

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA**

**Complejo Hospitalario Universitario de Granada**

**Virgen de las Nieves**



**TESIS DOCTORAL**

**APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA MALDI-TOF MS  
PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS**

**Yannick Hoyos Mallecot**

*Granada, 2015*

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Yannick Hoyos Mallecot  
ISBN: 978-84-9125-143-9  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40312>



El **Dr. José María Navarro Marí**, Jefe de Servicio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y el **Dr. José Gutiérrez Fernández**, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta el Licenciado **Yannick Hoyos Mallecot** “**APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA MALDI-TOF MS PARA LA DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el Grado de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 15 de Marzo de 2015

Fdo: José María Navarro Marí

Fdo: José Gutiérrez Fernández



El doctorando **Yannick Hoyos Mallecot** y los directores de la Tesis **Dr. José María Navarro Marí** y **Dr. José Gutiérrez Fernández**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de Marzo de 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado durante la realización de esta Tesis.

A todos/as mil gracias, de corazón.

# ÍNDICE

---



## ÍNDICE GENERAL

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>16</b> |
| <i>Carbapenemes y carbapenemasas</i>                       | 17        |
| Definición   | 17        |
| Clasificación  | 19        |
| Carbapenemasas de clase A                                  | 21        |
| Carbapenemasas de clase B                                  | 23        |
| Carbapenemasas de clase D                                  | 26        |
| Plataformas genéticas de las carbapenemasas                | 28        |
| Elementos móviles  | 28        |
| Entorno genético de las carbapenemasas                     | 30        |
| Carbapenemasas en enterobacterias                          | 32        |
| Epidemiología  | 32        |
| Detección  | 36        |
| Carbapenemasas en <i>Pseudomonas</i>                       | 45        |
| Epidemiología  | 46        |
| Detección  | 48        |
| Tratamiento  | 51        |
| <i>La espectrometría de masas en microbiología clínica</i> | 53        |
| Espectrometría de masas MALDI-TOF                          | 55        |
| Fundamento   | 55        |
| Concepto TOF y descripción de MALDI-TOF                    | 56        |
| Matriz   | 57        |
| El espectro  | 58        |
| Sistemas y bases de datos disponibles                      | 59        |

|  |           |
|--|-----------|
| Aplicaciones en microbiología clínica  | 61        |
| <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>   | <b>63</b> |
| General  | 67        |
| Específicos  | 67        |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>68</b> |
| <i>Ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF</i>   | 69        |
| Listado de cepas   | 69        |
| Protocolo de trabajo   | 69        |
| Obtención y análisis de los espectros  | 70        |
| <i>Validación prospectiva y estudio de incidencia</i>  | 72        |
| Material biológico   | 72        |
| Detección fenotípica de carbapenemasas   | 74        |
| Ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF  | 76        |
| Confirmación molecular de carbapenemasas   | 76        |
| <i>Identificación bacteriana de hemocultivos positivos mediante lisis centrifugación y MALDI-TOF</i> | 80        |
| <i>Identificación de carbapenemasas directamente del hemocultivo</i>                                 | 82        |
| Cepas  | 82        |
| Simulación de los hemocultivos   | 83        |
| Procesamiento de los hemocultivos positivos  | 83        |
| Obtención de los espectros   | 84        |
| Análisis de los espectros  | 84        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESULTADOS</b>  | <b>86</b> |
| <i>Ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF (Ver anexo 1)</i>   | 87        |
| <i>Identificación bacteriana de hemocultivos positivos mediante lisis centrifugación y MALDI-TOF (Ver anexo 2)</i> | 87        |
| <i>Identificación de carbapenemasas directamente del hemocultivo (Ver anexo 3)</i>                                 | 87        |
| <i>Validación prospectiva y estudio de incidencia</i>  | 87        |
| Descripción de las cepas   | 87        |
| Descripción según servicio asistencial   | 88        |
| Descripción según tipo de muestra  | 89        |
| Descripción según especies   | 90        |
| Resultados MALDI-TOF MS / CDDST / PCR  | 91        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 91        |
| Enterobacterias  | 92        |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>96</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>99</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>ANEXO 1: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA</b> | <b>108</b> |
|--|------------|

Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. Lett Appl Microbiol. 2014 Apr;58(4):325-9. doi: 10.1111/lam.12203

**ANEXO 2: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA****114**

Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ramirez MD, Navarro-Marí JM. [Bacterial identification from blood cultures by a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry technique]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Mar;31(3):152-5. doi: 10.1016/j.eimc.2012.09.003

**ANEXO 3: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA****119**

Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Gutiérrez-Fernández J, Navarro-Marí JM. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*. 2014 Oct;105:98-101. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.016

**ANEXO 4: RESUMEN (FRANCÉS)****124****ANEXO 5: CONCLUSIONES (FRANCÉS)****132**

## ÍNDICE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <i>Figura 1 Test de Hodge modificado</i>   | 40 |
| <i>Figura 2 Diferentes tipos de sinergia mediante DDST</i>   | 42 |
| <i>Figura 3 CDDST en una cepa productora de metalo-<math>\beta</math>-lactamasas</i>   | 42 |
| <i>Figura 4 Relación entre el tiempo transcurrido desde el inicio de un tratamiento adecuado y la tasa de supervivencia en caso de shock séptico</i>   | 52 |
| <i>Figura 5 Esquema general del funcionamiento de un espectrómetro de masas MALDI-TOF</i>  | 58 |
| <i>Figura 6 ECDC. EARSS annual report from the European Surveillance System 2005 y 2012. Proporción de Klebsiella pneumoniae aislados de muestras invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación</i> | 65 |
| <i>Figura 7 Incorporación de una molécula de H<sub>2</sub>O tras la hidrólisis del anillo <math>\beta</math>-lactámico por parte de la enzima y su monitorización mediante MALDI-TOF MS</i>                        | 66 |
| <i>Figura 8 Espectro del ensayo de hidrólisis</i>  | 71 |
| <i>Figura 9 Algoritmo de interpretación de la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST)</i>   | 75 |
| <i>Figura 10 Gel con marcador de peso molecular</i>  | 79 |
| <i>Figura 11 Procedimiento esquematizado de MALDI-TOF MS directo de hemocultivo</i>  | 81 |
| <i>Figura 12 Esquema de procesamiento mediante MALDI-TOF MS de los hemocultivos positivos</i>  | 85 |
| <i>Figura 13 Numero de aislados de Pseudomonas aeruginosa por servicio</i>   | 88 |
| <i>Figura 14 Numero de aislados de enterobacterias por servicio</i>  | 88 |
| <i>Figura 15 Numero de aislados de Pseudomonas aeruginosa por tipo de muestra</i>  | 89 |
| <i>Figura 16 Numero de aislados de enterobacterias por tipo de muestra</i>   | 89 |
| <i>Figura 17 Numero de cepas distribuido por especies</i>  | 90 |
| <i>Figura 18 Porcentaje de cepas productoras y no productoras de carbapenemasas</i>  | 90 |

## ÍNDICE TABLAS

---

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tabla 1 Clasificación de las <math>\beta</math>-lactamasas.....</i>   | <i>20</i> |
| <i>Tabla 2 Preparación de los discos con sus respectivos inhibidores e incremento de halos necesarios para considerar una sinergia .....</i>                                   | <i>75</i> |
| <i>Tabla 3 Primers y tamaño de los amplicones.....</i>   | <i>76</i> |
| <i>Tabla 4 Master mix para PCR multiplex.....</i>  | <i>77</i> |
| <i>Tabla 5 Condiciones de la PCR multiplex para genes IMP y OXA-48.....</i>  | <i>77</i> |
| <i>Tabla 6 Condiciones de la PCR multiplex para genes VIM y KPC.....</i>   | <i>78</i> |
| <i>Tabla 7 Comparación de resultados obtenidos en Pseudomonas aeruginosa con la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST) y la técnica de referencia (PCR).....</i> | <i>91</i> |
| <i>Tabla 8 Comparación de resultados obtenidos en enterobacterias con la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST) y la técnica de referencia (PCR).....</i>        | <i>93</i> |
| <i>Tabla 9 Resultado de las diferentes técnicas de detección de carbapenemasas en Pseudomonas aeruginosa .....</i>   | <i>94</i> |
| <i>Tabla 10 Resultado de las diferentes técnicas de detección de carbapenemasas en enterobacterias.....</i>  | <i>95</i> |

