Falsos positivos por el test de sinergismo con EDTA.....	33
Tabla 16. Falsos negativos por el test de sinergismo con EDTA	34
Tabla 17. Genes detectados por la prueba molecular GenXpert.....	34
Tabla 18 Frecuencia de clases de carbapenemasas detectadas	35
Tabla 19. Porcentaje de resultados positivos de las pruebas fenotípicas en los aislamientos evaluadas de <i>P. aeruginosa</i>	35

1. RESUMEN

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los microorganismos de mayor importancia clínica no solo por la gran variedad de infecciones intrahospitalarias que causa como bacteriemias, infecciones del tracto urinario e infecciones asociadas a ventilación mecánica, entre otras, sino por la capacidad de diseminación, adaptación y resistencia a múltiples antibióticos. Esta última, se puede presentar por medio de diversos mecanismos como la producción de carbapenemasas, la mayoría de tipo metalo-beta-lactamasas (MBL), lo cual puede llegar a ser una gran amenaza médica por su fácil diseminación plasmídica, representando en el laboratorio clínico un reto considerable.

Actualmente, los métodos utilizados en los laboratorios clínicos para confirmar mecanismos enzimáticos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* son la prueba de sinergismo con EDTA, la cual detecta la presencia de MBL y pruebas de PCR convencional que detectan el gen que codifica para la producción de enzimas involucradas en la resistencia. Ahora bien, el método estándar para detección de resistencia a carbapenémicos sigue siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los diversos antibióticos. En cuanto a técnicas confirmatorias fenotípicas de mecanismos enzimáticos de resistencia a carbapenémicos, existe un nuevo método de bajo costo y rápido de hacer e interpretar que es el método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM), el cual presenta pocos estudios sobre sus características operativas para microorganismos no fermentadores como *P. aeruginosa*.

Objetivo: Determinar las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM) en *Pseudomonas aeruginosa*

Materiales y métodos: Estudio observacional retrospectivo, llevado a cabo en el Hospital Universitario San Ignacio en 160 aislamientos pertenecientes a su cepario entre enero del 2014 y agosto del 2018. Se determinó la sensibilidad (Sn),

especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), además se calculó el coeficiente Kappa de cohen nominal y su intervalo de confianza para determinar la concordancia entre los métodos de estudio y la prueba *Gold Standard* (PCR convencional)

Resultados: Se obtuvo una sensibilidad del 82,4% (IC = 95% (0,72 a 0,89)), especificidad del 97,7% (IC = 95% (0,91 a 0,99)), VPP de 96,8%, un VPN 86,6% y un coeficiente Kappa de 90% (0,900) en el método modificado de inactivación de carbapenémicos y en el test de sinergismo con EDTA se obtuvo una sensibilidad del 65% (IC = 95% (0,46 a 0,81)), especificidad del 92% (IC = 95% (0,86 a 0,95)), VPP de 61%, VPN 93% y un coeficiente Kappa de 61% (0,611). Se encontraron 13 falsos negativos y 2 falsos positivos en el mCIM y se detectaron 7 falsos positivos y 9 falsos positivos en el test de sinergismo con EDTA.

Conclusión: Las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos muestran una sensibilidad de 82% y una especificidad de 98% y el test de sinergismo con EDTA una sensibilidad de 65% y una especificidad de 92%. El método modificado de inactivación de carbapenémicos tiene una concordancia “casi perfecta” y el test de sinergismo con EDTA una concordancia “buena” con respecto a la PCR convencional para la detección de carbapenemasas

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM), Carbapenémicos, Carbapenemasas, Metallo- β -lactamasas, PCR

2. INTRODUCCIÓN

El creciente aumento en las infecciones intrahospitalarias dado principalmente por bacterias multirresistentes se ha convertido en una amenaza para la salud pública, asociado al aumento en la morbilidad, mortalidad, estancia hospitalaria e ineficiencia en el tratamiento (Hong, 2015). *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo no fermentador, es uno de los patógenos oportunistas con mayor prevalencia a nivel clínico, llegando a presentarse entre 10 – 15% a las infecciones hospitalarias (Ocampo, 2015). En Colombia la tasa de incidencia es de 4,7 casos por cada 100.000 personas al año (Valderrama, 2016). Lo anterior, está dado principalmente por la capacidad de colonización, adaptación y multiresistencia, esta última, mediada por diversos mecanismos como la presencia de metalo-beta-lactamasas (MBL) que son enzimas que catalizan la hidrólisis de los β -lactámicos a excepción de los monobactámicos (Palzkill, 2012).

Actualmente, la identificación de estas resistencias se ha convertido en un reto para los laboratorios clínicos y es de suma importancia la evaluación de las características operativas de aquellas pruebas que las evalúan, entre ellas, la prueba de sinergismo con EDTA, la cual detecta la presencia de MBL, la PCR convencional que detecta el gen que codifica para la producción de enzimas involucradas en la resistencia y la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los diversos antibióticos. No obstante, a su lado, existe un nuevo método de bajo costo y que no se aplica en los laboratorios que es el método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM), el cual presenta insuficientes estudios sobre sus características operativas para microorganismos no fermentadores como *P. aeruginosa*.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa responsable de múltiples enfermedades intrahospitalarias, llegando a ser uno de los patógenos oportunistas con mayor importancia clínica. Este patógeno en Colombia se encuentra entre los cinco microorganismos más frecuentes aislados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y ocasiona entre un 10 – 15% a las infecciones hospitalarias (Ocampo, 2015). Entre ellas, la principal es la neumonía asociada a la ventilación mecánica en la UCI; además, se encuentra involucrada en infecciones intrahospitalarias como infecciones de quemaduras extensas o heridas, del tracto urinario o bacteriemia, incrementando los costos de atención a los pacientes por la estancia hospitalaria, los tratamientos con antibióticos de alto espectro y un aumento en el porcentaje de mortalidad (Nicolau, 2010).

Estas infecciones dadas por *P. aeruginosa* primordialmente se encuentran establecidas por la importante capacidad de diseminación, adaptación y resistencia a los antibióticos de esta bacteria. En Colombia en el 2016 según GREBO se presentaron en servicio de UCI para adultos una resistencia a carbapenémicos de Imipenem (IPM) 41,1%, Meropenem (MEM) 28,9% y Doripenem (DOR) 14,7% (Boletín GREBO. Número 9, 2017).

La mortalidad atribuible a las infecciones generadas por esta bacteria varía entre un 35% a un 70%. La resistencia adquirida a carbapenémicos por *Pseudomonas aeruginosa*, se da por varios mecanismos: alteración o pérdida de porinas, bombas de eflujo, hiperproducción de betalactamasas tipo AmpC y la producción de enzimas carbapenemasas. Actualmente los tratamientos más frecuentes utilizados para las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son los carbapenémicos (IPM, MEM y DOR) y las cefalosporinas entre ellas ceftazidima (CAZ). Estos antibióticos a pesar de ser de amplio espectro presentan un gran porcentaje de resistencia, mostrando

así un difícil tratamiento contra estas infecciones y en muchas ocasiones sin efectividad (Nicolau, 2010).

Por otro lado, el diagnóstico y tamizaje de pruebas *in vitro* en microorganismos que presentan múltiples resistencias a los antibióticos muestra un reto considerable actualmente en los laboratorios clínicos, por eso es de suma importancia considerar las características operativas y el control de calidad de cada uno de los métodos a usar. Debido a que actualmente se busca que las pruebas sean más rápidas, más asertivas y de bajo costo, se implementa el uso y desarrollo de nuevas técnicas. Para la detección de carbapenemasas con pruebas fenotípicas en *P. aeruginosa* se inició con el Test de Hodge modificado, pero debido a limitaciones técnicas el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recomienda que solo sea usado en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, más tarde se definió usar la prueba de sinergismo con EDTA y actualmente se utiliza también pruebas bioquímicas y genéticas que son de alta complejidad y costo (Nicolau, 2010).

