



**Concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias**

**Paula Andrea Guzmán Hernández**

**Trabajo de grado para optar al título de bacterióloga**

**DIRECTORA:**

**Beatriz Elena Ariza Ayala**

**CODIRECTORA:**

**Alba Alicia Trespalcios Rangel**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA BACTERIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2018**

CONCORDANCIA ENTRE EL MÉTODO MODIFICADO DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENÉMICO  
(MCIM), TEST DE HODGE Y PRUEBAS DE SINERGISMO PARA LA DETECCIÓN DE  
CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS

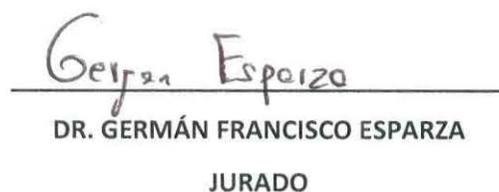
PAULA ANDREA GUZMÁN HERNÁNDEZ



DRA. BEATRIZ ELENA ARIZA AYALA  
DIRECTORA



DRA. ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL  
CODIRECTORA



DR. GERMÁN FRANCISCO ESPARZA  
JURADO

**Concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias**

**Estudiante: Paula Andrea guzmán Hernández.**

*Estudiante Bacteriología Pontificia Universidad Javeriana*

**Director: Beatriz Elena Ariza Ayala.**

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

**Codirector: Alba Alicia Trespalacios Rangel**

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

**Asesor:**

*Gloria Cortes: Bacterióloga Especialista en Microbiología. Líder área de Microbiología Laboratorio Clínico Hospital Universitario San Ignacio.*

**RESUMEN:**

**Introducción:** La emergencia y diseminación de Enterobacterias productoras de carbapenemasas, como paradigma actual de la resistencia extensa y de la resistencia a antibióticos, en nuestro ámbito sanitario es una grave amenaza para la salud de los pacientes y para la salud pública, esto sumado al hecho de que la mayoría de infecciones producidas por EPC reduce las opciones terapéuticas y promueve el uso de alternativas terapéuticas combinadas con antibióticos que tienden a tener una alta toxicidad (J.A. Reyes-Chacón, 2017) (Jesús Oteo, 2014). Es por ello que los laboratorios están siempre en la búsqueda de metodologías fiables, precisas y con mejor oportunidad de respuesta en la búsqueda tanto de pacientes colonizados como infectados por este tipo de microorganismos.

**Objetivo:** Determinar la concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias y determinar características operativas de la prueba modificada de Inactivación de carbapenémico y el test de Hodge respecto a la detección molecular de genes de resistencia a carbapenémicos.

**Materiales y métodos:** este estudio observacional retrospectivo fue llevado a cabo en el Hospital Universitario San Ignacio. Se realizó con aislamientos de Enterobacterias con resistencia a algún

carbapenémico comprendidos entre 2014 a diciembre de 2017, conservados en el Cepario del Hospital Universitario San Ignacio y aislamientos correspondientes a Enterobacterias BLEES positivas, con sensibilidad a carbapenémicos, en el mismo lapso de tiempo. Se determinó la sensibilidad (Sn), especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN). Se calculó un coeficiente Kappa de Cohen nominal y su intervalo de confianza al 95% para conocer la concordancia entre los métodos en estudio y el estudio molecular por PCR convencional.

**Resultados:** El método modificado de inactivación de carbapenemasas obtuvo una Sensibilidad del 96%, especificidad de 98%, VPP 98%, VPN 95 % al ser comparado con el método molecular GenXpert para la detección de genes de resistencia a carbapenémicos. Así mismo, el test de Hodge obtuvo una Sensibilidad del 97% especificidad de 97%, VPP 97%, VPN 97 %. Se detectaron cuatro casos falsos negativos y un caso falso positivo con respecto a la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas mediante el método modificado de inactivación de carbapenémico. Se detectaron dos casos falsos positivos con el Test de Hodge.

**Conclusión:** La emergencia y diseminación de Enterobacterias productoras de carbapenemasas son un problema emergente a nivel global y local. Es importante la detección rápida y efectiva de estas Enterobacterias productoras de carbapenemasas para enfrentar esta problemática. El test de Hodge continúa siendo el mejor método fenotípico para confirmación de presencia de carbapenemasas. El test modificado de inactivación al carbapenémico a pesar de tener una concordancia casi perfecta con Genexpert, al general un mayor número de resultados falsos positivos, puede ser usado como método alternativo.

**Palabras clave:** Enterobacteriaceae, Carbapenemasas, Enterobacterias productoras de carbapenemasas, Carbapenémico.

**ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.**

“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”

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a Dios, a mis padres Alberto Guzmán y Martha Hernández que son el motor de mi vida, a mi directora Beatriz Ariza Ayala por haberme apoyado en el desarrollo de este proyecto, por sus enseñanzas, dedicación y exigencia, a la Doctora Alba Alicia Trespalacios por su constante apoyo y exigencia.

A Dominic por su amor incondicional y leal compañía.

A todos los colaboradores del Hospital Universitario San Ignacio, por permitirme ser parte de uno de sus grupos de investigación, brindarme las instalaciones y equipamiento necesarios para el pleno desarrollo de esta investigación, especialmente a los miembros del Laboratorio de Microbiología clínica.

## **CONTENIDO**

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**
- 3. MARCO TEÓRICO**
- 4. OBJETIVOS**
  - 4.1 OBJETIVO GENERAL
  - 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS
- 5. DISEÑO METODOLÓGICO**
  - 5.1 TIPO DE ESTUDIO
  - 5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN
  - 5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
  - 5.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA
  - 5.5 CONTROL DE CALIDAD
- 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**
- 7. METODOLOGÍA**
- 8. RESULTADOS**
- 9. DISCUSIÓN**
- 10. CONCLUSIONES**
- 11. RECOMENDACIONES**
- 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

# **Concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias**

## **1. INTRODUCCIÓN**

La diseminación de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos no solo constituye un problema microbiológico y epidemiológico, sino que conlleva a desenlaces clínicos desfavorables, traduciéndose en consecuencias económicas negativas. Las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos se asocian con retraso en el inicio del tratamiento antibiótico apropiado, prolongación de la estancia hospitalaria, incremento de los costos hospitalarios y aumento en las tasas de mortalidad (Hernández-Gómez C, 2014), es por esto que se ha desarrollado un nuevo método fenotípico, llamado Método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), el cual se desarrolló para detectar la actividad carbapenemasa en bacterias Gram negativas. Este método ha demostrado una alta concordancia con los resultados obtenidos por PCR para detectar genes que codifican las carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP y OXA-23. (Van Der Zwaluw, 2015)

## **2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

Las Enterobacterias están entre los microorganismos más frecuentes en instituciones hospitalarias de Colombia y en comunidad como causantes de muchas infecciones, pero además de su alta prevalencia, en la última década se ha observado el incremento de Enterobacterias con varios mecanismos de resistencia que cada vez hacen más difícil el tratamiento médico a estas infecciones; tal es el caso de la resistencia que el grupo de Enterobacterias ha logrado adquirir a los antibióticos carbapenémicos, los cuales son antibióticos betalactámicos empleados para el tratamiento de infecciones severas o en particular, para microorganismos que expresan diversos mecanismos de resistencia a otros antibióticos del grupo, lo que limita su uso clínico, incrementando así los costos de la atención debido a largas estancias hospitalarias y antibióticos de mayor espectro, pero aún más preocupante, aumentando los porcentajes de mortalidad en dichos pacientes. (Maldonado, 2016)