# ABREVIATURAS

---

|              |   |
|--------------|---|
| ADP          | Ácido dipicolínico  |
| APB          | Ácido fenilborónico   |
| ARI          | <i>Acinetobacter</i> resistant to imipenem  |
| ATCC         | American Type Culture Collection  |
| BLEE         | $\beta$ -lactamasa de espectro extendido  |
| CDDST        | Combined Double Disc Synergy Test   |
| CLSI         | Clinical and Laboratory Standards Institute   |
| CMI          | Concentración mínima inhibitoria  |
| DDST         | Double Disc Synergy Test  |
| DHB          | Ácido 2,5 dihydroxibenzoico   |
| EARSS        | European Antimicrobial Resistance Surveillance Network  |
| ECDC         | European Centre for Disease Prevention and Control  |
| EDTA         | Ácido etilendiaminotetraacético   |
| EUCAST       | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing                                      |
| GES          | Guyana extended spectrum  |
| GIM          | German imipenemase  |
| HCCA         | Ácido $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamico  |
| IMI          | Imipenem-hydrolyzing $\beta$ -lactamase   |
| KPC          | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase  |
| MALDI-TOF MS | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight<br>Mass Spectrometry                 |
| MBL          | Metallo- $\beta$ -lactamasa   |
| MPM          | Marcador de Peso Molecular  |
| NDM          | New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase   |
| NMC          | Not metalloenzyme carbapenemase   |
| OXA          | Oxacillin-hydrolyzing   |
| PCR          | Reacción en Cadena de la Polimerasa   |
| PVRA-CNM     | Programa de Vigilancia de la Resistencia a Antibióticos del<br>Centro Nacional de Microbiología |
| SDS          | Dodecilsulfato sódico   |
| SIM          | Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase   |
| SIM          | Seoul imipenemase   |
| SME          | <i>Serratia marcescens</i> enzymes  |
| VIM          | Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase   |





# INTRODUCCIÓN

---

# Carbapenemes y carbapenemasas

## Definición

Los carbapenemes son un tipo de antibióticos de la familia de los  $\beta$ -lactámicos inspirados en un compuesto natural producido por *Streptomyces cattleya*: la tienamicina (Kahan et al. 1979) y se caracterizan por ser los de más amplio espectro. Las moléculas de esta familia actualmente comercializadas en España son imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem. Su uso está restringido al ámbito hospitalario ya que se usan para tratar las infecciones nosocomiales por bacterias multiresistentes.

Las carbapenemasas son un tipo de  $\beta$ -lactamasas. Varias de estas enzimas hidrolizan carbapenemes de manera muy eficiente, mientras que otras lo hacen con menos éxito; algunas incluyen cefalosporinas de amplio espectro en su perfil hidrolítico y otras no; ciertas pueden inhibirse (al menos parcialmente) por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (tales como ácido clavulánico y tazobactam), mientras que la mayoría no son inhibidas por inhibidores clínicamente disponibles (tabla 1).

*Streptomyces cattleya*, es una bacteria que se encuentra fundamentalmente en el suelo por lo que no es de extrañar que las enzimas capaces de degradar este tipo

de  $\beta$ -lactámicos fueran producidas a modo de defensa por organismos de tipo ambiental como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Este tipo de  $\beta$ -lactamasas tenía poca relevancia ya que eran especie-específicas y tenían una codificación cromosómica, pero a principios de los 90 la aparición de la primera carbapenemasa plasmídica (Watanabe et al. 1991) supuso un cambio en la percepción del problema, tanto es así que a día de hoy, suponen una alarma de salud pública.

## Clasificación

Las  $\beta$ -lactamasas pueden clasificarse según sus propiedades funcionales o según sus propiedades moleculares. En los primeros trabajos con  $\beta$ -lactamasas (cuando no existía posibilidad de secuenciación), una nueva enzima se analizaba bioquímicamente mediante la determinación de su punto isoeléctrico y posteriores ensayos de hidrólisis y inhibición. Estas tasas de hidrólisis de los diferentes  $\beta$ -lactámicos y sus perfiles de inhibición permitían una clasificación de tipo funcional cuyo esquema más aceptado fue propuesto por Bush (Bush et al. 1995) y se dividía en 4 grupos (tabla. 1).

La clasificación basada en la homología de las secuencias de aminoácidos propuesta por Ambler (Ambler 1980), se correlaciona bien con la clasificación funcional pero le falta la información de la actividad enzimática. Esta clasificación se divide en 4 clases (A, B, C, D) y a pesar de sus carencias es la más utilizada.

Tabla 1 Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas<sup>1</sup>

| Bush-Jacoby-Medeiros group | 1989 Bush group (44) | Richmond-Sykes class (253)         | Mitsuhashi-Inoue type (194) | Molecular class (2, 121, 132) | Preferred substrates   | Inhibited by: |      | Representative enzymes   |
|----------------------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--|---------------|------|--|
|                            |                      |                                    |                             |                               |  | CA            | EDTA |  |
| 1                          | 1                    | Ia, Ib, Id                         | CSase                       | C                             | Cephalosporins   | -             | -    | AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1                                |
| 2a                         | 2a                   | Not included                       | PCase V                     | A                             | Penicillins  | +             | -    | Penicillinases from gram-positive bacteria                                     |
| 2b                         | 2b                   | III                                | PCase I                     | A                             | Penicillins, cephalosporins  | +             | -    | TEM-1, TEM-2, SHV-1  |
| 2be                        | 2b'                  | Not included except K1 in class IV | CXase                       | A                             | Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams | +             | -    | TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1                  |
| 2br                        | Not included         | Not included                       | Not included                | A                             | Penicillins  | ±             | -    | TEM-30 to TEM-36, TRC-1  |
| 2c                         | 2c                   | II, V                              | PCase IV                    | A                             | Penicillins, carbimicillin   | +             | -    | PSE-1, PSE-3, PSE-4  |
| 2d                         | 2d                   | V                                  | PCase II, PCase III         | D                             | Penicillins, cloxacillin   | ±             | -    | OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)  |
| 2e                         | 2e                   | Ic                                 | CXase                       | A                             | Cephalosporins   | +             | -    | Inducible cephalosporinases from <i>Proteus vulgaris</i>                       |
| 2f                         | Not included         | Not included                       | Not included                | A                             | Penicillins, cephalosporins, carbapenems                                       | +             | -    | NMC-A from <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 from <i>Serratia marcescens</i> |
| 3                          | 3                    | Not included                       | Not included                | B                             | Most $\beta$ -lactams, including carbapenems                                   | -             | +    | L1 from <i>Xanthomonas maltophila</i> , CcrA from <i>Bacteroides fragilis</i>  |
| 4                          | 4                    | Not included                       | Not included                | ND                            | Penicillins  | -             | ?    | Penicillinase from <i>Pseudomonas cepacia</i>                                  |

<sup>1</sup> Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun 1;39(6):1211-33.

### Carbapenemasas de clase A

Dentro de las carbapenemasas de clase A encontramos cuatro grandes grupos de enzimas: NMC/IMI, SME, GES y KPC. Para su actividad hidrolítica requieren un sitio activo con serina en la posición 70 de la numeración de Ambler de las  $\beta$ -lactamasas de clase A (Ambler et al. 1991). Todas son capaces de hidrolizar una gran variedad de  $\beta$ -lactamasas (carbapenemes, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam) y todas son inhibidas por clavulánico y tazobactam lo que las sitúa en el subgrupo funcional 2f de la clasificación de Bush (Bush et al. 1995).

#### ❖ SME, IMI y NMC

Su característica común es que son todas de codificación cromosómica y por lo tanto son especie-específicas, además presentan un perfil hidrolítico común, siendo resistentes a carbapenemes, cefalosporinas de primera generación, aztreonam y penicilinas pero sensibles a cefalosporinas de amplio espectro.

- SME (“*Serratia marcescens* enzyme”) fue descubierta por primera vez en Inglaterra en dos aislados de *Serratia marcescens* en 1982 (Yang et al. 1990).
  