En el año 2012, Nordman y colaboradores anunciaron un nuevo método fenotípico para la detección de la capacidad de un aislado de hidrolizar el imipenem, a esta prueba se le conoció como Carba NP, aunque presenta una gran ventaja frente a otras pruebas como lo es el test de Hodge modificado, el costo es alto y algunos grupos informan inconvenientes con la prueba en *Pseudomonas aeruginosa*, como la mucosidad de los aislamientos o por carbapenemasas débiles, causan interferencia con la lectura y deficiencia en la hidrolisis del carbapenémico. De ahí se da desarrollo a un nuevo bioensayo alternativo conocido como el método de inactivación de carbapenémicos (mCIM) siendo este altamente sensible, específico y económico (Van der Zwaluw, 2015).

Las pruebas confirmatorias actualmente aplicadas en el laboratorio clínico para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* son el test de sinergismo con EDTA y pruebas moleculares. Estas presentan una limitante, debido a que la prueba de sinergismo con EDTA a pesar de tener buenas características operativas, solo confirma la presencia de MBL y las pruebas moleculares no son

aplicables a todas las muestras por sus altos costos. De ahí surge la necesidad de buscar nuevas metodologías que tengan la capacidad de detectar la presencia de todo tipo de carbapenemasas de forma eficaz y rápida. De ahí, el interés de analizar el método modificado de inactivación de carbapenémicos

Actualmente los estudios que miden las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos son escasos y es por ello, que este trabajo busca determinar y comparar las diferentes características operativas de las herramientas fenotípicas confirmatorias ya instauradas en laboratorio clínico de una institución de cuarto nivel de complejidad, Hospital Universitario San Ignacio, como lo es la prueba de sinergismo con EDTA con aquellas aún no instauradas como lo es el método de inactivación de carbapenémicos, para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*?

4. MARCO TEÓRICO

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo no fermentador, muy versátil, que tiene la capacidad de sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno, puede crecer a una temperatura de 4 a 42°C y con escasas de nutrientes. Por otro lado, *P. aeruginosa* produce un pili tipo IV, el cual le permite tener la capacidad de movimiento independiente del flagelo en superficies sólidas (Ochoa, 2013). Los aislamientos de esta especie son oxidasa positiva y presentan diversas tonalidades debido a la producción de pigmentos como la piocianina (color azul), la pioverdina (color amarillo fluorescente), piomelanina (color marrón) y piorrubina (color rojo), la cual se ve favorecida en temperaturas menores a 37°C y por la presencia de hierro en el medio; pigmentos que son aplicables como marcadores fenotípicos. Adicionalmente, este microorganismo tiene una gran diversidad de factores de virulencia, los cuales le confieren una gran capacidad de patogenicidad, entre ellos se encuentran las fimbrias (pili), flagelos, toxinas, la capacidad de formar biopelículas y una matriz exopolisacárida (Luján, 2014).

En Colombia la tasa de incidencia es de 4,7 casos por cada 100.000 personas al año (Valderrama, 2016), debido a la gran capacidad de colonización y que se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos (Ruiz, 2017). Uno de los nichos con mayor importancia son los hospitales. Actualmente, esta bacteria es uno de los patógenos oportunistas más importantes a nivel clínico debido a que produce una gran variedad de infecciones (Acharya, 2017) como lo es la neumonía asociada a la ventilación mecánica en mayor medida en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Además, se encuentra involucrada en infecciones nosocomiales como infecciones de quemaduras extensas o heridas, del tracto urinario o bacteriemia (Nicolau, 2010).

Las infecciones causadas por este microorganismo están dadas primordialmente por la gran capacidad de adaptación, persistencia, diseminación, la resistencia intrínseca a múltiples drogas y por la habilidad de adquisición de nuevos

mecanismos de resistencia, lo cual provoca que en muchas ocasiones se dé un difícil e ineficaz tratamiento a los pacientes, además de la generación de infecciones nosocomiales relevantes (Ruiz, 2017).

Los medicamentos más utilizados contra *P. aeruginosa* son los carbapenémicos entre estos imipenem, meropenem y doripenem que actualmente presentan un aumento en su resistencia. En Colombia en el 2015 según GREBO se presentaron en servicio de UCI para adultos una resistencia de imipenem (IPM) en un 40,5%, meropenem (MEM) en un 28,7%, doripenem (DOR) en un 8,6%. (Boletín GREBO. Número 8, 2016). Y para 2016 en el mismo servicio se presentó una resistencia de imipenem (IPM) en un 41,1%, meropenem (MEM) en un 28,9%, doripenem (DOR) en un 14,7%; este aumento en la resistencia genera un problema a nivel hospitalario (Boletín GREBO. Número 9, 2017).

Los carbapenémicos son antibióticos que se empezaron a implementar en la década de 1980 y debido a que son de amplio espectro son usados como uno de los últimos recursos contra infecciones graves por bacilos Gram negativos, por lo tanto, hace parte de los antibióticos de última línea para el tratamiento contra enfermedades graves e infecciones bacterianas complicadas como las ocasionadas por *P. aeruginosa* (Sachdeva, 2017). Su acción se ve fundamentada en atravesar la pared celular de la bacteria por medio de las porinas de la membrana externa de bacterias Gram negativas (Estepa, 2017).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos están relacionados con 1) la alteración o pérdida de la porina OprD, la cual se encarga de la difusión de los carbapenémicos, aminoácidos y péptidos pequeños, 2) la sobreexpresión de las bombas de flujo, 3) la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas AmpC y 4) la producción de enzimas carbapenemasas (Estepa, 2017) (Hernández, 2018). Estas últimas están dadas principalmente por las MBL que se ubican en lugares genéticos específicos, como en transposones, integrones o plásmidos, los cuales

permiten la codificación de la resistencia antimicrobiana hacia los carbapenémicos o hacia otros antibióticos, adicional a esto, se han detectado carbapenemasas de clase A, B y D (Hong, 2015).

Clase A: Estas carbapenemasas comprenden 5 grupos, SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC y cumplen la función de hidrolizar a los betalactámicos, pero no todas se encuentran en *Pseudomonas*. Las carbapenemasas de tipo KPC en *Pseudomonas aeruginosa*, solo se han encontrado 3 variantes de origen plasmídico, KPC-2 en Colombia, KPC-5 en Puerto Rico (Nicolau, 2010) y KPC-1 en el estado de Carolina del Norte en Estados Unidos (Shaaban, 2017).

Clase B: Estas carbapenemasas también son conocidas como MBL (Metallo- β -lactamasa) son las más relevantes ya que tienen un mayor papel en la resistencia a los carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*; comprenden 8 grupos, IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, y KHM. De estos grupos las que han sido reportadas en *P. aeruginosa* son VIM, NDM-1, GIM-1 e IMP, esta última han sido detectadas en casi todo el mundo y se han descrito más de 26 variantes de las cuales en su mayoría se encuentran en *P. aeruginosa* (Nicolau, 2010) (Shaaban, 2017).

Clase D: Estas son de tipo OXA y se han descrito más de 100 variantes, en donde algunas tienen o no función de carbapenemasas. Sin embargo, la única carbapenemasa de tipo OXA trasferible de clase D en *P. aeruginosa* es la OXA-40 (Nicolau, 2010).

En un estudio realizado por Ovalle, M. en Colombia, demostró la presencia en de carbapenemasas de clase B como VIM en un 40% (n=229), NDM 0,2% (n=1) clase A KPC 20% (n=114), GES 0,2% (n=1) y algunas combinaciones como lo son KPC y VIM 5% (n=27), KPC y GES 0,4% (n=2) y VIM y GES 0,4% (n=2) en aislamientos de *Pseudomonas spp.*. Adicional a esto, se considera las enzimas KPC y VIM como

endémicas en *Pseudomonas spp.* y la detección de GES y de NDM son poco frecuentes en esta bacteria (Ovalle, y otros, 2017).