Las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) se caracterizan por generar un amplio espectro de infecciones, siendo la bacteriemia y la neumonía las más comunes. Su prevalencia viene en aumento; en un reporte reciente, los Centros para el Control y Prevención de

Enfermedades (CDC) notificaron que en Estados Unidos la proporción de ERC fue del 1,2% en el año 2001 y aumentó al 6.6% para el 2016. La mortalidad atribuible a este tipo de infecciones varía entre el 18 y el 60%, siendo más elevada en pacientes con bacteriemia. La emergencia de resistencia a carbapenémicos puede surgir como una combinación de mecanismos: modificaciones de la permeabilidad de la membrana externa, sistemas de expulsión activa con hiperproducción de Beta-lactamasas tipo AmpC o BLEE o producción de Betalactamasas específicas que hidrolizan carbapenémico (carbapenemasas). Estas últimas son una verdadera amenaza a la salud pública, pues conllevan una alta mortalidad y limitadas opciones de tratamiento efectivo para pacientes con infecciones graves por bacilos gramnegativos multiresistentes. ( (Navarro, 2015)) Esta problemática es frecuente en instituciones hospitalarias de varias regiones del mundo, y Colombia en particular ha sido catalogada como endémica para Enterobacterias productoras de carbapenemasas. (Maldonado, 2016))

Ahora bien, la detección y confirmación *in vitro* de las Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos por producción de carbapenemasas por parte del Laboratorio de Microbiología, es un objetivo imperativo en cualquier institución hospitalaria, en el cual se deben analizar características operativas de las pruebas a las cuales se somete el microorganismo para la detección de marcadores de resistencia *in vitro*, control de calidad de las mismas y oportunidad de respuesta que facilite y apresure la implementación de un abordaje terapéutico adecuado (J.A. Reyes-Chacón, 2017). Esta detección fenotípica, ya sea inicial o confirmatoria entonces, supone un reto constante para los laboratorios de Microbiología Clínica, debido a la diversidad de mecanismos de resistencia adquiridos por las bacterias, las limitaciones propias de las pruebas *in vitro*, y la búsqueda constante de acortar tiempos de respuesta; es así como en pocos años se han presentado nuevas pruebas, tales como Test de Hodge en sus comienzos (1945), luego pruebas de sinergismo como ácido borónico y EDTA (1988), pruebas bioquímicas con indicadores de pH como Carba NP (2012), últimamente equipos que utilizan como principio de detección la turbidimetría laser y pruebas moleculares tanto convencionales, no muy utilizadas en la rutina del laboratorio, así como las pruebas moleculares comerciales o cerradas las cuales poseen la practicidad que se requiere pero con muy altos costos. (Cercenado, 2015)4)

Con el propósito entonces de detectar las ERC y optimizar el uso de los carbapenémicos a través de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD), el Instituto de Estándares Clínicos y de laboratorio (CLSI) disminuyó los puntos de corte de los carbapenémicos en 2010 y recomendó realizar pruebas fenotípicas confirmatorias como el test de Hodge modificado (THM) para el control de la diseminación de las carbapenemasas. En el año 2015, la versión M100-S25 de los estándares para pruebas de susceptibilidad, incorporaron el test bioquímico Carba NP para la

detección de carbapenemasas, siendo la primera vez que se recomienda su aplicación además de Enterobacteriaceae en no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Los métodos de detección basados en el uso de discos con inhibidores como ácido fenilborónico (APB) el cual no es recomendado por CLSI, presentan sensibilidad y especificidad cercanas al 100% en la detección de carbapenemasas clase A. Sin embargo, se han reportado resultados falsos positivos con cepas productoras de Betalactamasas tipo AmpC como *Enterobacter spp* y *Serratia spp.* A pesar de que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sigue siendo la metodología más sensible y específica para la determinación de este tipo de enzimas, su acceso a los laboratorios de rutina no se encuentra masificado debido a los costos y el entrenamiento requerido para su implementación. (J.A. Reyes-Chacón, 2017)

A partir del año 2012 se comienza a implementar una nueva prueba llamada Inactivación de carbapenémico (mCIM), ( Doyle et al., 2012; Nordmann et al., 2012; van der Zwaluw et al., 2015 ) al parecer una prueba altamente sensible, específica y económica para el tamizado de Enterobacterias productoras de carbapenemasas ( van der Zwaluw et al., 2015 ). (Yamada, 2016) . Este método está basado en la capacidad de la enzima carbapenemasas de hidrolizar una concentración de 10µg de Meropenem (MEM) contenida en un sensidisco de papel de filtro mediante la elución del mismo en agua destilada estéril.

Hasta el momento no hay suficiente información en la literatura sobre las características operativas del método modificado de inactivación de carbapenémicos y es por ello, que nos hemos trazado como objetivo, comparar las diferentes herramientas fenotípicas ya instauradas en el Laboratorio Clínico de una institución de cuarto nivel de complejidad, Hospital Universitario San Ignacio, como lo son, test de Hodge, pruebas de sinergismo con ácido borónico y EDTA y el método de inactivación de carbapenémicos, aun no utilizado en la institución, con el método de detección molecular de genes de resistencia a carbapenémicos.

### **3. MARCO TEÓRICO**

La familia Enterobacteriaceae, que son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 µm de largo y 0,5 µm de diámetro. Como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS)

(en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunas organelos complejas que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos. Junto con otros factores, la presencia del antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, siendo capaces por tanto de sobrevivir más tiempo en sangre y causando infecciones hematógenas, diseminadas y más graves (Puerta-García, 2010)

El principal mecanismo de resistencia en Enterobacteriaceae está relacionado con la producción de enzimas betalactamasas tales como Betalactamasas de espectro extendido (ESBL), Betalactamasas AmpC y carbapenemasas (Enterobacteriaceae productora de carbapenemasas (EPC) Los genes de resistencia a Cefalosporinas y carbapenémicos se encuentran en plásmidos, que pueden transmitirse entre especies, lo que facilita su propagación en hospitales y comunidades. Estos plásmidos generalmente albergan múltiples genes de co-resistencia adicionales, que incluyen trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, lo que hace que estas infecciones sean difíciles de tratar. (Moxon, 2016)

Las carbapenemasas detectadas en Enterobacteriaceae son en gran parte de los tipos KPC, VIM, NDM, IMP y OXA-48. Aunque el origen epidemiológico y la distribución geográfica de las carbapenemasas son claramente diferentes, todos aparecieron por primera vez a fines del siglo XX. Solo una década más tarde, estas enzimas ya se han establecido y se han expandido a nivel mundial. (Oteo, 2014)

Las Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) son Enterobacterias que han adquirido genes (generalmente a través de plásmidos) que codifican enzimas beta-lactamasas que hidrolizan carbapenémicos. (Nordmann, 2012)