- IMI (“imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase”) fue descubierta por primera vez en 1984 en California en dos aislados de *Enterobacter cloacae* obtenidos de dos pacientes diferentes (Rasmussen et al. 1996). Sin embargo más

recientemente se ha encontrado otra variante (IMI-2) que presenta una localización plásmidica (Yu et al. 2006).

- NMC (“not metalloenzyme carbapenemase”) fue descubierta por primera vez en un aislado de *Enterobacter cloacae* en 1993 en Paris (Nordmann et al. 1993).

#### ❖ KPC y GES

- KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”) dos características diferencian a estas enzimas del resto de enzimas del subgrupo 2f. La primera es que están localizadas en plásmidos transferibles y la segunda es que su espectro de acción incluye cefalosporinas del grupo de los aminotiazoles como cefotaxima. Fue descrita por primera vez en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada en California del norte en 1996 (Yigit et al. 2001) y aunque suele presentarse en *Klebsiella pneumoniae* también se ha encontrado en otras especies como *Enterobacter sp.* o *Salmonella sp.*
- GES (“Guiana extended spectrum”) fue descubierta en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* aislada en la Guayana Francesa en 1998 (Poirel et al. 2000). Debido a su limitado espectro de acción que incluya penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido fueron clasificadas como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE’s) pero, en 2001, con la aparición de una variante GES-2 en *Pseudomonas aeruginosa* su espectro se vio ampliado a imipenem (Poirel et al. 2001). Aunque los genes que codifican

para esta enzima están localizados en integrones no han tenido la misma expansión que otras enzimas también localizadas en elementos móviles.

### Carbapenemasas de clase B

Esta clase de  $\beta$ -lactamasas conforman el grupo 3 de la clasificación de Bush y se caracterizan por su habilidad para hidrolizar carbapenemes incluso en presencia de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de uso clínico pero si que se ven inhibidas por compuestos quelantes de metales. Su espectro de acción es bastante amplio e incluye carbapenemes, cefalosporinas y penicilinas pero no aztreonam. Este mecanismo de acción es dependiente de una interacción  $\beta$ -lactámico /  $Zn^{2+}$  en el sitio de acción de la enzima, es por eso que agentes quelantes de  $Zn^{2+}$  como el Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inhiben su actividad.

### Clase B cromosómicas

Las primeras enzimas estudiadas de este tipo tenían una codificación cromosómica y estaban presentes tanto en cepas ambientales como en patógenos oportunistas (*Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* o *Stenotrophomonas maltophilia*) por lo que su presencia se correlaciona con la prevalencia de las cepas que las producen y por lo tanto, al ser en su gran mayoría patógenos oportunistas, no suelen asociarse con infecciones nosocomiales a excepción de *Stenotrophomonas maltophilia*.



## Clase B móviles

Sin embargo si que reviste gran importancia la expansión que han sufrido ciertas enzimas de esta familia (IMP, VIM, NDM, SPM, GIM y SIM). Estas suelen estar localizadas en integrones que cuando estos se ven asociados a plásmidos o transposones hacen que la transferencia entre bacterias de estos genes de resistencia sea posible

### ❖ IMP, VIM y NDM

- IMP ( por su actividad sobre imipenem) fue descrita por primera vez en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en Japón en 1990 (Watanabe et al. 1991), y posteriormente se encontró también en integrones de *Serratia marcescens* y otras enterobacterias. Desde entonces la familia IMP ha ido creciendo y ya existen hasta 51 variantes([www.lahey.org/Studies/other.asp](http://www.lahey.org/Studies/other.asp)) y todas ellas distribuidas por el mundo entero.
- VIM (“Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase”) es otra familia relevante. Reciben ese nombre porque la primera se describió en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en Verona en 1997(Lauretti et al. 1999) y desde entonces, esta familia cuenta con 46 miembros ([www.lahey.org/Studies/other.asp](http://www.lahey.org/Studies/other.asp)) la mayoría presente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

- NDM (“New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase”) siguiendo con las familias de metalo- $\beta$ -lactamasas más relevantes, no podemos olvidarnos de esta enzima aislada en 2009 en un paciente que residía en Suecia pero con orígenes en la india que importó esta cepa después de una infección de orina en uno de sus viajes a nueva Delhi. Esta cepa era una *Klebsiella pneumoniae* y era resistente a todos los antibióticos testados excepto colistina (Rolain et al. 2010). Este gen de resistencia está localizado en un plásmido de gran tamaño (180 kb) que se transmite con gran facilidad y que además lleva asociado otros genes de resistencia.

#### ❖ SPM, GIM y SIM

Por otra parte, tenemos el resto de familias que integran las carbapenemasas de clase B: SIM (“Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase”) descrita por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* (Toleman et al. 2002); GIM (“German imipenemase”) aislada en Alemania en 2002 (Castanheira et al. 2004) y SIM (“Seoul imipenemase”) aislada en una cepa de *Acinetobacter baumannii* en 2005 (Lee et al. 2005). Todas estas enzimas no se han expandido más allá de su país de origen, por lo cual su relevancia a nivel epidemiológico es menor.

### Carbapenemasas de clase D

También conocidas por el nombre de  $\beta$ -lactamasas de tipo OXA (“oxacillin-hydrolyzing”), estas enzimas fueron las más prevalentes en la época de los 80. Al principio estaban agrupadas dentro de las enzimas de clase A pero, debido a su gran variabilidad en las secuencias de amino ácidos, fueron categorizadas como otra clase aparte. Se caracterizan por una inhibición por clavulánico muy variable y una tasa de hidrolisis de los carbapenemes también muy variable.

La primera  $\beta$ -lactamasa de tipo OXA con actividad frente a carbapenemes no fue descrita hasta 1993 pero pertenecía a una cepa de *Acinetobacter baumannii* aislada en 1985 en un paciente de Edimburgo (Paton et al. 1993) y fue inicialmente denominada como ARI-1 (“*Acinetobacter* resistant to imipenem”) pero posteriormente fue renombrada a OXA-23

La gran mayoría de carbapenemasas tipo OXA han sido descritas en *Acinetobacter Baumannii* y ya por 1998 estaban diseminadas por todo el mundo. A día de hoy se conocen 102 secuencias diferentes de esta enzima y se agrupan en 9 grandes familias en función de sus secuencias de amino ácidos. Así pues hablamos de enzimas de la familia de las OXA-23; OXA-24; OXA-40; OXA-51; OXA-58; OXA-55; OXA-48; OXA-50; OXA-60; OXA-62... Especial mención merecen las cepas de *Acinetobacter Baumannii* productoras de OXA-23 y OXA-58 que causaron numerosas infecciones en militares durante la Guerra de Iraq y

Afganistán entre 2003 y 2005(Hujer et al. 2006). Por otra parte una de las familias más relevantes de esta clase D son las OXA-48-like (OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247, etc.) descritas por primera vez en una cepa de *Shewanella algae* (Poirel et al. 2004a) pero con una codificación cromosómica. Al poco tiempo en 2005 se encontró una cepa de *Klebsiella pneumoniae* con esta enzima pero con codificación plásmidica(Poirel et al. 2004b) en Turquía, desde entonces se han descrito muchas cepas productoras de OXA-48 en Turquía la gran mayoría en el contexto de brotes nosocomiales. Este tipo de cepas empezó a expandirse por la cuenca mediterránea(Poirel et al. 2012), afectando sobre todo a países del norte de África como Marruecos o Túnez pero, a día de hoy, son una realidad en muchos países europeos, en concreto España donde desde la descripción del primer brote (Pitart et al. 2011a) se han ido sucediendo uno tras otro en diferentes regiones.

## Plataformas genéticas de las carbapenemasas

Como ya hemos mencionado antes, los genes que codifican carbapenemasas se dividen en dos grupos: los que tienen una codificación cromosómica y los que están codificadas sobre elementos móviles, estos últimos son los más interesantes ya que son la base de la diseminación de determinantes de resistencia.

### Elementos móviles

#### ❖ PLÁSMIDOS

ADN de doble cadena, circular, de localización citoplasmática dotado de replicación autónoma y con un tamaño variable. Son mediadores de diferentes factores que proporcionan la clásica capacidad de adaptación de las bacterias, aunque no es esencial para el metabolismo normal de la célula huésped. Su transmisión natural de una célula a otra se logra generalmente mediante conjugación, aunque otros modos de transferencia como la transducción o la transformación son posibles, pero a menudo con indiferencia del hospedador, lo que lleva a la difusión entre las diferentes especies bacterianas.