Actualmente existen métodos o técnicas fenotípicas para la detección de carbapenemasas en bacterias, con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae*, pero algunas de estas son aplicables a diferentes bacterias como lo es *P. aeruginosa*, en ese sentido, algunas de las pruebas que están avaladas por CLSI y que se usan en los laboratorios de microbiología, se basan en la capacidad de los quelantes de metales como lo es el EDTA y compuestos conformados por tiol para la inhibición de la actividad de las MBL, por medio de la quelación de componentes como el zinc el cual es fundamental para la producción de estas enzimas; al haber esta captura del zinc se verá una sinergia hacia el disco de EDTA, evidenciándose positivo si se presenta y negativo cuando no (Esther, 2017). Otros métodos implementados son la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el método de inactivación de carbapenémicos (mCIM) el cual se fundamenta en que al ser incubado con una bacteria productora de carbapenemasas, esta tendrá un efecto inhibitorio sobre el disco, permitiendo así identificar si la bacteria es poseedora o no de esta enzima (Uechi, 2017). Y por otro lado se encuentran las pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sondas de ADN, secuenciación, entre otras, que permiten detectar la presencia de genes encargados de la producción de carbapenemasas. Estas pruebas son altamente específicas y sensibles, pero lamentablemente solo se encuentran en laboratorios de referencia. La prueba de Carba NP ha sido respaldada para llevar a cabo la detección de carbapenemasas en *P. aeruginosa*, pero a pesar de que es de fácil implementación y que proporciona resultados en un mismo día, la sensibilidad y la especificidad, al parecer, de la prueba mCIM es mayor, además de que el precio es más económico y de mayor factibilidad para los laboratorios clínicos, evidenciándose esto en varios estudios recientes (Acharya, 2017) (Simmer, 2017).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémico en *Pseudomonas aeruginosa*

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba modificada de Inactivación de carbapenémico y la prueba de sinergismo con EDTA con respecto a la detección molecular de genes de resistencia a los carbapenémicos.
2. Comparar los resultados obtenidos por el test modificado de inactivación de carbapenémicos y el test de sinergismo con EDTA para la detección de carbapenemasas.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Tipo de estudio

Observacional retrospectivo

6.2. Criterios de inclusión

Aislamientos correspondientes a *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a alguno de los siguientes carbapenémicos imipenem, doripenem y meropenem comprendidos entre enero del 2014 a agosto de 2018, conservados en el cepario del Hospital Universitario San Ignacio.

6.3. Criterios de exclusión

Aislamientos provenientes de años diferentes al periodo de enero del 2014 y agosto de 2018. Aislamientos de microorganismos diferentes a *Pseudomonas aeruginosa*.

6.4. Tamaño de la muestra

Se realizó un análisis demográfico basado en los 160 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* presentes en el periodo de enero de 2014 a agosto de 2018.

6.5. Control de calidad

Las cepas control usadas para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron: como control negativo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (susceptible a carbapenémicos), como control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC positiva) y *E. coli* ATCC 25922 (susceptible a carbapenémicos).

6.6. Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva a nivel univariado para variables cuantitativas. En el presente estudio se determinaron las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos y la prueba de sinergismo con EDTA usando como estándar de oro la prueba molecular PCR (GenXpert). Adicionalmente se compararon los resultados obtenidos entre el test modificado de inactivación de carbapenémicos con los del test de sinergismo con EDTA; entre el método modificado de inactivación de carbapenémico y el GenXpert; y entre el test de sinergismo con EDTA con GenXpert para obtener la concordancia entre las diferentes pruebas. Para la determinación de las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémico se calculó la sensibilidad (Sn), especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) (características receptivas al operador). Para la comparación de la metodología del mCIM con el test de sinergismo con EDTA; el mCIM con GenXpert; y el test de sinergismo con EDTA con GenXpert, se calculó un coeficiente Kappa de Cohen nominal y su intervalo de confianza al 95%. De acuerdo con los criterios propuestos por Landis y Koch en 1971 (Landis, 1977) se asumió concordancia entre los métodos si el estadístico fue ≤ 0.80 . (Tabla 1)

Valor de kappa	Fuerza de concordancia
Menor de 0	Pobre
0 - 0,20	Leve
0,21 - 0,40	Baja
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Buena
0,81 - 1	Casi perfecta

Tabla 1. Interpretación de valores de Kappa. Landis y Koch en 1971

7. METODOLOGÍA

7.1. Viabilidad de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos del cepario de un hospital de cuarto nivel de complejidad

El cepario del Hospital cuenta con 160 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Las muestras se encuentran conservadas a una temperatura de -70°C . Estos aislamientos fueron sembrados en cajas con Agar Nutritivo, proporcionando los nutrientes y fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para su óptimo crecimiento. Estas fueron incubadas durante 48 horas para observar viabilidad y pureza.

En aquellos agares donde se observó crecimiento, indicaron que hay viabilidad. Aquellas que se encontraron viables se reconfirmaron en su identificación por medio de pruebas bioquímicas para determinar su pureza.

7.2. Método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM)

Para cada uno de los aislamientos evaluados, se tomó una asada de 10 μl proveniente de un cultivo fresco de una placa de agar sangre y se disolvió en 2 ml de caldo tripticasa de soja (TSB). Posteriormente se agitó con la ayuda de un vortex durante 10 – 15 segundos y se agregó al tubo de TSB un disco de meropenem de 10 μg , asegurándose que el disco quedará bien sumergido en la suspensión. Se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis durante 4 horas \pm 15 minutos. Antes o al finalizar la incubación se preparó una suspensión de 0.5 Mc Farland de *E. coli* ATCC 25922 en caldo nutritivo o en solución fisiológica y se inoculó una placa de agar Mueller Hilton (MH) como en las pruebas de sensibilidad. La preparación de la suspensión como la inoculación de la placa, no debe sobrepasar los 15 min. Se dejó secar los

platos durante 3 a 10 min antes de que se colocarán los discos de meropenem. Para remover los discos de la solución en la que se encuentran, es necesario remover el exceso de líquido con la ayuda de las paredes del tubo y se colocó en las placas de MH previamente inoculadas con la cepa ATCC 25922. Después, se invirtió la placa y se incubó $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis durante 18 -24 horas. Luego de la incubación, se midió la zona de inhibición, siendo negativa con un halo ≥ 19 mm, positivo halo 6 – 15 mm o la presencia de colonias puntuales en un halo de 16 - 18 mm y resultados intermedios con un halo de 16 – 18 mm o la presencia de colonias puntuales la zona de ≥ 19 mm. El fin de este test es evaluar la presencia de carbapenemasas, por medio de la inactivación del disco de meropenem (Uechi, 2017). Ver anexo 1 y anexo 4

7.3. Test de sinergismo con EDTA:

Para la prueba de sinergia del disco EDTA, se realizó una siembra con el aislamiento de prueba por medio del método Kirby-Bauer (opacidad ajustada a 0,5 McFarland) para inocular una placa de agar Mueller Hinton. Después se añadió los sensidiscos de meropenem (10 μg), imipenem (10 μg) y de solución EDTA 0,5 M y se colocaron a 10 mm de separación de borde a borde y de disco a disco, las placas se incubaron durante 16 – 20 horas a 37°C . El fin de este test es buscar la sinergia entre los sensidiscos evidenciándose en la deformidad de los halos de inhibición en forma de “huevo”, siendo así una prueba positiva (Esther, 2017). Ver anexo 2

7.4. Método GeneXpert:

El método GeneXpert, es una prueba molecular, automatizada encargada de amplificación del ácido nucleico en la cual se emplea un cartucho que se le dispensará 1,7 ml de reactivo y la muestra del paciente, en el sistema GeneXpert Infinity, se colocará el cartucho en la cinta transportadora. El cartucho se cargará

automáticamente, se realizará la prueba y el cartucho usado se colocará en el recipiente de residuos.