La hidrólisis enzimática de carbapenémicos (es decir, la propiedad definitoria de un EPC) puede ser conferida por varias enzimas betalactamasas que son estructural y funcionalmente distintas y atraviesan 3 Ambler diferentes y 2 grupos diferentes de Bush-Jacoby. Dependiendo del tipo genético, se caracterizan por la capacidad de hidrolizar todas las clases de antimicrobianos betalactámicos, incluidas las penicilinas, las cefalosporinas, el aztreonam y los carbapenémicos, y generalmente no son inhibidas por los inhibidores de la beta-lactamasa actualmente utilizados. Con frecuencia se asocian con la expresión simultánea de genes de resistencia para otros antibióticos. Dos tipos de EPC de particular importancia clínica: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC) y Nueva Delhi Metallo-beta-lactamasa-1 (NDM-1). Otro tipo de EPC digno de mención son OXA-48 EPC (Ambler clase D), visto originalmente en la cuenca del Mediterráneo pero que se está extendiendo lentamente a otras áreas. (Moxon, 2016)

En muchas ocasiones es difícil la detección de EPC en el laboratorio, ya que los puntos de corte clínicos no son útiles, y pueden aparecer como sensibles en el antibiograma, además pueden presentar diferentes niveles de expresión y aparecer como heterorresistentes, y esto hace que las pruebas de sensibilidad tengan una baja reproducibilidad, lo que junto a la presencia frecuente de otros mecanismos de resistencia (BLEE, AmpC cromosómico o plasmídico) pueden enmascarar la presencia de la carbapenemasas. Por tanto, la detección de la presencia de una EPC requiere un análisis pormenorizado del antibiograma y de la sensibilidad a todos los betalactámicos, la implementación con métodos fenotípicos de cribado y la confirmación mediante detección de la hidrólisis del carbapenémicos, la inhibición de la actividad de la enzima con inhibidores específicos y la diferenciación del tipo de carbapenemasas mediante métodos moleculares basados principalmente en técnicas de PCR. (Cercenado, 2015)

La sensibilidad a meropenem ofrece el mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. El Ertapenem presenta excelente sensibilidad, pero baja especificidad, especialmente en especies de *Enterobacter spp.*, debido a su relativa inestabilidad frente a beta-lactamasas de espectro extendido y Betalactamasas de tipo AmpC en combinación con pérdida de porinas. En el caso del imipenem, la separación entre la población salvaje y la productora de carbapenemasas estableciendo este punto de corte no está bien diferenciada, por tanto, no se recomienda el uso único de este carbapenémico para realizar el cribado. Las EPC portadoras de enzimas de tipo KPC suelen presentar valores elevados de CMI de carbapenémicos, cefalosporinas y aztreonam, mientras que en las portadoras de enzimas de tipo metalo-beta-lactamasas, los valores de CMI son inferiores y presentan sensibilidad a aztreonam. Finalmente, las EPC portadoras de la enzima OXA-48, suelen aparecer como sensibles en el antibiograma a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, al aztreonam y también a los carbapenémicos, con la excepción de ligeras elevaciones de CMI en el caso de Ertapenem, pero

presentan elevada resistencia a amoxicilina-clavulánico o piperacilina-tazobactam. (Cercenado, 2015)

La comprobación del hidrólisis de las carbapenemasas se puede realizar mediante ensayos espectrofotométricos, que miden la hidrólisis del carbapenémico en presencia de la bacteria presuntamente productora de la carbapenemasas, o bien mediante métodos proteómicos que comparan el espectro MALDITOF generado por un antibiótico carbapenémico, no hidrolizado, con el que se obtiene tras la hidrólisis del anillo beta-lactámico por la carbapenemasas. También se puede determinar si existe hidrólisis del carbapenémico mediante un ensayo biológico como el test de Hodge modificado. Este test se basa en la inactivación del carbapenémico por la carbapenemasas producida por una bacteria, lo que permite a una cepa indicadora y sensible a las carbapenemasas extender su crecimiento cerca del disco del carbapenémico y a lo largo de la estría de la cepa productora de la carbapenemasas. Este test no está recomendado por el EUCAST por su baja especificidad y por la dificultad en la interpretación de los resultados en bacterias con otros mecanismos de resistencia a betalactámicos. (Cercenado, 2015)

Recientemente se ha desarrollado un test colorimétrico rápido (2 horas), denominado Carba NP test, basado en la detección colorimétrica de la hidrólisis del imipenem. Cuando se produce esta hidrólisis, hay un cambio de pH y, en consecuencia, un cambio de color rojo a amarillo/naranja que confirma la producción de carbapenemasas. Este test tiene una buena especificidad, pero baja sensibilidad para la detección del enzima OXA-489. En cuanto a la diferenciación del tipo de carbapenemasas, los métodos basados en la inhibición de la enzima en presencia de compuestos inhibidores específicos para las beta-lactamasas de clase A, B y C, tienen una buena sensibilidad. La inhibición con ácido fenilborónico indica la presencia de una carbapenemasas de clase A (KPC u otras); la inhibición con ácido fenilborónico y con cloxacilina indica la presencia de una Betalactamasas de tipo AmpC; la inhibición con ácido dipicolínico o con EDTA indica la presencia de una metalo-beta-lactamasa (clase B, tipos VIM, IMP, NDM), y la ausencia de inhibición con los inhibidores anteriormente descritos indica la presencia de una betalactamasa de clase D (OXA-48 y derivados). Los algoritmos recomendados por EUCAST resultan de gran utilidad para la diferenciación de los distintos tipos de enzimas. (Cercenado, 2015)

Una nueva prueba fenotípica, llamada Método de inactivación de Carbapenémico (mCIM), se desarrolló para detectar la actividad carbapenemasas en bacterias Gram-negativas dentro de las ocho horas. Este método mostró una alta concordancia con los resultados obtenidos por PCR para detectar genes que codifican las carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP y OXA-23. Permite la detección confiable de la actividad carbapenemasas codificada por varios genes en especies de *Enterobacteriaceae* (p. Ej., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*), pero

también en no fermentadores *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. (Van Der Zwaluw, 2015)

#### **4. OBJETIVOS**

**4.1. OBJETIVO GENERAL:** Determinar la concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias.

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Comparar el método modificado de inactivación de carbapenémicos (mCIM) y test de Hodge para la detección de resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba modificada de Inactivación de carbapenémico y el test de Hodge respecto a la detección molecular de genes de resistencia a carbapenémicos.

#### **5. DISEÑO METODOLOGICO:**

**5.1. Tipo de estudio:** Observacional retrospectivo

#### **5.2. Criterios de inclusión:**

- Aislamientos correspondientes a Enterobacterias con resistencia a algún carbapenémico comprendidos entre 2014 a diciembre de 2017, conservados en el Cepario del Hospital Universitario San Ignacio.
- Aislamientos correspondientes a Enterobacterias BLEES positivas, con sensibilidad a carbapenémicos, comprendidos entre 2014 a diciembre de 2017, conservados en el Cepario del Hospital Universitario San Ignacio.

#### **5.3. Criterios de Exclusión**

- Aislamientos provenientes de años diferentes al periodo 2014 y diciembre de 2017.
- Aislamientos de microorganismos diferentes a la familia de las Enterobacterias.

**5.4. Tamaño de la muestra:** 89 aislamientos de Enterobacterias con resistencia a algún carbapenémico y 89 Enterobacterias BLEES positivas, con sensibilidad a carbapenémicos.