#### ❖ TRANSPOSONES

Secuencias de ADN capaces de cambiar de ubicación en el genoma sin aparecer nunca en estado libre. No pueden replicarse, pero codifican los determinantes

necesarios para la transposición y otras funciones como la resistencia a los antibióticos. El resultado de esta transposición es la suma de genes en el seno del genoma bacteriano (ya sea cromosómico o plasmídico)

#### ❖ INTEGRONES

Los integrones constituyen un sistema de captura y expresión de genes en forma de casete, incapaces de auto replicarse, los integrones están siempre vehiculizados. La estructura mínima de un integron incluye un gen (*intI*) que codifica para una integrasa, un sitio adyacente de recombinación (*attI*) y al menos un promotor (P) orientado para la expresión de los genes capturados.

#### ❖ GENES CASETE

La estructura de un gen en casete está compuesta por dos componentes funcionales: una secuencia codificante, generalmente carente de promotor propio y una región de recombinación (*attC*) que es reconocida por las integrasas de los integrones.

## Entorno genético de las carbapenemasas

### ❖ CLASE A

Dentro de las enzimas de clase A descritas, GES y KPC están codificadas por genes localizados en elementos móviles y de las dos, KPC es la que reviste mayor importancia. Poco tiempo después de la descripción de la primera cepa productora de KPC, se encontró una nueva variante (KPC-2) que difiere en un solo aminoácido y, a día de hoy, es la variante más común. Esto podría estar ligado a la diseminación de un clon (ST-258) de *Klebsiella pneumoniae* productor de KPC-2 a nivel mundial (Nordmann et al. 2011) aunque recientemente se ha propuesto que el gen KPC-2 está asociado a un único tipo de transposón: Tn4401 (Nordmann et al. 2009), el cual se ha encontrado en un plásmido de *Pseudomonas aeruginosa* (pCOL-1) lo que podría sugerir una capacidad de este transposón para ser transferido entre diferentes familias de bacilos gram negativos.

### ❖ CLASE D

En el caso de las enzimas de clase D, con actividad sobre los carbapenemes, la familia que más relevancia tiene es la de las OXA-48 like y se caracterizan por que sus genes están asociados a una secuencia de inserción (IS1999) localizada en los extremos del transposón Tn1999, el cual a su vez está incluido dentro de un plásmido.

### ❖ CLASE B

Para las enzimas de clase B, la más relevante dentro del género *Pseudomonas*, los genes suelen estar localizados en Integrones de clase 1 que pertenecen al grupo de los integrones integrados en elementos móviles y siempre vehiculizados por plásmidos. Se caracterizan por presentar un gen (*intI1*) que codifica para una integrasa y un gen (*tnpA*) que codifica para una transposasa ambos localizados en el extremo 5' del integron. Además este tipo de integrones suelen albergar también genes que codifican otros determinantes de resistencia como *aacA4*, *aadA1*, y/o *aadB* para los aminoglucósidos;  $\beta$ -lactamasas de clase D (OXA) o *catB* que confiere resistencia al cloranfenicol.



## Carbapenemasas en enterobacterias

Desde la primera descripción de una carbapenemasa en una *Enterobacteria*, (Yang et al. 1990) en 1990 hemos visto una rápida diseminación de estos genes dentro de esta familia a lo largo de estos últimos 25 años, sobre todo las de tipo KPC, VIM, NDM y OXA . Tanto es así que, si realizamos una búsqueda en la base de datos de Pubmed con los parámetros (gen carbapenemase) and (*Enterobacteriaceae*), encontramos 487 publicaciones para los genes KPC, seguido de 220 para los genes OXA, 191 para los genes NDM, 156 para los genes VIM y 110 para los genes IMP.

### Epidemiología

#### ❖ EXTRANJERO

En noviembre de 2010, a raíz de una conferencia sobre *Enterobacterias* resistentes a los carbapenemes, se publicó un extenso resumen que recogía la situación a nivel europeo (Grundmann et al. 2010). Para ello los países fueron catalogados de la siguiente manera según su situación epidemiológica :

- Situación endémica: Grecia e Israel
- Diseminación inter-regional: Italia y Polonia
- Epidemias regionales: Francia, Alemania y Hungría

- Epidemias esporádicas en varios hospitales: Chipre, Holanda, Noruega, Escocia y Suecia
- Epidemias en un único hospital: Bélgica, España, Inglaterra y Irlanda

Pero este mapa se vio alterado en cuestión de 2 años y en enero de 2012 presentaba un aspecto totalmente diferente(Cantón et al. 2012):

- Situación endémica: Grecia, Israel e Italia
- Diseminación inter-regional: Turquía, Francia y Polonia
- Epidemias regionales: Alemania, Bélgica, Inglaterra y Escocia,
- Epidemias esporádicas en varios hospitales: España y Holanda
- Epidemias en un único hospital: Suecia, Noruega y Hungría

Sin embargo, hay que matizar estos datos ya que la mayoría de estos datos son el fruto de estudios llevados a cabo en el contexto de epidemias localizadas y muchas veces sólo contemplan cepas no sensibles según los puntos de corte clínicos y no tienen en cuenta ciertas cepas que a pesar de producir carbapenemasas, se mantienen sensibles a los carbapenemes. Por otra parte, no se dispone de datos de todos los países, ya que algunos países no disponen de normas nacionales para la declaración de microorganismos multiresistentes y de los que se dispone, no todos utilizan los mismos criterios. Si a esto le sumamos que ciertos países como Francia y Reino unido tiene una política muy activa para

la búsqueda de este tipo de microorganismos y que a pesar de eso declaran menos

casos que ciertos países donde no existe esta cultura de “search and destroy” hace que, probablemente, este problema este infra-dimensionado.

#### ❖ ESPAÑA

Las primeras cepas productoras de carbapenemasas de las que se tiene constancia en España fueron *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* ambas productoras de VIM-1 albergada en un casete dentro de un integron de clase 1 que a su vez estaba localizado en un plásmido transferible(Tórtola et al. 2005). En los años siguientes, se describieron algunos casos aislados de cepas productoras de VIM y IMP, sin embargo últimamente hemos visto un incremento tanto del tipo de carbapenemasas como del número de hospitales donde se han aislado estos microorganismos.

En ese sentido, dos casos marcaron un antes y un después dentro de nuestra epidemiología local. Por un lado la aparición en 2010 de la primera cepa productora de KPC(Curiao et al. 2010), que aunque se mantiene en una prevalencia globalmente baja ha causado varios brotes en diferentes hospitales en concreto en la comunidad autónoma de Andalucía con un total de 83 aislados descritos a fecha 6/6/2014 (dato proporcionado por el Laboratorio de referencia

para tipado molecular de patógenos nosocomiales y detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos de interés sanitario de Andalucía Hospital Virgen Macarena)

El otro caso es la aparición del primer brote de *Klebsiella pneumoniae* productor de OXA-48 en 2009 (Pitart et al. 2011b). Desde entonces se han ido sucediendo los brotes en diferentes áreas geográficas y según datos del Programa de Vigilancia de la Resistencia a Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología (PVRA-CNM) se ha pasado de ningún caso registrado en el año 2010, a 163 casos en 2012.

Si a esto le sumamos la aparición de la primera cepa productora de NDM-1 (Solé et al. 2011) relacionada con una estancia previa en la India, no es de extrañar que en 2009, el PVRA-CNM recibiera cepas procedentes de 6 hospitales, mientras que en 2012 las recibió de 30 (Oteo et al. 2013). Durante ese año el PVRA-CNM detectó las siguientes carbapenemasas: 163 OXA-48 like (84 OXA-48 y 79 OXA-245), 60 VIM-1, 8 KPC-2, 5 IMP like (2 IMP-22 and 3 IMP-8), y una NDM-1. Estos 30 hospitales estaban localizados en 14 áreas geográficas distintas y de ellos 6 presentaron más de 10 aislados mientras que los 24 restantes tuvieron entre 1 y 9 casos.

Paralelamente al incremento de enterobacterias productoras de carbapenemasas en el medio hospitalario, se está produciendo un aumento de su detección en

pacientes extra hospitalarios, lo que aumenta el riesgo de una rápida diseminación en la comunidad realizándose así un paralelismo con la diseminación sufrida con las cepas productoras de BLEE's.