Este método nos permitirá identificar las enzimas productoras de metalobetalactamasas como (VIM, KPC, IMP-1, NDM y OXA-48) presentes en cada una de las muestras mediante la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos. Ver anexo 3

Variables del estudio:

Variable	Definición	Tipo de variable	Nivel Operativo	Medida Resumen	Fuente de la variable
Perfil de susceptibilidad cultivo diagnóstico	Tipo de perfil de sensibilidad del microorganismo aislado según valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada antibiótico reportado	Cualitativa nominal politómica	Susceptible Intermedio Resistente	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de laboratorio
MIC (perfil y susceptibilidad cultivo diagnóstico)	Es la concentración mínima de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento del microorganismo	Cuantitativa	Valor en µg/ml	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte y laboratorio
Prueba confirmatoria de resistencia (EDTA)	Prueba que detecta las enzimas tipo metalo-β-lactamasas (IMP, VIM y NDM) mediante la acción inhibitoria del EDTA	Cualitativa	Positivo o negativo	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de laboratorio
Resultado de resistencia por método GeneXpert para carbapenemasas	Prueba que permite la detección de carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48, OXA-181) en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cualitativa	Negativo o positivo	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de estudio
Método modificado de inactivación de carbapenémicos	Prueba que permite la identificación de Carbapenemasas en las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cualitativa	Positivo o negativo	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de estudio

Tabla 2. Variables del estudio

8. RESULTADOS

Se incluyeron 160 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* conservadas en el cepario del Hospital Universitario San Ignacio.

En la tabla 3 se muestra los porcentajes de resistencia de cada uno de los años desde 2014 a 2018, de los aislamientos evaluadas que son resistentes (≥ 8 ug/ml) a meropenem (n = 140) y en la tabla 4 se muestran los aislamientos intermedios (≥ 8 ug/ml) a meropenem (n = 14) por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Año	Nº. casos	Porcentaje (%)
2014	25	17,9
2015	18	12,9
2016	15	10,7
2017	29	20,7
2018	53	37,9
Total	140	100

Tabla 3. Porcentaje de resistencia a meropenem por año

Año	N. casos	Porcentaje (%)
2014	4	28,6
2015	3	21,4
2016	2	14,3
2017	3	21,4
2018	2	14,3
Total	14	100

Tabla 4 Porcentaje de intermedio a meropenem por año

En la ilustración 1 y 2 se muestra el porcentaje de cada una de las muestras y servicios respectivamente de los cuales se aislaron los aislamientos de *P. aeruginosa* evaluadas en el presente estudio.

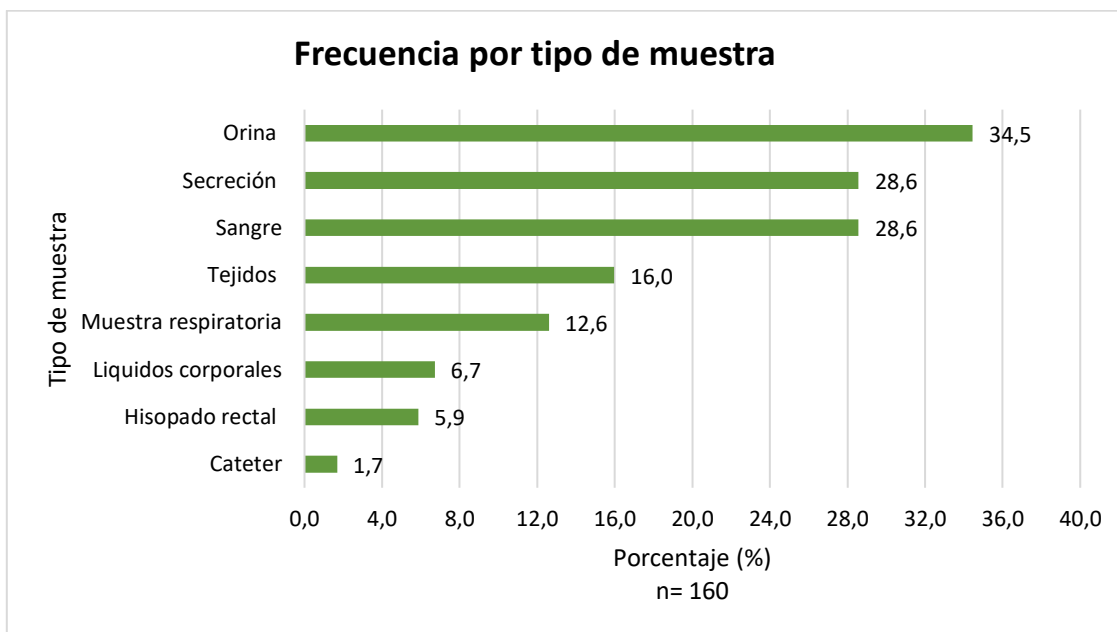


Ilustración 1. Frecuencia del tipo de muestra

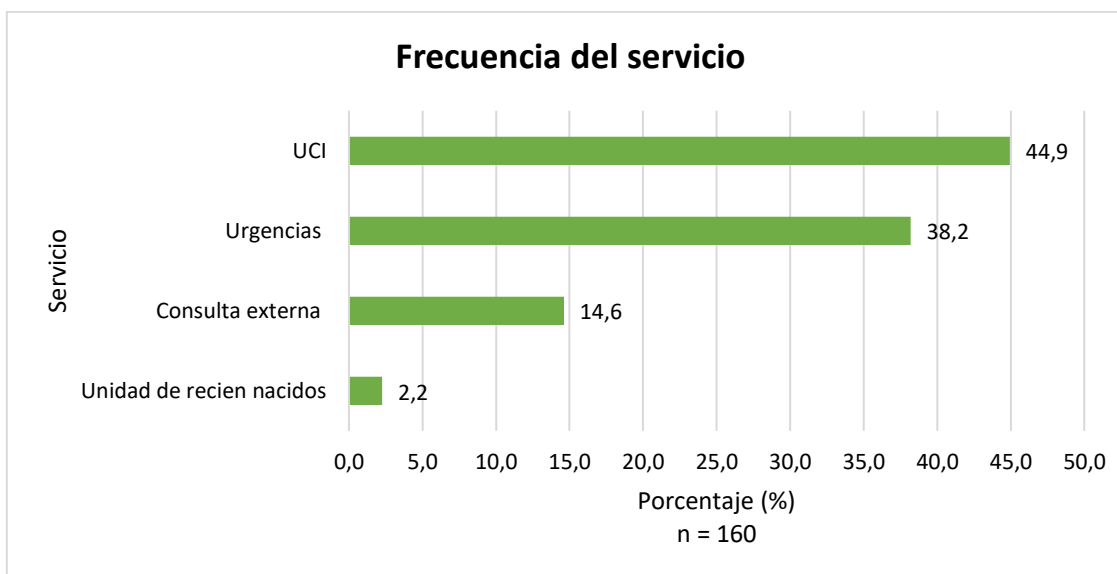


Ilustración 2. Frecuencia del servicio

En la tabla 5 se muestra cada una de las MIC para meropenem, el número de aislamientos que lo presentaron y su correspondiente porcentaje.

MIC meropenem	N°. casos	Porcentaje (%)
0,25	1	0,6
1	3	1,9
2	2	1,3
4	14	8,8
8	91	56,9
16	49	30,6
Total	160	100

Tabla 5. *Porcentaje de cada una de las MIC para Meropenem*

En la tabla 6 se muestra el porcentaje de resistencias de cada uno de los carbapenémicos, meropenem, imipenem y doripenem sobre un n=87 debido a que a este número de aislamientos se les realizó en su momento, análisis de los 3 antibióticos al tiempo.