**5.5. CONTROL DE CALIDAD:** Las cepas control usadas para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron: *E.coli* ATCC 25922, control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 y control negativo *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó estadística descriptiva a nivel univariado para variables cuantitativas, reportando media y desviación estándar. En el presente estudio se determinaron las características operativas del Test de Hodge y el método modificado de inactivación de carbapenémico usando como estándar de oro la técnica de (PCR) GenXpert. Adicionalmente se determinó la concordancia entre el Test de Hodge y método modificado de inactivación de carbapenémico; entre el método modificado de inactivación de carbapenémico y GenXpert; y la concordancia entre el test de Hodge y GenXpert. 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 con Test de Hodge y método modificado de inactivación de carbapenémico; el método modificado de inactivación de carbapenémico y GenXpert; y el test de Hodge y GenXpert, se calculó un coeficiente Kappa de Cohen nominal y su intervalo de confianza al 95%. De acuerdo a los criterios propuestos por Landis y Koch en 1971 (Landis J., 1977) se asumió concordancia entre los métodos si el estadístico fue  $\leq 0.80$ . (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** (Landis J., 1977)

## 7. METODOLOGÍA:

### **Viabilidad Aislamientos de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos del Cepario de un Hospital de cuarto nivel de complejidad:**

El Cepario del Hospital cuenta con un gran número de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, e igualmente cuenta con aislamientos de Enterobacterias BLEES positivas, con sensibilidad a carbapenémicos. Del cepario fueron escogidos 89 aislamientos BLEES positivos y 89 aislamientos resistentes a algún carbapenémico (meropenem o ertapenem). Las muestras se

encuentran conservadas a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , las cuales serán subcultivadas en cajas con Agar Nutritivo, proporcionando los nutrientes y fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para su óptimo crecimiento; estas serán aisladas en agar Mac conkey y agar sangre e incubadas durante 48 horas para observar viabilidad y pureza.

En aquellos agares donde se observe crecimiento, indican que hay viabilidad. Aquellas que se encuentren viables se reconfirmaran en su identificación por medio de pruebas bioquímicas para determinar su pureza.

### **Método modificado de Inactivación de Carbapenemasas (mCIM):**

Para cada aislamiento a evaluar, disolver la cantidad correspondiente a  $1\mu\text{l}$  de un cultivo fresco proveniente de agar sangre, en 2 ml de tripticasa de soja. Después de esto mezclar con vortex 10-15 segundos, agregar al tubo de tripticasa de soja un disco de meropenem de  $10\mu\text{g}$ . Asegurarse que todo el disco quede sumergido en la suspensión. Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis, durante  $4\text{ hs.} \pm 15\text{ min.}$  Justo antes o inmediatamente a continuación de la incubación de la suspensión con el disco de meropenem, se preparó una suspensión de 0.5 de Mc Farland de *E. coli* ATCC 25922 en solución salina. Después se inoculó una placa con agar Mueller Hinton con la suspensión de *E. coli* ATCC 25922. Las placas inoculadas con la suspensión se dejaron secar por 3-10 min antes de agregar el disco de meropenem. Después de esto, se removió el disco de meropenem de la suspensión del aislamiento en estudio utilizando un asa de  $10\mu\text{l}$ . Se presionó contra las paredes del tubo para remover el exceso de líquido del disco y se puso el disco en la placa de MH previamente inoculada con la cepa ATCC y se llevó a incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis, durante 24 horas. Luego de la incubación, se hizo la lectura e interpretación de los resultados teniendo en cuenta que los resultados Negativos tendrían un halo de inhibición  $>19\text{ mm}$ , resultados positivos zonas de inhibición 6-15 mm (colonias dentro del halo de inhibición) y resultados indeterminados zona de inhibición entre 16-18 mm sin la presencia de colonias en el halo. (Testing, 2015)

### **Test de Modificado de Hodge:**

Se preparó una suspensión estándar de 0,5 Mc Farland (utilizando suspensión colonia directa) de *E. coli* ATCC 25922 en solución salina, después se inoculó una placa mueller hinton como para el procedimiento de difusión de disco de rutina. Se dejó secar el inóculo de la placa de 3 a 10 minutos. Se puso un disco de meropenem de  $10\text{ mg}$  en la placa. Usando un asa de  $10\mu\text{l}$ , se sembró en línea recta desde el borde del disco hasta el final de la placa tres cepas problema y el control,

se llevó a incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas y después de esto se realizó la correspondiente lectura e interpretación de resultados: sabiendo que un resultado positivo se evidencia por el crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al disco. Esto indica la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberadas al medio y permiten el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y en un resultado negativo no se presenta crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en el punto de intersección de la estría de la cepa problema y el halo de inhibición generado por el carbapenémico. (Cercenado, 2015)

### **Test de sinergismo con ácido borónico y EDTA:**

La prueba de sinergismo con EDTA, consistió en realizar una siembra de la cepa problema mediante el método de Kirby-Bauer con el microorganismo problema (densidad ajustada a 0,5 McFarland) y se inoculó una placa de agar Mueller Hinton, después de esto se agregaron discos de Imipenem, EDTA, Meropenem y ácido borónico (10 ug) en línea recta, dejando 15 mm de distancia entre disco y disco, se incubaron por 18h a  $35^{\circ}\text{C}$ . Se buscó la sinergia entre los discos en los que se evidenció una deformidad en los halos de inhibición y de esta manera el resultado fue positivo y en los que no se evidenció sinergia fueron reportados como negativos. (Esther, 2017)

### **Prueba GeneXpert**

A los mismos aislamientos que se le realizaron las pruebas fenotípicas confirmatorias de resistencia a carbapenémicos se le realizó la prueba de carbapenemasas mediante el método de GeneXpert, utilizando el equipo, PCR en tiempo real GeneXpert Referencia 703896, que se encuentra en las instalaciones del laboratorio clínico del Hospital Universitario San Ignacio. El Kit a utilizar es Xpert®Carba-R (Cepheid®) el cual está estandarizado tanto para muestras de hisopado rectal como a partir de cultivos. Es capaz de detectar los genes *kpc*, *ndm*, *vim*, *imp-1* y *oxa-48*.

## 8. RESULTADOS

Se incluyeron 178 cepas de Enterobacterias conservadas en el cepario del Hospital Universitario San Ignacio, las cuales fueron clasificadas en dos grupos; 89 cepas resistentes al menos un carbapenémico (Meropenem, Ertapenem) y 89 cepas sensibles a carbapenémicos, pero con test de BLEES positivo.

### 8.1. Sensibilidad y especificidad Método modificado de inactivación comparado con Gen Xpert.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos en la prueba fenotípica para la detección de carbapenemasas con el Método modificado de inactivación de carbapenémico al ser comparado con el Gold Standard PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Por el equipo Gen Xpert®.

Sensibilidad	96%
Especificidad	98%
VPP	98%
VPN	95%

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del Método modificado de inactivación comparado con Gen Xpert

### 8.2. Sensibilidad y especificidad Test de Hodge comparado con Gen Xpert.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos por el método de Hodge al ser comparado con el Gold Standard PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) por equipo Gen Xpert.