### Detección

#### **Cribado**

Para la detección de cepas productoras de carbapenemasas un cribado basándose en una sensibilidad reducida a los carbapenemes es fundamental. Sin embargo, algunas cepas productoras de carbapenemasas pueden presentar una concentración mínima inhibitoria (CMI) inferior al punto de corte clínico propuesto por las diferentes sociedades de estudios de sensibilidad. En esa línea hay estudios (Miriagou et al. 2010) que abogan por estudiar las cepas que presenten una mínima reducción de sensibilidad a los carbapenemes a pesar de la pérdida de especificidad que esto supone. Tal es la polémica al respecto que el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) se ha visto obligado a publicar un documento consenso para unificar criterios para la búsqueda de estos microorganismos.

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)

En este documento se proponen puntos de corte para el cribado con los diferentes carbapenemes (meropenem, imipenem y ertapenem) y además, se decantan por el uso de meropenem como mejor indicador basándose en su mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad, si bien, en áreas con una fuerte prevalencia de OXA-48, recomiendan el uso de temocilina como indicador ya que con los puntos de corte propuestos para el meropenem se podrían escapar bastantes cepas (Huang et al. 2014).

La búsqueda de estas bacterias no debería limitarse a los pacientes con infecciones, sino que también debería de hacerse a los pacientes colonizados por estas bacterias ya que son la fuente más importante de transmisión dentro de los hospitales. La realidad es que pocos centros realizan una búsqueda activa de portadores debido a la complejidad a nivel organizativo de estos procedimientos. Para ello, la muestra idónea serían los exudados rectales y las recomendaciones consisten en estudiar a todos los pacientes sospechosos de poder albergar estas bacterias (pacientes procedentes de un país o de otro hospital con una alta prevalencia de carbapenemasas, pacientes de las unidades de cuidados intensivos o pacientes trasplantados o inmunodeprimidos). Estos pacientes deberían de estar aislados hasta la obtención de un resultado negativo (24-48h).

El medio de cultivo ideal sería un medio capaz de detectar todas las carbapenemasas con una especificidad suficiente como para poder responder rápidamente a la pregunta de si el paciente está colonizado o no, para así poder

reducir el tiempo de aislamiento y los problemas que eso supone. Evidentemente, no existe el medio ideal ya que estos se basan en el uso de concentraciones de diferentes antibióticos a los que, teóricamente, las cepas productoras de carbapenemasas deberían de ser resistentes pero, debido a las grandes variabilidades en los perfiles hidrolíticos que presentan estos microorganismos a base de aumentar la especificidad se pierde generalmente mucha sensibilidad. Este es el caso de las cepas productoras de OXA-48 que, al presentar un tasa de hidrólisis baja para los carbapenemes no suelen detectarse en la gran mayoría de los medios comercializados utilizados para el cribado de carbapenemasas. Desde hace poco tiempo un nuevo medio de cribado ha sido diseñado por Nordmann y colaboradores: el medio “SUPERCARBA” todavía no comercializado pero con una muy buena sensibilidad también para la detección de OXA-48 (Girlich et al. 2013).

### **Tests de detección fenotípicos**

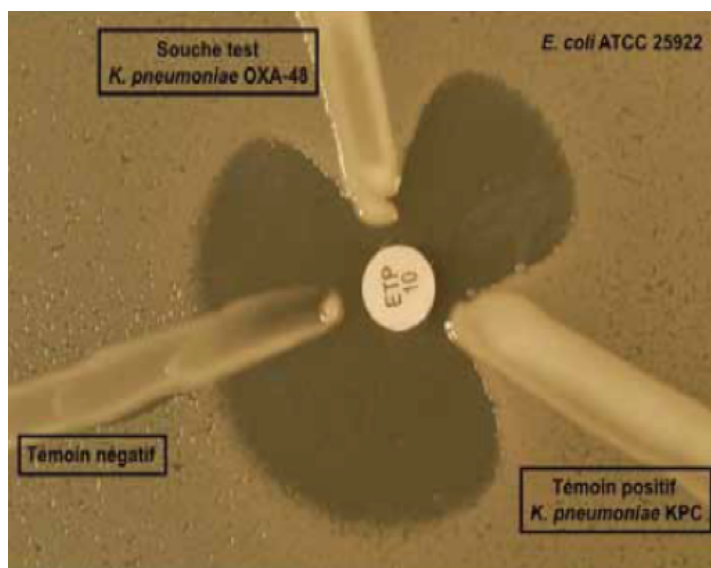
Este tipo de test busca mediante una metodología simple una detección lo suficientemente específica como para poder asegurar la presencia de una carbapenemasa, si bien todo resultado debe de ser confirmado siempre por técnicas moleculares. Dos tipos de test han sido los más utilizados hasta la fecha: el test de Hodge modificado y la detección basada en las inhibiciones por ciertos compuestos de las diferentes clases de enzimas.

❖ TEST DE HODGE MODIFICADO (Lee et al. 2001)

Este ensayo se basa en la sensibilidad a un determinado carbapenem que muestra la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, que se siembra en césped en una placa de Müller-Hinton, y cuyo halo de inhibición alrededor del disco se ve disminuido en presencia de una estría de una cepa productora de carbapenemasa. La carbapenemasa es producida y secretada al medio extracelular, permitiendo el crecimiento, en las proximidades de la estría, de la cepa sensible de *Escherichia coli*, lo que da lugar a la deformación del halo. Si bien este test es simple y barato, tiene una alta tasa de falsos positivos (cepas productoras de BLEE's junto con pérdida de porinas) y falsos negativos (sobre todo NDM) (Doyle et al. 2012). Además este test requiere por lo menos 24h de incubación y no diferencia el tipo de carbapenemasa, por lo que parece obvio que este test no debería de seguir usándose. Sin embargo es el método propuesto por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para detectar una posible carbapenemasa.



**Figura 1 Test de Hodge modificado**



#### ❖ MÉTODOS BASADOS EN LA INHIBICIÓN

Existen diferentes técnicas pero todas se basan en las diferentes propiedades de las enzimas. Los formatos más utilizados son el “Double Disc Synergy Test” (DDST) y el “Combined Double Disc Synergy Test” (CDDST).

El DDST usa un disco de un  $\beta$ -lactámico puesto cerca de un disco con una determinada carga de un inhibidor (EDTA, clavulánico/borónico, cloxacilina ...). La observación de algún tipo de sinergia (fig. 2) con las diferentes combinaciones permite suponer la presencia de un determinado tipo de enzima con bastante fiabilidad. Según el tipo de enzima se debe utilizar un determinado  $\beta$ -lactámico junto con un determinado inhibidor.

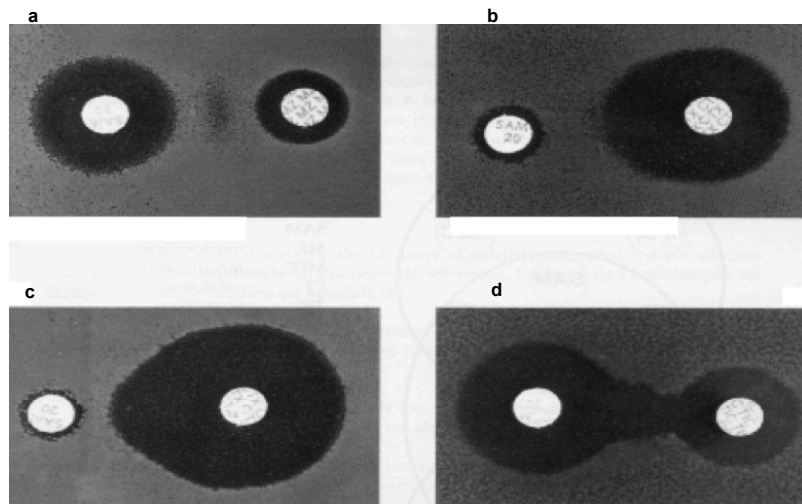
Así pues, para la detección de MBLs (metalo- $\beta$ -lactamasas) suele usarse ceftazidima o imipenem y EDTA o ADP (ácido dipicolínico) como inhibidor, presentando todos buenas sensibilidades y especificidades.