Antibiótico	N. casos / n	Porcentaje (%)
Meropenem	73 / 87	83,9
Imipenem	82 / 87	94,3
Doripenem	64 / 87	73,6

Tabla 6. *Porcentaje de resistencia a carbapenémicos (Meropenem, Imipenem y Doripenem)*

En la tabla 7 se muestra los resultados obtenidos del test de sinergismo con EDTA con sus correspondientes porcentajes

Resultado	N°. casos	Porcentaje (%)
Positivo	28	17,5
Negativo	132	82,5
Total	160	100

Tabla 7. Porcentajes de los resultados del test de sinergismo con EDTA

8.1. Sensibilidad y especificidad del método modificado de inactivación de carbapenémicos comparado con GenXpert

En la tabla 8 se muestra los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos en la prueba fenotípica para la detección de carbapenemasas con el método modificado de inactivación de carbapenémicos, al ser comparado con el *Gold Standard* PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Por el equipo GenXpert ©.

Parámetro	Porcentaje	IC = 95%
Sensibilidad	82,4%	72% a 89%
Especificidad	97,7%	92% a 93%
VPP	96,8%	
VPN	86,6%	

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad del método modificado de inactivación de carbapenémicos comparado con GenXpert

8.2. Sensibilidad y especificidad del test de sinergismo con EDTA con GenXpert

En la tabla 9 se muestra los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos por el test de sinergismo con EDTA al ser comparado con el *Gold Standard* PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Por el equipo GenXpert ©.

Parámetro	Resultado	IC = 95%
Sensibilidad	65%	46% a 81%
Especificidad	92%	82% a 95%
VPP	61%	
VPN	93%	

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad del test de sinergismo con EDTA comparado con GenXpert

8.3. Comparación de los resultados obtenidos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos y el test de sinergismo con EDTA

Se realizó un índice Kappa de cohen con el fin de observar la concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémicos y el test de sinergismo con EDTA, el cual arrojó un valor de 0,515 (52%) teniendo en cuenta estos resultados, el método en estudio tiene una concordancia “moderada” con respecto al *Gold Standard* (Tabla 10).

Test de sinergismo con EDTA				Índice Kappa
mCIM	Positivos	Negativos	Total	
Positivos	8 (A)	55 (B)	63 (R1)	$K = (PA - PE) / (1 - PE)$ K= 0,515
Negativos	20 (C)	77 (D)	97 (R2)	PA= A+D/n
Total	28 (L1)	132 (L2)		PE=(R1/n)(L1/n)(R2/n)(L2/n)

Tabla 10. Cálculo de índice Kappa de cohen para el método modificado de inactivación de carbapenémicos en comparación con el test de sinergismo con EDTA

8.4. Comparación de los resultados obtenidos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos y GenXpert

También se determinó un índice Kappa de cohen para observar concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémicos y el GenXpert, dando como resultado 0,900 (90%), indicando que el mCIM tiene una concordancia “Casi perfecta” con respecto a la prueba *Gold Standard* (Tabla 11).

GenXpert				Índice Kappa
mCIM	Positivos	Negativos	Total	
Positivos	61 (A)	2 (B)	63 (R1)	$K = (PA - PE) / (1 - PE)$ K= 0,900
Negativos	13 (C)	84 (D)	97 (R2)	PA= A+D/n
Total	74 (L1)	86 (L2)		PE=(R1/n)(L1/n)(R2/n)(L2/n)

Tabla 11. Cálculo del índice Kappa de cohen para el método modificado de inactivación de carbapenémicos en comparación con el GenXpert

8.5. Comparación de los resultados obtenidos por el test de sinergismo con EDTA y GenXpert

Por último, se realizó un índice Kappa de cohen para determinar la concordancia entre la prueba de sinergismo con EDTA y el GenXpert, dando como resultado 0,873 (87%), lo cual conduce a que el test de sinergismo con EDTA tiene una concordancia “casi perfecta” Con respecto a la prueba *Gold Standard* (Tabla 12).

Test de sinergismo con EDTA	GenXpert			Índice Kappa
	Positivos	Negativos	Total	
Positivos	17 (A)	11 (B)	28(R1)	$K = (PA - PE) / (1 - PE)$ K= 0,873
Negativos	9 (C)	123 (D)	132(R2)	
Total	26 (L1)	134 (L2)		$PA = A + D / n$ $PE = (R1/n)(L1/n)(R2/n)(L2/n)$

Tabla 12. Cálculo del índice Kappa de cohen para el test de sinergismo con EDTA en comparación con el GenXpert.

Se encontraron 13 aislamientos como falsos negativos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos, ya que el *Gold Standard* (GenXpert) detectó la presencia de genes de resistencia VIM (12) y KPC (1) y el método evaluado dio como resultado negativo para estos aislamientos, es decir, el test fue negativo para la detección de carbapenemasas (Tabla 13).

Meropenem	EDTA	mCIM	GenXpert
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Intermedio	Positivo	Negativo	VIM
Intermedio	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Sensible	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Resistente	Positivo	Negativo	VIM
Intermedio	Positivo	Negativo	KPC

Tabla 13. Falsos negativos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos

Se encontró 2 aislamientos como falso positivo por el método modificado de inactivación de carbapenémicos, ya que el *Gold Standard* (GenXpert) no detectó la presencia de genes de resistencia y el método evaluado dio como resultado positivo para estos aislamientos, es decir, el test fue positivo para la detección de carbapenemasas (Tabla 14).

Meropenem	EDTA	mCIM	GenXpert
Resistente	Negativo	Positivo	No detectó
Resistente	Negativo	Positivo	No detectó

Tabla 14. Falsos positivos por el método modificado de inactivación de carbapenémicos

Se encontraron 7 falsos positivos para el test de sinergismo con EDTA, ya que el GenXpert no detectó ningún tipo de gen de resistencia y el test dio un resultado positivo, es decir, que se detectó la presencia de carbapenemasas en 7 aislamientos evaluadas (EDTA) (Tabla 15).

Meropenem	EDTA	mCIM	GenXpert
Resistente	Positivo	Negativo	No detectó
Resistente	Positivo	Negativo	No detectó
Sensible	Positivo	Negativo	No detectó
Intermedio	Positivo	Negativo	No detectó
Intermedio	Positivo	Negativo	No detectó
Resistente	Positivo	Negativo	No detectó
Resistente	Positivo	Negativo	No detectó

Tabla 15. Falsos positivos por el test de sinergismo con EDTA

Se encontraron 9 falsos negativos para el test de sinergismo con EDTA, ya que el GenXpert detectó genes de resistencia y el test dio un resultado negativo, es decir, que no se detectó la presencia de carbapenemasas en 9 aislamientos evaluadas (EDTA) (Tabla 16).

Meropenem	EDTA	mCIM	GenXpert
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Intermedio	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC

Resistente	Negativo	Positivo	VIM + KPC
------------	----------	----------	-----------

Tabla 16. Falsos negativos por el test de sinergismo con EDTA

En el estudio molecular realizado con el equipo GenXpert © a los 160 aislamientos que fueron resistentes, intermedio y sensibles a meropenem. Se detectó que para los aislamientos resistentes 14 (10%) tenían el gen VIM, 46 (33%) tenían el gen KPC y 7 (5%) tenían la combinación de VIM + KPC; sin embargo, en 73 (52%) aislamientos no se detectó ningún gen involucrado en la resistencia. Para los aislamientos que dieron intermedio a meropenem con una MIC de 4 ug/dl, se encontró que 2 (14%) tenían el gen VIM, 1 (7%) tenía el gen KPC, 1 (7%) tenía la combinación de VIM + KPC y no detectó 10 (71%). De igual forma, a pesar de que los aislamientos presentaron una sensibilidad a meropenem con una MIC de \leq 2 ug/dl se encontraron que 2 (33%) presentaron el gen VIM, 1 (17%) presentó el gen KPC y 3 (50%) no detectó la presencia de ningún gen. (Tabla 17)

Genes	N° Cepas resistentes	Porcentaje	N° Cepas intermedias	Porcentaje	N° cepas sensibles	Porcentaje
IMP - 1	0	0%	0	0%	0	0%
VIM	14	10%	2	14%	2	33%
NDM	0	0%	0	0%	0	0%
KPC	46	33%	1	7%	1	17%
OXA-48	0	0%	0	0%	0	0%
VIM+KPC	8	6%	1	7%	0	0%
No detectó	73	52%	10	71%	3	50%
Total	140	100%	14	100%	6	100%

Tabla 17. Genes detectados por la prueba molecular GenXpert.