Sensibilidad	97%
Especificidad	97%
VPP	97%
VPN	97%

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad del Test de Hodge comparado con Gen Xpert

### 8.3. Comparación de los resultados obtenidos por el Método modificado de inactivación de carbapenémico y Test de Hodge con respecto a Gen Xpert

Se realizó índice Kappa de cohen con el fin de observar la concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico y test de Hodge, el cual arrojó un valor de 0.95 teniendo en cuenta esto, el método en estudio tiene una concordancia “casi perfecta” con respecto al Gold Standard. (Tabla 4)

	Test de Hodge			
Método mCIM	POSITIVOS	NEGATIVOS	Total	Índice Kappa
				$K = (PA-PE) / (1-PE)$
POSITIVOS	88 (A)	2 (B)	90(R1)	<b>K= 0,95</b>
NEGATIVOS	5 (C)	83 (D)	88(R2)	PA= A+D/n
Total	93 (L1)	85 (L2)		PE= (R1/n)(L1/n)/(R2/n)(L2/n)

**Tabla 4. Cálculo de índice Kappa para método modificado de inactivación de carbapenémico en comparación con Test de Hodge.**

También se determinó índice Kappa de cohen para observar concordancia entre el agar el Método modificado de inactivación de carbapenémico y Gen Xpert, dando como resultado 0.96, lo que nos lleva a decir que el método modificado de inactivación de carbapenémico tiene una concordancia “casi perfecta” con respecto al Gold Standard. (Tabla5)

	GenXpert			
Método mCIM	POSITIVOS	NEGATIVOS	Total	Índice Kappa
				$K = (PA-PE) / (1-PE)$
POSITIVOS	89(A)	1(B)	90(R1)	<b>K= 0,96</b>
NEGATIVOS	4(C)	84(D)	88(R2)	PA= A+D/n
Total	93 (L1)	85 (L2)		PE= (R1/n)(L1/n)/(R2/n)(L2/n)

**Tabla 5. Cálculo de índice Kappa para método modificado de inactivación de carbapenémico en comparación con Gen Xpert.**

Por último, se realizó de igual manera índice de Kappa de cohen para observar la concordancia entre el test de Hodge y Gen Xpert, dando como resultado 0.97, lo que nos lleva a decir que el Test de Hodge tiene una concordancia “casi perfecta” con respecto al Gold Standard. (Tabla6)

	GenXpert			
Test de Hodge	POSITIVOS	NEGATIVOS	Total	Índice Kappa
				$K = (PA-PE) / (1-PE)$
POSITIVOS	91(A)	2(B)	93(R1)	<b>K= 0,97</b>
NEGATIVOS	2(C)	83(D)	85(R2)	PA= A+D/n
Total	93 (L1)	85 (L1)		PE= (R1/n)(L1/n)/(R2/n)(L2/n)

**Tabla 6. Cálculo de índice Kappa para test de Hodge en comparación con Gen Xpert.**

Se encontraron 4 falsos negativos por el método modificado de inactivación de carbapenémico ya que el gold estándar GenXpert detectó la presencia de genes de resistencia KPC y el método en estudio dio como resultado para estas cepas negativo es decir no detectó la presencia de carbapenemasas. (Tabla 7)

MICROORGANISMO	MEROPENEM	ERTAPENEM	TEST DE HODGE	ACIDO BORONICO	EDTA	METODO mCIM	GENEXPERT
<i>K.pneumoniae</i>	RESISTENTE	RESISTENTE	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	KPC
<i>K.pneumoniae</i>	INTERMEDIO	RESISTENTE	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	KPC
<i>K.pneumoniae</i>	RESISTENTE	RESISTENTE	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	KPC
<i>K.pneumoniae</i>	RESISTENTE	RESISTENTE	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	KPC

**Tabla 7. Falsos negativos por el Método modificado de inactivación de carbapenémicos**

Se encontró 1 falso positivo por el método modificado de inactivación de carbapenémico ya que el gold estándar GenXpert no detectó la presencia de ningún gen de resistencia y el método en estudio dio como resultado para esta cepa positivo es decir detectó la presencia de carbapenemasas en la cepa estudiada. (Tabla 8)

MICROORGANISMO	MEROPENEM	ERTAPENEM	TEST DE HODGE	ACIDO BORONICO	EDTA	METODO mCIM	GENEXPERT
<i>K.pneumoniae</i>	SENSIBLE	RESISTENTE	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NO DETECTO

**Tabla 8. Falso positivo por el Método modificado de inactivación de carbapenémico**

Se encontraron 2 falsos positivos por el test de Hodge ya que el gold estándar GenXpert no detectó ningún tipo de gen de resistencia y el test de Hodge dio como resultado para estas dos cepas positivo es decir que detectó la presencia de carbapenemasas en las dos cepas estudiadas. (Tabla 9). El test de Hodge no presento ningún caso de falsos negativos.

MICROORGANISMO	MEROPENEM	ERTAPENEM	T.HODGE	Ácido Boronico	EDTA	Método mCIM	GENEXPERT
<i>K.pneumoniae</i>	SENSIBLE	RESISTENTE	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	NO DETECTO
<i>K.pneumoniae</i>	RESISTENTE	RESISTENTE	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	NO DETECTO

**Tabla 9. Falsos positivos por test Hodge**

En el estudio molecular GenXpert realizado a las 89 cepas resistentes a carbapenémicos se detectó que 84 (94,4%) de cepas tenían el gen KPC, sin embargo, en 2 (2,2%) de las cepas GenXpert no detecto ningún gen de resistencia. De igual forma se realizó esta prueba para las 89 cepas BLEES positivo sensibles a carbapenémicos encontrando que en 83 cepas (93,3%) la

prueba GenXpert no detecto ningún tipo de gen que le confiriera resistencia a carbapenémicos, pero por otro lado, se encontraron 6 (6,7%) casos en los cuales se detectó la presencia del gen KPC, a pesar de haber resultado en la prueba de microdilución, sensible a ertapenem y meropenem. (Tabla10).

Genes GenXpert	N° Cepas Resistentes a meropenem y/o ertapenem	Porcentaje (%)	N° Cepas Sensibles a meropenem y ertapenem	Porcentaje (%)
NO DETECTO	2	2,2	83	93,3
KPC	84	94,4	6	6,7
VIM-KPC	3	3,4	0	0
IMP-1	0	0	0	0
NDM	0	0	0	0
OXA-48	0	0	0	0
OXA-181	0	0	0	0
Total	89	100,0	89	100,0

Tabla 10. Genes detectados por la prueba molecular GenXpert en las cepas resistentes a carbapenémicos y en las cepas BLEES positivas sensibles a carbapenémicos.

Las pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias realizadas en las cepas resistentes dieron como resultado positivo en el test de hodge, Sinergia con ácido borónico, sinergia con EDTA y método modificado de inactivación 96,6% ,91%, 3,4% y 94,4% respectivamente. En cuanto a las cepas sensibles se evidencio que 6 aislamientos sensibles los carbapenémicos (4 aislamientos de *Klebsiella spp.* Y 2 aislamientos de *E. coli*), con MIC tanto para ertapenem como para meropenem menores a 1 ug/ml. presentaron resultado positivo para test de Hodge (6/6), ácido borónico (1/6), EDTA (0/6) y mCIM (6/6) .(Tabla 11)

	Test de Hodge Positivo	Sinergia con Ácido Borónico Positivo	Sinergia con EDTA Positivo	Método mCIM Positivo
Cepas Resistentes	96,6	91	3,4	94,4
	3,4	9	96,6	5,6
Cepas Sensibles	6,7	1,1	0	6,7
	93,3	98,9	100	93,3

Tabla 11. Porcentaje de resultados positivos y negativos de las pruebas fenotípicas en Enterobacterias Resistentes a carbapenémicos y Enterobacterias BLEES positivo sensibles a carbapenémicos.