En el caso de las carbapenemasas de clase A, las recomendaciones son usar meropenem junto con APB (ácido fenilborónico), sin embargo, podrían aparecer problemas de especificidad con cepas resistentes a carbapenemes por hiperproducción de cefalosporinasas tipo AmpC junto con una pérdida de porinas ya que este tipo de enzima también se ve inhibida por el APB. Para evitar este problema, se propuso realizar en paralelo el mismo test pero utilizando en vez de APB, cloxacilina (inhibidor específico de cefalosporinasas) lo que permite deducir que, si se observa una sinergia en los dos casos estaríamos ante una hiperproducción de una cefalosporinasa. (Giske et al. 2011)

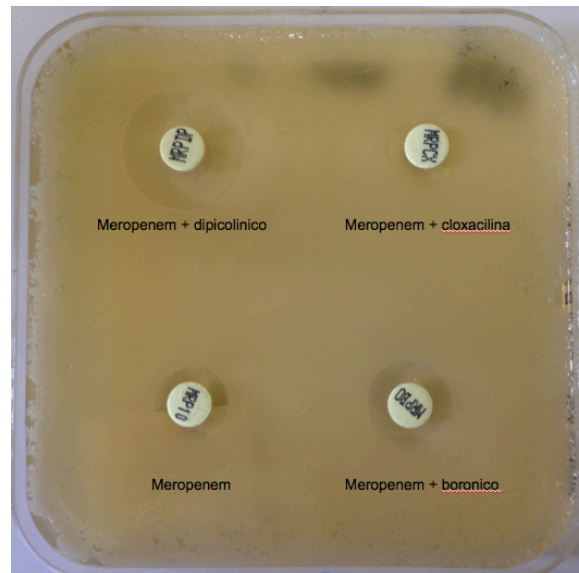
El CDDST en cambio se basa en comparar la diferencia de las zonas de inhibición entre un disco con el  $\beta$ -lactámico y los mismos discos potenciados con diferentes inhibidores (fig. 3).

Los dos formatos presentan buenas sensibilidades pero el más utilizado y el que recomienda el EUCAST es la técnica de CDDST debido a que la interpretación del DDST es a veces bastante subjetiva.

**Figura 2** Diferentes tipos de sinergia<sup>2</sup> mediante DDST



**Figura 3** CDDST en una cepa productora de metalo- $\beta$ -lactamasas



<sup>2</sup> a) sinergia en forma de bastón; b) sinergia con forma ovalada; c) sinergia con forma de globo; d) sinergia en embudo

### ❖ DETECCIÓN DIRECTA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

A diferencia de las técnicas moleculares, que sólo son capaces de detectar enzimas ya conocidas, este tipo de ensayo permite detectar nuevos tipos de enzimas, por lo que a pesar de no ser considerados la técnica de referencia deberían de estar presentes en cualquier laboratorio que quiera detectar este tipo de enzimas.

Tanto es así que la detección por espectrofotometría de la hidrólisis del imipenem se propuso en su día como técnica de referencia (Cornaglia et al. 2007). Esta técnica consiste en preparar un extracto bacteriano por sonicación al cual se le añade un buffer que contiene imipenem, la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico se determina mediante la modificación de la absorbancia del compuesto. Esta técnica que presenta una sensibilidad (Bernabeu et al. 2012) estupenda no es muy utilizada debido a la complejidad del ensayo.

Probablemente, la técnica más simple y barata, que a su vez presenta muy buenas sensibilidades y especificidades, es un test colorimétrico (CARBA NP) que se basa en un cambio de color de un indicador de pH (rojo fenol) al acidificarse el medio cuando se produce la hidrólisis del compuesto  $\beta$ -lactámico (Dortet et al. 2012). Este test también permite la clasificación preliminar de la clase de carbapenemasa mediante el uso de tazobactam y EDTA como inhibidores, sin embargo, este test podría presentar ciertas deficiencias en la

detección de cepas productoras de enzimas con baja actividad hidrolítica frente al imipenem como pueden ser las OXA-48 (Tijet et al. 2013).

### Biología molecular

Las técnicas de biología molecular siguen siendo a día de hoy la técnica de referencia para la identificación precisa de los genes responsables de la producción de carbapenemasas.

Las técnicas más utilizadas se basan en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y pueden ir seguidas de una secuenciación completa de la región codificante para poder identificar el tipo de variante.

A pesar del creciente interés por la detección de estos mecanismos de resistencia, estas PCRs suelen ser caseras ya que las PCRs que hay comercializadas aún presentan un coste muy elevado. Estas técnicas son muy rápidas, por lo que cuando se sospecha la presencia de una carbapenemasa, la manera más rápida de confirmarlo es mediante una PCR, si bien hay que tener en cuenta uno de los mayores defectos de esta técnica que es que sólo detecta genes ya conocidos por lo que genes todavía no descritos pasarían desapercibidos. En una revisión publicada por Bush y colaboradores, podemos encontrar una lista de primers publicados para la detección de todas las familias y subgrupos descritos hasta la fecha (Queenan and Bush 2007).

## **Carbapenemasas en *Pseudomonas***

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos más implicados en neumonías en pacientes inmunodeprimidos, de hecho, los pacientes neutropénicos y bajo ventilación mecánica presentan una tasas de mortalidad superior a 30 %.

*Pseudomonas aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca a la gran mayoría de  $\beta$ -lactámicos resultante de su elevada impermeabilidad y de la producción de una cefalosporinasa cromosómica, sin embargo es sensible a imipenem, meropenem y doripenem de ahí la importancia de conservar la actividad de estas moléculas.

La resistencia a carbapenemes suele ser la suma de varios mecanismos: impermeabilidad, bombas de expulsión,  $\beta$ -lactamasas (Strateva and Yordanov 2009). De estos mecanismos la modificación o pérdida de la porina D2 es el principal mecanismo de resistencia al imipenem.

A lo largo de los últimos 10 años *Pseudomonas aeruginosa* no ha sido una excepción respecto a la diseminación de las carbapenemasas. Principalmente se han descrito carbapenemasas de clase A y clase B.

## Epidemiología

### ❖ EXTRANJERO

Dentro de las carbapenemasas de clase A, dos tipos se han descrito en *Pseudomonas aeruginosa*: por un lado GES-2 y GES-5 que en realidad son BLEEs con actividad sobre los carbapenemes y que fueron descritas en Sudáfrica (Poirel et al. 2001; Labuschagne et al. 2008), ambas de codificación plásmidica en el seno de integrones. La otra familia de clase A descrita en *Pseudomonas aeruginosa* son las KPC, y en concreto KPC-2 en Colombia (Villegas et al. 2007) y KPC-5 en Puerto Rico (Wolter et al. 2009) y en ambos casos con una localización plásmidica.

Pero si algo es característico en *Pseudomonas aeruginosa* es su asociación con las carbapenemasas de clase B. La síntesis de estas enzimas suele aportar resistencias a imipenem, meropenem, o doripenem pero también a otros  $\beta$ -lactámicos como piperacilina, ceftazidima o cefepime pero no a aztreonam. En este grupo destacan las IMP y las VIM por ser las más extendidas, relacionándose la mayoría de las veces con brotes nosocomiales. Se han descrito por todo el mundo pero con mayor predominio en la región del sudeste asiático. Las VIM por su parte se detectaron por primera vez en Verona (Italia) por lo que no es de extrañar que sean las que más se detectan en Europa y concretamente la VIM-2 (Walsh et al. 2005). Este tipo de carbapenemasas son especialmente relevantes en el sur de Europa (Italia y Grecia).

Por último, las carbapenemasas de Clase D, cuya única enzima transferible detectada en *Pseudomonas aeruginosa* es OXA-40 (Sevillano et al. 2009) y desde luego con una acción bastante modesta sobre los carbapenemes, aunque siempre superior al efecto prácticamente nulo sobre las cefalosporinas de espectro extendido.