Teniendo en cuenta los resultados de los 160 aislamientos sometidos a la prueba con GenXpert; en la tabla 17 se muestra la frecuencia del tipo de carbapenemasas el cual demostró un 30% de carbapenemasas de clase A y de clase B 11% y un 9% presentan coexistencias (Tabla 18).

Carbapenemasas					
Clase A (KPC)		Clase B (VIM)		Clase A + B (KPC + VIM)	
n	Porcentaje	n	Porcentaje	n	Porcentaje
48	30%	18	11%	9	6%

Tabla 18 Frecuencia de clases de carbapenemasas detectadas

Las pruebas fenotípicas empleadas para la detección de carbapenemasas en los aislamientos que son resistentes, se obtuvo un resultado positivo en el test de sinergismo con EDTA y método modificado de inactivación de carbapenémicos fue de 14,3% y 42,9% respectivamente. En cuanto a los aislamientos sensibles, se evidenció que 4 aislamientos que son sensibles a meropenem presentaron un test de EDTA positivo (3/4) y para mCIM (2/4) (Tabla 19).

	Sinergismo con EDTA positivo	mCIM positivo
Cepas sensibles a meropenem	75,0%	50,0%
Cepas resistentes a meropenem	14,3%	42,9%

Tabla 19. Porcentaje de resultados positivos de las pruebas fenotípicas en los aislamientos evaluadas de *P. aeruginosa*

9. DISCUSIÓN

La resistencia a los antibióticos son una amenaza a la salud pública. Esto conlleva a un gran problema, ya que si bien cada vez hay más casos de resistencia bacteriana a nivel mundial los tratamientos más utilizados para infecciones contra bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* son los carbapenémicos. Para evitar la propagación y las fallas en los tratamientos, se ha vuelto imperativa la búsqueda de nuevas metodologías que detecten la presencia de estas resistencias y la causa de la misma. (Van der Zwaluw, 2015)

A lo largo del tiempo la evaluación de la resistencia a carbapenémicos se ha desarrollado a partir de diversas pruebas como lo es la sensibilidad a los antibióticos, métodos fenotípicos y bioquímicas y lo métodos moleculares. Los cuales detectan los genes involucrados en la producción de enzimas carbapenemasas y que actualmente son el *Gold Standard*, pero que requieren equipos costosos y especiales. Dentro de los métodos que actualmente se aplican en los laboratorios clínicos para confirmar perfil de resistencia *in vitro* de *P. aeruginosa* a carbapenémicos, está el test de sinergismo de EDTA, el cual es limitado en su alcance, ya que solamente nos permite de manera fenotípica observar la posible presencia de una enzima carbapenemasa tipo metalobetalactamasas. Adicionalmente, en el 2017 CLSI, recomienda una nueva metodología fenotípica que, si bien contempla la posibilidad de determinar la presencia de una carbapenemasa de cualquier tipo (serina o MBL), y según estudios, presenta una buena sensibilidad y especificidad, también la literatura afirma que es necesario que se realicen más estudios ya que su montaje es muy dependiente del operador. (McMullen, Yarbrough, Wallace, Shupe, & Burnham, 2017) (Akhi, y otros, 2016).

En este estudio se evidenció una concordancia “casi perfecta” entre la prueba fenotípica de sinergismo con EDTA y la PCR convencional (GenXpert), una concordancia “casi perfecta” entre el método modificado de inactivación y el

GenXpert considerado como el *Gold Standard* y una concordancia “moderada” entre el test de sinergismo con EDTA y el método modificado de inactivación. En comparación con el estudio realizado por (Simmer, 2017) el cual obtuvo una índice Kappa cercano a 1 entre el mCIM y la detección de genes, esto por medio del análisis 15 aislados de *P. aeruginosa* productores de carbapenemasas y 15 aislados no productores.

En cuanto a los 13 falsos negativos del mCIM que se presentaron en este proyecto, resulta diferente y escaso en la mayoría de la literatura, cabe resaltar que en el estudio realizado por Van der Zwaluw en el 2015 en 283 aislamientos de *Enterobacteriaceae* y 411 aislamientos entre *P. aeruginosa* y *A. baumannii* comparando el mCIM y la PCR multiplex para la detección de genes, el cual obtuvieron un falso negativo y mencionan que posiblemente este se debió por la escasa capacidad de hidrolisis de la enzima carbapenemasa, a pesar de esto, mostro excelentes resultados tanto en sensibilidad como en especificidad, además de tener un índice Kappa de 98,8%.

En cuanto a los 2 falsos positivos encontrados en la prueba de mCIM, se reconoce la limitación que tiene la prueba molecular (GenXpert) ya que solo es posible la evaluación de 5 genes involucrados en la resistencia a los carbapenémicos VIM, IMP-1, OXA-48, NDM y KPC, así que es posible que estos falsos positivos sean consecuencia de esta limitante. Como reporta McMullen y colaboradores en el año 2017, en un estudio con 15 de aislamientos de *P. aeruginosa*, 7 complejos de *A. baumannii* y 98 *Enterobacteriaceae* resistentes a meropenem, se hallaron 7 casos de falsos positivos comparando el mCIM con una prueba molecular para la detección de genes de resistencia (GenXpert Carba-R). El autor menciona que es posible que los aislamientos alberguen pocos genes comunes o que sean novedosos. De igual forma Simmer y colaboradores en el año 2017 realiza un trabajo con 30 aislamientos de *P. aeruginosa* y 30 de *A. baumannii*, en donde 15 de cada uno es no productor de carbapenemasas y 15 son productores a estas, comparando el mCIM con el genotipo molecular de los aislamientos, en el cual reporta un falso positivo en un

aislamiento que albergaba los genes OXA-2, OXA-50 y PAO β -lactamasa de ahí proporciona la idea de que los falsos positivos pueden deberse a la producción de múltiples β -lactamasas. Adicionalmente reporta una sensibilidad media y la especificidad del mCIM para los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron de 98.0% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 94.3 a 99.6; rango, 86.7 a 100) y 95% (IC del 95%, 89.8 a 97.7; rango, 93.3 a 100) (McMullen, Yarbrough, Wallace, Shupe, & Burnham, 2017) (Simmer, 2017).

En cuanto al método modificado de inactivación de carbapenémicos, en nuestro estudio demostró un alto porcentaje de sensibilidad 82,4% (IC = 95% (0,72 a 0,89)), un VPP de 96,8%, una especificidad de 97,7% (IC = 95% (0,91 a 0,99)) y un VPN de 96,8%, esto parecido a lo reportado por Akni y colaboradores en el año 2016, utilizaron 245 aislamientos de *P. aeruginosa* de los cuales 121 (49,4%) fueron resistentes a carbapenémicos, comparando el mCIM con la detección molecular por PCR, demuestra una sensibilidad de 97,7%, especificidad de 98,8%, VPN de 98,8% y VPP de 97,1% además, reporta únicamente un falso negativo y un falso positivo. Aunque cabe resaltar estudios como el de Uechi, K en el 2017, en donde se evaluó 65 aislamientos del género *Pseudomonas spp.* comparando el mCIM con la determinación de la secuencia del genoma, en donde la sensibilidad para bacterias no fermentadoras como *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas fue de 45% de sensibilidad y una especificidad de 100% (Uechi, 2017) (Akhi, y otros, 2016).