## 9. DISCUSIÓN

La necesidad de contención de la diseminación de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, tanto en el ámbito intrahospitalario como también en la comunidad, es de interés interdisciplinario, ya que mientras el clínico se preocupa por el buen manejo de antibióticos evitando presión selectiva de los mismos; el laboratorio de microbiología, aumenta esfuerzos en generar herramientas metodológicas de detección de estos microorganismos tanto como colonizantes como infectantes. (J.A. Reyes-Chacón, 2017) (Jesús Oteo, 2014)

Es por tal motivo que evitar la propagación de estas bacterias se ha convertido en un imperativo. A lo largo del tiempo se ha evaluado la resistencia a carbapenémicos mediante ensayos de susceptibilidad fenotípica en placas de agar o en sistemas de microbiología automatizados. Dentro de los métodos de detección actualmente utilizados se incluyen la prueba Carba NP como método bioquímico de detección, la prueba de Hodge y pruebas de sinergismo que nos acercan a conocer el tipo de carbapenemasas posiblemente presente en el microorganismo. A partir del año 2017, CLSI, recomienda una nueva prueba fenotípica llamada método modificado de inactivación de carbapenémicos, prueba manual, práctica de realizar, sin embargo, el tiempo de realización y lectura es aproximadamente 4-5 horas más que lo que se requiere para el montaje y lectura de las anteriores pruebas mencionadas. (Kuchibiro, 2018)

En la actualidad, la mayoría de los laboratorios realizan pruebas fenotípicas de confirmación; es complicado pensar en tener herramientas moleculares en la rutina; por ello la importancia de conocer las características operativas de cada prueba posible de utilizar, y evaluar en conjunto con la practicidad, oportunidad y costos que cada una de ellas presenta. En este estudio se evidencio la alta concordancia entre los métodos fenotípicos de confirmación de presencia de Enterobacterias productoras de carbapenemasas, Método modificado de inactivación e Test de Hodge con respecto a PCR convencional (GeneXpert) esta última considerada como el "Gold standard" en cuanto a pruebas confirmatorias se refiere.

Una concordancia casi perfecta se observó entre el Método modificado de inactivación de carbapenémico y el método molecular de PCR con un índice Kappa cercano a 1, esto acorde con lo reportado por Reyes, J. y colaboradores, quienes en el 2017 analizaron 88 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E.coli*, *S. marcescens*, *C. freundii* sensibles y 91 resistentes a los carbapenémicos. aislamientos de Enterobacterias y obtuvieron un índice Kappa de 1 entre la PCR el método modificado de inactivación de carbapenémicos. También el resultado obtenido en nuestro trabajo, es similar a lo reportado por Yamada, K. y Kashiwa, M. En el año 2016, donde el

método modificado de inactivación de carbapenémicos tuvo el mayor índice de concordancia con respecto a la amplificación por PCR para los genes Ampc,  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido y IMP, NDM, OXA-48 y KPC en comparación test modificado de Hodge, Carba NP y método modificado de inactivación.

En cuanto a los 4 casos falsos negativos del método cMIC que se presentaron en nuestro proyecto, esto resulta diferente a lo poco reportado en la literatura; tal es el caso de Kuchibiro, T y colaboradores, quienes en el 2018, al trabajar con 207 aislamientos de Enterobacterias no reportan ningún caso de falso negativo por el contrario mostró excelentes resultados con una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de Enterobacterias productoras de carbapenemasas mediante el método modificado de inactivación de carbapenémico. En la literatura encontrada al respecto, no se presentan posibles explicaciones a los falsos negativos, ya que evidencian no presentarse.

En nuestro caso, los 4 falsos negativos para cMIC, fueron positivos para otras pruebas fenotípicas como Test de Hodge (4/4) y ácido borónico (3/4), y fueron repetidas las pruebas, para descartar falla en el montaje, consiguiendo el mismo resultado negativo en las pruebas.

Con respecto al único caso falso positivo encontrado en la prueba de mCIM, se reconoce la limitante de la tecnología utilizada geneXpert, en el sentido de que solo es posible estudiar 5 genes de resistencia a carbapenémicos, KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48 (March-Rosselló, 2017), de tal manera, que es posible que no sea un caso de falso positivo sino que el aislamiento posee un gen de resistencia a carbapenémicos diferente a los cinco mencionados anteriormente, como por ejemplo, un gen de clase A como GES, SME, IMP, NCM-A (Yohei Doi, 2015), no pensamos en la posibilidad de una metalobetalactamasa ya que la prueba de sinergismo con EDTA resulto negativa. De no ser esta la explicación, igualmente puede suceder que los aislamientos sean resistentes a carbapenémicos, pero no por presencia de carbapenemasas sino por otros mecanismos como bombas de expulsión o cambios en la permeabilidad de la membrana externa. (José David Tafur, 2008)

En este estudio el Método modificado de inactivación de carbapenémico demostró un alto porcentaje de especificidad (98%) y VPN de 95%, esto acorde con lo reportado por Tamma PD, y colaboradores en el año 2017 donde la especificidad general para todas las Enterobacterias productoras de carbapenemasas fue superior al 98% de especificidad.

Cabe resaltar, que este es el primer estudio que se realiza en Colombia, donde se evalúan las características operativas de prueba de mCIM, y los resultados permiten recomendar su

uso de manera similar a la del Test de Hodge, arrojando mejores resultados en éste estudio, éste último.

En nuestro estudio la concordancia mostró un comportamiento “casi perfecto” con respecto a la prueba molecular. Esta información es un aporte, ya que en la literatura científica no se encuentran datos que hablen sobre la concordancia de este método fenotípico con respecto a las pruebas moleculares.

Con respecto a la sensibilidad y especificidad del test de Hodge, esta técnica presenta buena sensibilidad para la detección de algunas carbapenemasas, pero no está exenta de inconvenientes como son la dificultad en la interpretación y la ocurrencia de resultados falsos positivos debido a la producción de otras  $\beta$ -lactamasas como AmpC o BLEE. (Alba Riveraa, 2014)

En nuestro estudio tanto la sensibilidad como la especificidad encontrada fue de 97% lo cual es contrario según lo reportado por Carvalhaes CG y colaboradores quienes en el 2017 analizaron 78 aislados de Enterobacterias productoras de carbapenemasas y reportaron baja sensibilidad y especificidad de esta prueba en la detección de carbapenemasas. Contrario a esto y de acuerdo a nuestros hallazgos Doi Y. y colaboradores en el año 2015 reportaron la alta sensibilidad y especificidad del test de Hodge en la detección de carbapenemasas en cepas productoras de KPC.