### ❖ ESPAÑA

Aunque la prevalencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasa en España es todavía bastante moderada comparada con la de otros países, su detección ha dejado ya de ser un hecho infrecuente. La primera detección de una carbapenemasa adquirida por *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro país (en concreto, VIM-2) se dio en una cepa perteneciente a un estudio retrospectivo en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a ceftazidima e imipenem procedentes del Hospital de Sant Pau de Barcelona (Prats et al. 2002). En 2007 se describió el primer brote epidémico (también por una cepa productora de VIM-2) en el Hospital de Bellvitge (Barcelona), que afectó a 34 pacientes en un período de aproximadamente 2 años (Peña et al. 2007). También en el año 2007, se publicó el primer estudio multicéntrico nacional de epidemiología molecular y mecanismos de resistencia a las carbapenemes en el que se analizaron 236 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en noviembre de 2003 (Gutiérrez et al. 2007). No obstante, sólo una cepa (0,4%) fue productora de carbapenemasa (VIM-2).



Finalmente, cabe destacar la descripción en nuestro país de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* productora de una carbapenemasa de clase A (GES-5) (Viedma et al. 2009).

### Detección

#### Cribado

Al contrario de lo que ocurre generalmente en las enterobacterias, la producción de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* suele conferir resistencia de alto nivel a los carbapenemes, debido principalmente a su mayor resistencia intrínseca, determinada por la producción de la cefalosporinasa inducible AmpC, la expresión basal de bombas de expulsión (sobre todo MexAB-OprM) y la menor permeabilidad de su membrana externa. En este sentido, la CMI del imipenem y del meropenem generalmente están en el intervalo de 8 a > 128 µg/ml en las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de MBL (Queenan and Bush 2007). Por lo tanto, el primer condicionante para pensar en la presencia de carbapenemasas es que la cepa no sea sensible a los carbapenemes. Esto es, sin duda, una ventaja respecto a las enterobacterias, en las que la CMI de los carbapenemes en cepas productoras de carbapenemasas se sitúan frecuentemente por debajo de los puntos de corte.

El principal reto de la detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* no es la falta de sensibilidad del cribado por CMI de carbapenemes, sino su

especificidad extremadamente baja, ya que actualmente es mucho más habitual la resistencia a carbapenemes por mecanismos mutacionales que la mediada por carbapenemasas. Ésta sería por consiguiente, una clara desventaja en comparación con las enterobacterias, en las que la contribución de los mecanismos de resistencia mutacionales a la resistencia a los carbapenemes es infinitamente menor. Es por lo tanto, necesario acotar más el cribado de las cepas productoras de carbapenemasas, antes de pasar a los ensayos específicos de detección, con datos adicionales de sensibilidad. En síntesis, deben considerarse posibles candidatas a la producción de carbapenemasas las cepas que sean intermedias/resistentes al imipenem o al meropenem, y que además sean I/R a ceftazidima, cefepime o piperacilina- tazobactam. Aun así, la explicación más común será la combinación de varios mecanismos cromosómicos (con frecuencia, inactivación de OprD más hiperproducción de AmpC o MexAB-OprM), aunque, en este contexto, la sensibilidad al aztreonam apuntaría hacia la presencia de una MBL. No obstante, la resistencia fenotípica a este fármaco no descarta en absoluto la presencia de una MBL, ya que no es infrecuente que exista adicionalmente resistencia cromosómica a este antibiótico en cepas productoras de MBL.

En cualquier caso, después del cribado por patrón de sensibilidad es siempre necesario utilizar ensayos fenotípicos, bioquímicos o genéticos para constatar la presencia de carbapenemasas.

### Tests de detección fenotípicos

Una primera técnica fenotípica para detectar la presencia de carbapenemasas adquiridas, aunque no permite discriminar la clase (A, B o D), es el test modificado de Hodge (Lee et al. 2001, 2003), que si bien se utiliza con más frecuencia en enterobacterias, también puede ser útil en *Pseudomonas aeruginosa*.

En un estudio, Test de Hodge Modificado fue menos eficaz que la de la CDDST con imipenem y EDTA, de tal manera que, de un total de 52 cepas de *Pseudomonas* productoras de MBL, la primera identificó como positivas sólo a 34, mientras que las 18 restantes dieron resultados ambiguos. Además, se obtuvieron resultados ambiguos en nueve cepas más, no productoras de carbapenemasa, que podrían haber sido interpretadas como falsos positivos. En cambio, la CDDST no dio ningún falso positivo e identificó correctamente las 52 cepas portadoras de MBL (Lee et al. 2001). Por lo que parece evidente que, una vez más, las sinergias con inhibidores superan de largo al test de Hodge modificado.

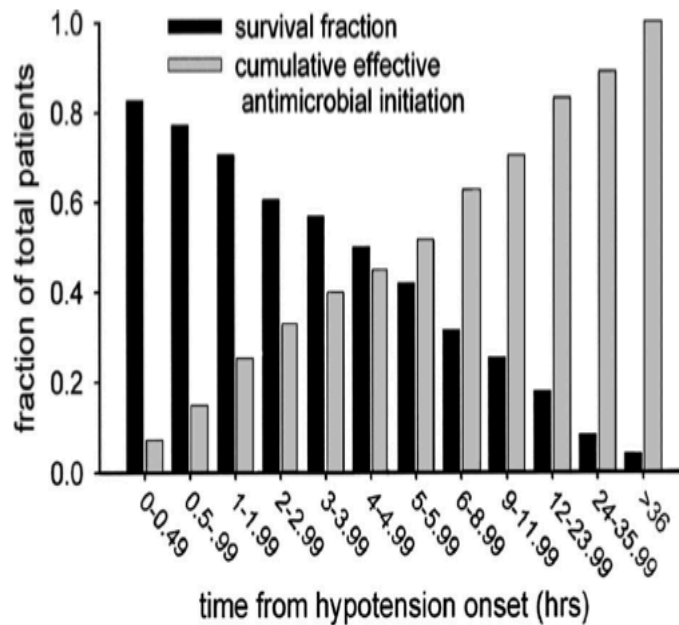
### DetECCIÓN DIRECTA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

La detección de la actividad enzimática y la biología molecular son técnicas que se basan en las características de la enzima y en los genes que la codifican por lo que no cabe esperar diferencias respecto a lo descrito para las enterobacterias.

## Tratamiento

Respecto al tratamiento de este tipo de infecciones, este suele verse restringido al uso de aminoglucósidos, colistina, tigeciclina o fosfomicina. Pero el dato más preocupante es que, aun presentando un perfil de sensibilidad a carbapenemes podría haber un fracaso terapéutico con el uso de éstos, si hay una carbapenemasa implicada (Wiskirchen et al. 2014) lo que sugiere que para ciertas enzimas el perfil genético predeciría mejor la actividad de los carbapenemes que su perfil fenotípico, por eso, cada vez, se plantea más la posibilidad de tratamientos combinados para tratar este tipo de infecciones. Además si extrapolamos este dato a los casos de una sepsis en la que la instauración de un régimen adecuado en las primeras horas es un factor importantísimo de supervivencia (Kumar et al. 2006), hace que este problema sea aún más dramático. (Fig. 4)

**Figura 4 Relación entre el tiempo transcurrido desde el inicio de un tratamiento adecuado y la tasa de supervivencia en caso de shock séptico<sup>3</sup>**



<sup>3</sup> Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock\*: Crit Care Med. 2006 Jun;34(6):1589–96.

## La espectrometría de masas en microbiología clínica

Los laboratorios de microbiología están experimentando una revolución gracias al uso de la espectrometría de masas “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight” (MALDI-TOF MS). La obtención de un espectro característico o "huella espectral" de una especie dada es la base de la utilización de la espectrometría de masas en la identificación bacteriana lo cual supone una verdadera revolución en el laboratorio de Microbiología Clínica. Como su nombre indica, la espectrometría de masas consiste en separar e identificar moléculas según su masa y su carga, sus aplicaciones son numerosas y abarcan muchos campos (análisis de péptidos en biotecnología, análisis de fármacos en farmacología, análisis de muestras ambientales...). El principio de esta medición se basa en la posibilidad de un flujo de iones de ser desviado por un campo eléctrico y/o magnético, siendo estas trayectorias proporcionales a la masa y la carga de cada uno de los iones. Este principio requiere que las moléculas y los átomos de una muestra sean transformados en iones en fase gaseosa, antes del análisis por el espectrómetro de masas. Un espectrómetro de masas tiene siempre una fuente de ionización para permitir el paso al estado gaseoso de la muestra y la ionización de las moléculas, un analizador que permite la separación de los iones en función de su masa/carga ( $m/z$ ), un detector que permite la detección de los iones y proporciona una señal eléctrica proporcional al número de iones

detectados, y, finalmente, un sistema de informático de procesamiento de la señal para visualizar los espectros.