En el test de sinergismo con EDTA, en nuestro estudio demostró un porcentaje de sensibilidad 61% (IC = 95% (0,46 a 0,81)) y un VPN de 93%, y un porcentaje de especificidad de 92% (IC = 95% (0,86 a 0,95)), y un VPP de 61%. Hay que tener en cuenta que esta prueba solo evalúa la presencia de carbapenemasas tipo MBL (VIM) las cuales tuvieron un 11% (n = 18). Adicional a esto, la prueba no dio un resultado positivo en ninguno de los aislamientos (n=9) de los cuales se dio la combinación de las carbapenemasas (falsos negativos). Según el estudio realizado por Bartolini en el año 2014, llevado a cabo en 108 *Enterobacteriaceae* evaluándose diferentes métodos como el test de Hodge modificado, E-test de MBL, sinergismo

con EDTA, RDCK™, E-test de AmpC y la prueba de inhibición de cloxacilina, confirmándose con un análisis genotípico, también obtuvo que negatividad en el test de sinergismo con EDTA, cuando se presentaron dos genes de resistencia como lo es VIM + KPC, informa que los aislados que presentan esta característica o en asociación con β -lactamasas como BLEEs, muestran un perfil de resistencia complejo que los test fenotípicos no tienen la capacidad de separar correctamente (Bartolini, 2014), en cuanto a los falsos positivos, el EDTA exagera la permeabilidad de la membrana externa bacteriana, lo cual conlleva a una falsa susceptibilidad (Molin, 2013).

Colombia se considera que es una región endémica de carbapenemasas tipo KPC (31,1%), seguidas de VIM y OXA-23 que también se encuentran ampliamente diseminadas. Por otro lado, las carbapenemasas con mayor frecuencia que se presentan en *Pseudomonas spp.* son las de tipo VIM (40%) y las de tipo KPC (20%), aunque adicionalmente se han descrito la presencia de más de una carbapenemasa, en ese sentido, con mayor predominio se encuentra VIM + KPC con un 5%, seguido en menor proporción por KPC +GES y VIM + GES con un mismo porcentaje de 0,4% (Ovalle, y otros, 2017) (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014). En este estudio no se confirmó el porcentaje según *Pseudomonas spp.*, pero si es similar al general en Colombia, ya que de los aislamientos que presentaron genes (n=74) el 65% fue de tipo KPC y 18% fue de tipo VIM, además de que se presentó la combinación de VIM + KPC con un 11%. Cabe resaltar que de las carbapenemasas de clase A la de tipo KPC son bien conocidas por su capacidad de diseminación, debido a que son de origen plasmídico y al presentarse en mayor medida en *K. pneumoniae* microorganismo bien conocido por la capacidad como vector de diseminación de resistencia, de ahí la frecuencia en que se presenta (Nicolau, 2010).

Cabe resaltar que este es el primer estudio que se realiza en Colombia, donde se evalúan las características operativas de la prueba modificada de inactivación de carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque los datos permiten

recomendar el uso de esta técnica en los laboratorios clínicos, es una excelente oportunidad para poner en manifiesto la necesidad de la adición de realizar más estudios.

10. CONCLUSIÓN

Las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos muestran una sensibilidad de 82% y una especificidad de 98% y el test de sinergismo con EDTA una sensibilidad de 65% y una especificidad de 92%

El método modificado de inactivación de carbapenémicos tiene una concordancia “casi perfecta” y el test de sinergismo con EDTA una concordancia “buena” con respecto a la PCR convencional para la detección de carbapenemasas

11. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de PCR convencional para la búsqueda de genes nuevos involucrados en la resistencia a carbapenémicos por *P. aeruginosa* diferentes a los ofrecidos por GenXpert
- Realizar estudios que revelen las posibles causas de la presencia de falsos negativos en la prueba de EDTA cuando coexistencia de más de una carbapenemasa.

12. BIBLIOGRAFÍA

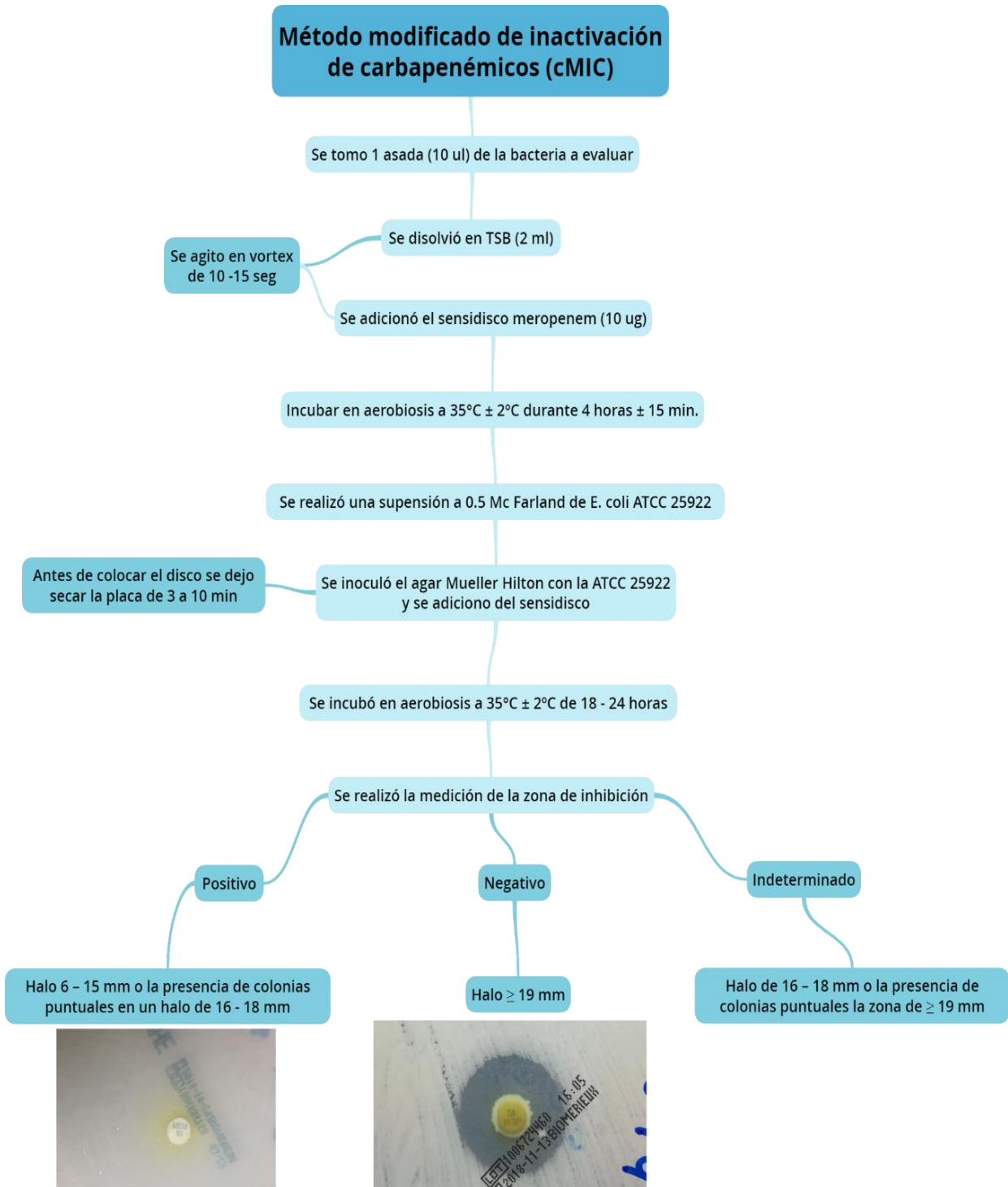
- Acharya, M. J. (2017). Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BioMed Central*, 10, 1-6.
- Akhi, M. T., Khalili, Y., Ghottaslou, R., Kafil, H. S., Yousefi, S., Nagili, B., & Goli, H. R. (2016). Carbapenem inactivation: a very affordable and highly specific method for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates compared with other methods. *Journal of Chemotherapy*, 1-6.
- Bartolini, A. F. (2014). Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut pathogens*, 6(13), 1-7.
- (2016). *Boletín GREBO. Número 8*. Bogotá: ISSN 2027-0860.
- (2017). *Boletín GREBO. Número 9*. Bogotá: ISSN 2027-0860.
- Estepa, V. R. (2017). Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 141-147.
- Esther, J. E. (2017). Prevalence of Carbapenem Resistant Non-Fermenting Gram Negative Bacterial Infection and Identification of Carbapenemase Producing NFGNB Isolates by Simple Phenotypic Tests. *Journal of clinical and diagnostic research*, 11(3), DC10-DC13.
- Guevara, A. S. (2012). Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos provenientes de cuatro hospitales de Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 29 (6), 614-621.