En nuestra prueba de Test de Hodge, se encontraron 2 casos falsos positivos lo cual podría deberse a la presencia de otro tipo de genes los cuales están fuera del alcance de detección del método genotípico evaluado (GeneXpert). o de no ser así, también podría estar relacionado con la hipótesis manejada por otros autores sobre la posibilidad de que los aislamientos estén presentados otros mecanismos de resistencia tales como ESBL o AmpC (Yamada, k., y Kashiwa, M., 2016)

Colombia es considerada como una región endémica para carbapenemasas tipo KPC (María F. Mojica, 2012), (Ovalle M.V ,2017)y esto se ve confirmado en nuestro hallazgo de 94.4% de carbapenemasas tipo KPC encontradas en el grupo de 89 aislamientos con resistencia a algún carbapenémico; incluso los 6 casos encontrados dentro del grupo de sensibles a carbapenémicos resultaron ser gen KPC. ,

Con respecto a nuestras cepas control BLEES positivo sensibles a carbapenémicos este estudio detecto gen KPC en 6,7 % de las 89 cepas estudiadas, de igual forma los métodos fenotípicos de detección Test de Hodge y Método modificado de inactivación detectaron la presencia de

carbapenemasas en un 6,7%. Siendo esta una excelente oportunidad para poner de manifiesto la necesidad de buscar posibles carbapenemasas con pruebas fenotípicas que han demostrado tener el poder de hacerlo como test de Hodge y cMIC, en aquellos aislamientos de Enterobacterias que, aunque muestren sensibilidad a los carbapenémicos, posean mecanismos de resistencia a betalactámicos tales como las BLEEs.

## **10. CONCLUSION**

Ante la imposibilidad de los laboratorios de rutina de realizar pruebas moleculares para confirmación de presencia de carbapenemasas en Enterobacterias, éstos pueden escoger realizar pruebas fenotípicas de confirmación tanto para aislamientos con resistencia a carbapenémicos como en aislamientos con sensibilidad a los mismos, pero con mecanismos de resistencia a betalactámicos como es el caso de las enterobacterias BLEEs

El test de Hodge continúa siendo el mejor método fenotípico para confirmación de presencia de carbapenemasas. El test modificado de inactivación al carbapenémico puede ser usado como método alternativo, a pesar de generar un mayor número de resultados falsos positivos.

## **11. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios de PCR convencional en búsqueda de otros genes de resistencia tipo serina diferentes a los que ofrece GeneXpert, al aislamiento falso positivo presentado por cMIC y por test de Hodge.
- Realizar estudios que revelen las posibles causas de la presencia de falsos negativos en la prueba de cMIC, resultando positivos para las demás pruebas fenotípicas de confirmación como Test de Hodge y Ácido Borónico.
- Realizar pruebas fenotípicas de confirmación de carbapenemasas (test de Hodge o cMIC) a aquellos aislamientos sensibles a carbapenémicos, pero BLEEs positivos.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alba Rivera, N. L. (2014). Importance of quality control for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotic resistance in Enterobacteriaceae, 4;32:30-36.
- Carvalhaes CG, C. R. (2017). Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal Clin Microbiol*, 2013;51:287-90.
- Cercenado, E. (2015). Laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. . *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 8-11.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *M100 28th*, 1-296.
- Esther, J. &. (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*.
- Hernández-Gómez C, B. V. (2014). Evolution of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli from intensive care units in Colombia. *Biomédica*, 34:91-100.
- J.A. Reyes-Chacón, e. a. (2017). Carbapenem inactivation, an alternative method to detect carbapenemase type KPC in Enterobacteriaceae. *Infectio*, 21(4): 251-254.
- Jesús Oteo, E. C.-G. (2014). The threat of the carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain: Positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 32(10):666–670 .
- José David Tafur, J. A. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3) 217-226.
- Kuchibiro, T. K. (2018). Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(4), 262-266.
- Landis J., K. G. (1977). *The measurement of observer agreement for categorical data* *Biometrics*. 159-174.
- Maldonado, N. C. (2016). Ertapenem resistance in 2 tertiary-care hospitals: Microbiology, epidemiology, and risk factors. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*.
- March-Rosselló, G. A. (2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3):182–188.
- María F. Mojica, A. C. (2012). Molecular correlations of the propagation of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia . *Revista Internacional de Agentes Antimicrobiano*, 277-279.
- María Victoria Ovalle, S. Y. (2017). Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica* , ;37:473-85.
- Moxon, C. A. (2016). Beta-lactamases in Enterobacteriaceae infections in children. *Journal of Infection*, 72, S41-S49.
- Navarro, A. O. (2015). Bacteremia due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. A cross-sectional study. *Infectio*, 19(2), 60-66.
- Nordmann, P. D. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*, 18(5), 263-272.

- Oteo, J. M.-V. (2014). Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32, 17-23.
- Puerta-García, E. A.-R. (2010). Enterobacterias. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426–31.
- Spyros Pournaras, O. Z.-D. (2013). A Combined Disk Test for Direct Differentiation of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Surveillance Rectal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 2986 –2990.
- Tamma, P. D. (2017). Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase- producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(4), 1046–1055.
- Testing, S. &. (2015). M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Testing. *CLSI*.
- 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 .
- Yamada, K. K. (2016). Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of microbiological* .
- Yohei Doi, M. P. (2015). Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Semin Respir Crit Care Med*, 36(1): 74–84.

## ANEXO 2

### CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES (Licencia de uso)

Bogotá, D.C., Junio 08 de 2018

Señores  
Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.  
Pontificia Universidad Javeriana  
Cuidad

Los suscritos:

Paula Andrea Guzmán Hernández, con C.C. No 1.032.481.429

En mi calidad de autor exclusivo de la obra titulada:

**Concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias**

Tesis doctoral  Trabajo de grado  Premio o distinción: Si  No   
cual: \_\_\_\_\_

presentado y aprobado en el año 2018, por medio del presente escrito autorizo a la Pontificia Universidad Javeriana para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mi obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autorizan a la Pontificia Universidad Javeriana, a los usuarios de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J., así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado un convenio, son:

AUTORIZO	SI	NO
1. La conservación de los ejemplares necesarios en la sala de tesis y trabajos de grado de la Biblioteca.		X
2. La consulta física o electrónica según corresponda		X
3. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer		X
4. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet		X
5. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previo convenio perfeccionado con la Pontificia Universidad Javeriana para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones		X
6. La inclusión en la Biblioteca Digital PUJ (Sólo para la totalidad de las Tesis Doctorales y de Maestría y para aquellos trabajos de grado que hayan sido laureados o tengan mención de honor.)		X

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho

lapso mi obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

De manera complementaria, garantizo en mi calidad de estudiante y por ende autor exclusivo, que la Tesis o Trabajo de Grado en cuestión, es producto de mi plena autoría, de mi esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi creación original particular y, por tanto, soy el único titular de la misma. Además, aseguro que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Pontificia Universidad Javeriana por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Pontificia Universidad Javeriana está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

**NOTA: Información Confidencial:**

Esta Tesis o Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de una investigación que se adelanta y cuyos

resultados finales no se han publicado. Si  No

En caso afirmativo expresamente indicaré, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

NOMBRE COMPLETO	No. del documento de identidad	FIRMA
Paula Andrea Guzmán Hernández	1.032.481.429	

FACULTAD: Ciencias Básicas

PROGRAMA ACADÉMICO: Bacteriología

Bogotá, D.C., Junio 08 de 2018

Señores

Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.

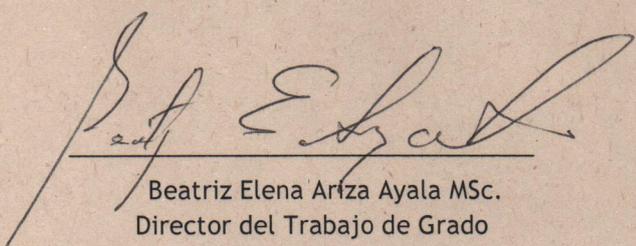
Pontificia Universidad Javeriana

Ciudad

Por medio de la presente yo, PAULA ANDREA GUZMÁN HERNÁNDEZ identificada con la célula número 1.032.481.429 de la ciudad de Bogotá, e inscrita en el programa de Bacteriología, me dirijo a ustedes para solicitar de manera atenta el manejo de la información contenida en el trabajo de grado titulado “CONCORDANCIA ENTRE EL MÉTODO MODIFICADO DE INACTIVACIÓN DE CARBAPENÉMICO (mCIM), TEST DE HODGE Y PRUEBAS DE SINERGISMO PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS” entregado el día 08 de Junio de 2018 en la Facultad de Ciencias- Dirección de la carrera de Bacteriología, el cual contiene INFORMACIÓN CONFIDENCIAL dado que hace parte de una investigación que se adelanta en la institución y cuyos resultados finales aún no se han publicado. Por lo tanto, solicitamos mantener la restricción al acceso de este trabajo hasta Julio del 2019.

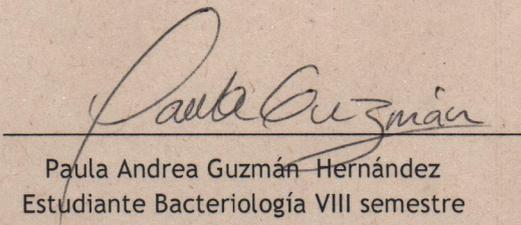
Por lo anterior, agradecemos la atención prestada y su colaboración

Atentamente,



---

Beatriz Elena Ariza Ayala MSc.  
Director del Trabajo de Grado  
[arizab@javeriana.edu.co](mailto:arizab@javeriana.edu.co)



---

Paula Andrea Guzmán Hernández  
Estudiante Bacteriología VIII semestre  
[pena-paula@javeriana.edu.co](mailto:pena-paula@javeriana.edu.co)

**ANEXO 3**  
**BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.**  
**DESCRIPCIÓN DE LA TESIS DOCTORAL O DEL TRABAJO DE GRADO**  
**FORMULARIO**

<b>TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO</b>			
<b>Concordancia entre el método modificado de inactivación de carbapenémico (mCIM), test de Hodge y pruebas de sinergismo para la detección de carbapenemasas en Enterobacterias</b>			
<b>SUBTÍTULO, SI LO TIENE</b>			
<b>AUTOR O AUTORES</b>			
<b>Apellidos Completos</b>		<b>Nombres Completos</b>	
Guzmán Hernández		Paula Andrea	
<b>DIRECTOR (ES) TESIS DOCTORAL O DEL TRABAJO DE GRADO</b>			
<b>Apellidos Completos</b>		<b>Nombres Completos</b>	
Ariza Ayala		Beatriz Elena	
Trespalacios Rangel		Alba Alicia	
<b>FACULTAD</b>			
<b>Ciencias Básicas</b>			
<b>PROGRAMA ACADÉMICO</b>			
<b>Tipo de programa ( seleccione con "x" )</b>			
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado
X			
<b>Nombre del programa académico</b>			
<b>Bacteriología</b>			
<b>Nombres y apellidos del director del programa académico</b>			
<b>Melva Yomary Linares Linares</b>			
<b>TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:</b>			
<b>Bacterióloga</b>			
<b>PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):</b>			
<b>CIUDAD</b>		<b>AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO</b>	
<b>Bogotá D.C</b>		<b>2018</b>	
<b>NÚMERO DE PÁGINAS</b>			<b>27</b>
<b>TIPO DE ILUSTRACIONES ( seleccione con "x" )</b>			
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos
		X	
Mapas	Fotografías	Partituras	
<b>SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO</b>			
<b>Nota:</b> En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.			
<b>MATERIAL ACOMPAÑANTE</b>			

TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					

#### DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS

Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo [biblioteca@javeriana.edu.co](mailto:biblioteca@javeriana.edu.co), donde se les orientará).

ESPAÑOL	INGLÉS
Cabapenémico	carbapenemic
Carbapenemasas	Carbapenemasas
Enterobacterias productoras de carbapenemasas	Enterobacteria producing carbapenemases

#### RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS

(Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)

#### RESUMEN

**Introducción:** La emergencia y diseminación de Enterobacterias productoras de carbapenemasas, en nuestro ámbito sanitario es una grave amenaza para la salud de los pacientes y para la salud pública (J.A. Reyes-Chacón, 2017). Es por ello que los laboratorios están siempre en la búsqueda de metodologías fiables, precisas y con mejor oportunidad de respuesta en la búsqueda tanto de pacientes colonizados como infectados por este tipo de microorganismos.

**Materiales y métodos:** Estudio observacional retrospectivo. Aislamientos de Enterobacterias con resistencia a algún carbapenémico, conservados en el cepario del HUSI y aislamientos de Enterobacterias BLEES positivas, sensibles a carbapenémicos. Se determinó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Se calculó el índice Kappa.

**Resultados:** Método modificado de inactivación de carbapenemasas (mCIM) obtuvo: Sensibilidad del 96%, especificidad 98%, VPP 98%, VPN 95 % en comparación con GenXpert. El test de Hodge obtuvo, Sensibilidad, especificidad, VPP, VPN 97 % respectivamente. Se detectaron cuatro falsos negativos y un falso positivo con respecto a la detección de EPC mediante mCIM. Se detectaron dos casos falsos positivos con el Test de Hodge.

**Conclusión:** Es importante la detección rápida y efectiva de estas Enterobacterias productoras de carbapenemasas para enfrentar esta problemática. El test de Hodge continúa siendo el mejor método fenotípico para confirmación de presencia de carbapenemasas. El mCIM a pesar de tener una concordancia casi perfecta con Genexpert, al generar un mayor número de resultados falsos positivos, puede ser usado como método alterno.

## SUMMARY

**Introduction:** The emergence and spread of carbapenemase-producing Enterobacteria, in public health, is a serious threat to the health of patients and to public health (J.A. Reyes-Chacón, 2017). That is why laboratories are always searching for reliable, accurate methodologies with the best response opportunity in the search of both colonized patients and those infected by this type of microorganisms.

**Materials and methods:** Retrospective observational study. Isolates of Enterobacteria with resistance to some carbapenemics, preservatives in the HUSI cemetery and positive BLEES Enterobacteria isolates, sensitive to carbapenems. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value were determined. The Kappa index was calculated.

**Results:** Modified method of inactivation of carbapenemases (mCIM) obtained: 96% sensitivity, 98% specificity, 98% PPV, 95% NPV compared to GenXpert. The Hodge test obtained, Sensitivity, specificity, VPP, NPV 97% respectively. Four false negatives and false positives were detected with respect to the detection of EPC by mCIM. Two cases of false positives were detected with the Hodge Test.

**Conclusion:** The possibility of these carbapenemase producing Enterobacteria is important to face this problem. The Hodge test continues to be the best phenotypic method for the confirmation of the presence of carbapenemases. The mCIM has an almost perfect match with Genexpert, generating a greater number of false positive results, it can be used as an alternative method.