- Hernández, A. Y. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista Española de Quimioterapia*, 48(4), 123-130.
- Hong, D. J. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, 47(2), 81-97.
- Hong, D. J. (2015). Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, 47(2), 81-97.
- Landis, J. &. (1977). *The measurement of observer agreement for categorical data* (Vol. 33). Biometric Society.
- Luján, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48, 465-474.
- McMullen, A., Yarbrough, M., Wallace, M., Shupe, A., & Burnham, C.-A. (2017). Evaluation of Genotypic and Phenotypic Methods to Detect Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *Clinical Chemistry*, 63(3), 723-730.
- Molin, C. O. (2013). Detección Fenotípica de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes que acudieron al Hospital de Clínicas San Lorenzo de febrero a julio 2013. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 26-31.
- Nicolau, C. &. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 19-28.
- Ocampo, A. G. (2015). Variaciones al Test de Hodge modificado para la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*. *Medicina & Laboratorio*, 21, 551-564.

- Ochoa, S. L. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138-150.
- Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2017). Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, 37, 473-85.
- Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2017). Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, 37, 473-85.
- Pacheco, R., Osorio, L., Correa, A. M., & Villegas, M. V. (2014). Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. *Biomédica*, 34, 81-90.
- Palzkill, T. (2012). Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 91-104.
- Ruiz, P. &. (2017). Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Revista Española de Quimioterapia*, 30, 8-12.
- Sachdeva, R. S. (2017). Evaluation of different phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Laboratory Physicians*, 63(3), 249-253.
- Shaaban, M. Q. (2017). Molecular characterization of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to carbapenems. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(12), 935-943.

- Simmer, P. J.-K.-C. (2017). Multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method and the Carba NP for detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), 1-10.
- Uechi, K. T.-A. (2017). A modified carbapenem inactivation method, CIMTris, for carbapenemase production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(12), 3405–3410.
- Valderrama, S. G. (2016). Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. *Biomédica*, 36, 69-77.
- Van der Zwaluw, K. d. (2015). 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*, 10, 1-13.

Anexo 1



Anexo 2

Test de sinergismo de EDTA

Siembra de la muestra problema
Método de Kirby-Bauer

Opacidad 0,5 MacFarland

Inoculación en Agar Mueller Hilton

Colocar sensidiscos

Meropenem (10 µg)
Solución de EDTA (0,5 M)
Imipenem (10 µg)

Incubar 16 - 20 horas a 37°C

10 mm de separación entre los
sensidiscos y de borde a borde

Evidenciar si hay sinergia

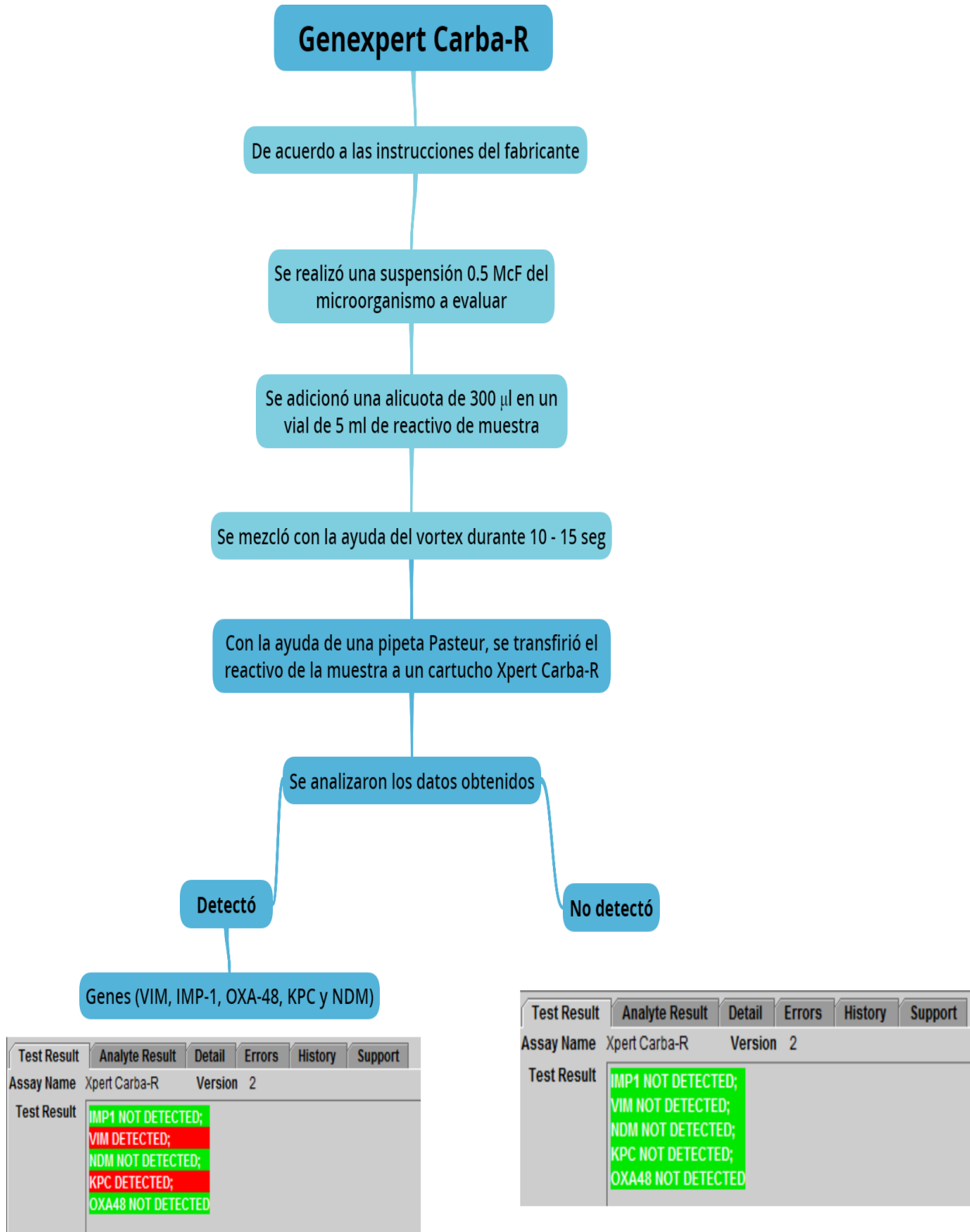
Negativa




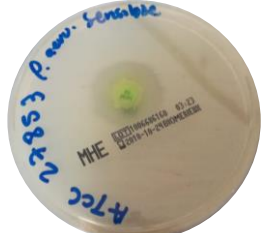



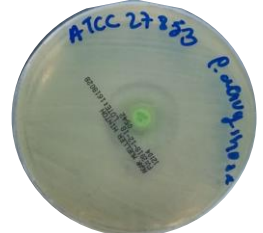
Positiva











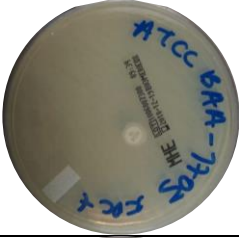

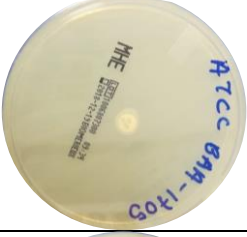

Anexo 3



Anexo 4

Fecha	Tipo de control	Imagen	Resultado
18 / Oct / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
25 / Oct / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
26 / Oct / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20

31 / Oct / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
1 / Nov / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
2 / Nov / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20

11 / Nov / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
13 / Nov / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20
16 / Nov / 2018	Positivo		≤ 6
	Negativo		≥ 20