El primer espectrómetro de masas fue diseñado por Francis William Aston en 1922 y con él consiguió demostrar la presencia de isotopos separándolos en función de su masa/carga (Aston 1933). Durante todo el siglo 20, la espectrometría de masas ha ido teniendo cada vez más relevancia, sobre todo en el campo de la proteómica y gracias a ello, se han ido desarrollando nuevas técnicas de ionización y separación de iones.

No fue hasta los años 80 cuando apareció el concepto de MALDI-TOF MS. En esa época, la ionización se hacía sobre moléculas con una masa no superior a 1.500 Dalton y desde luego parecía impensable ionizar moléculas de más de 10.000 Dalton ya que eran demasiado frágiles y se fragmentarían al intentar ionizarlas. En 1988, Koichi Tanaka demostró que se podía ionizar la lisozima (14.300 Dalton) cuando la muestra se mezclaba con un solución compuesta por polvo metálico ultra fino y glicerol (Tanaka et al. 1988), En la misma época Michael Karas y Franz Hillenkamp consiguieron ionizar la albumina (66.600 Dalton) (Karas and Hillenkamp 1988). Gracias a ello, estos tres científicos comparten el premio nobel de química 2002 por la puesta a punto de la espectrometría de masas MALDI-TOF para el análisis de biomoléculas.

## **Espectrometría de masas MALDI-TOF**

### Fundamento

La ionización suave es la fase fundamental para la identificación bacteriana, ya que permite el análisis de macromoléculas como las proteínas pudiendo llegar a tamaños de 100 kDa. La técnica MALDI consiste en depositar en un soporte (placa metálica) una mezcla de una solución orgánica saturada en cristales (matriz) con la muestra a estudiar. En microbiología esta muestra suele ser una colonia bacteriana o fúngica que se deposita directamente sobre la tarjeta metálica a la cual se le añade la matriz; estos dos compuestos cristalizan como consecuencia de la evaporación de los solventes de la matriz, quedando así la muestra atrapada dentro de la matriz. La placa es introducida en el espectrómetro de masas en el cual un laser (generalmente de nitrógeno) incide sobre la mezcla muestra-matriz. Este fenómeno se repite múltiples veces con el fin de maximizar el proceso de ionización.

La matriz es la clave de este proceso, ella es la responsable de absorber la energía del láser que facilita la desorción (mecanismo por el cual la muestra pasa al estado gaseoso) de los iones de la mezcla. Durante este proceso se produce una transferencia de iones entre las moléculas de la matriz y las de la muestra para acabar formándose iones generalmente mono cargados.



### **Concepto TOF y descripción de MALDI-TOF**

La técnica de ionización MALDI puede estar asociada a la tecnología TOF (Time Of Flight), formando la tecnología MALDI-TOF que, a día de hoy, es la única que se utiliza en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de microorganismos. Al asociar estas dos técnicas, los iones previamente generados al incidir el laser sobre la mezcla son introducidos en “ tubo de vuelo” y retenidos momentáneamente hasta la aplicación de una aceleración por impulso eléctrico. A continuación, las proteínas ionizadas pasan a la zona del tubo donde se aplica un vacío constante de manera que “vuelan” hasta un detector situado en el otro extremo. Este tiempo de vuelo de los iones es inversamente proporcional a su masa de tal manera que los iones que tengan una masa elevada tardaran más tiempo en llegar al detector. Al final de este “tubo de vuelo“ se encuentra un multiplicador de electrones que amplifica la señal y la transmite a un sistema informático. Esta información es analizada por un analizador de masas y expresada en forma de cociente  $m/z$  , este valor electrodinámico permite generar un espectro. Este sistema puede detectar moléculas con una concentración del orden de femtomoles ( $10^{-15}$ mol/l) pero con una limitación : una baja resolución para las moléculas de alto peso molecular lo cual hace que algunos iones con una cinética diferente puedan tener un mismo cociente  $m/z$ .

### Matriz

Las matrices más utilizadas son el DHB (ácido 2,5 dihydroxibenzoico), el ácido sinapínico y el HCCA (ácido  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamico). Estas matrices son disueltas en un solvente orgánico compuesto por agua, etanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético de manera que la muestra a estudiar pueda disolverse en esta mezcla. Las sustancias hidrófobas de la muestra tendrán afinidad por el acetonitrilo mientras que las hidrófilas lo harán por el agua. Después de mezclar estas dos sustancias se deja secar al aire libre, de manera que el solvente se evapore y nada más quede la matriz cristalizada y la muestra en su interior.

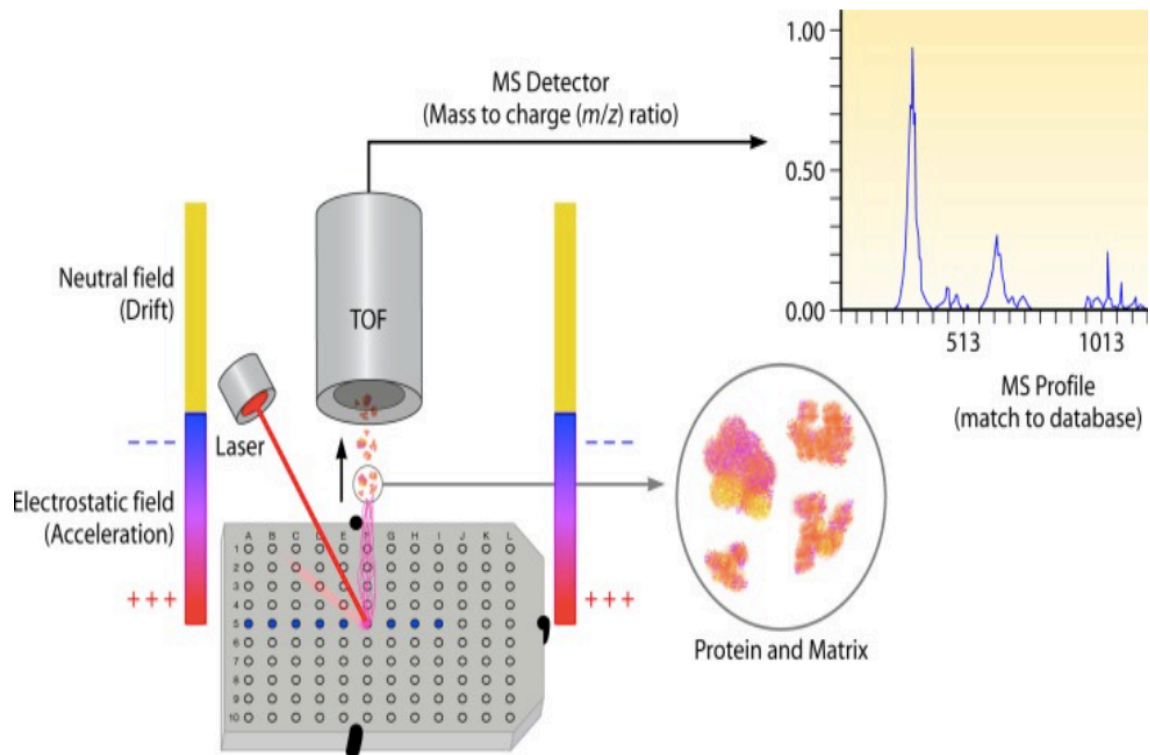
Las matrices utilizadas deben de reunir ciertos requisitos:

- Deben de poderse mezclar con agua y con solventes orgánicos.
- Deben de ser lo suficientemente grandes como para no evaporarse durante la preparación de la muestra.
- Deben de ser lo suficientemente pequeños como para tener una buena volatilidad y vaporizarse bajo la acción de un rayo laser.
- Deben de ser ácidos para poder transmitir protones a la muestra y así poder ionizarla.
- Deben de ser compuestos aromáticos para así poder absorber los rayos ultravioletas del laser.

## El espectro

Los datos almacenados son procesados con el fin de visualizarlos en forma de espectro en el que cada pico corresponde a un tipo de molécula. En el eje de las ordenadas se representa la intensidad relativa de la señal, mientras que en el eje de las abscisas se indica la talla de la molécula en Dalton.

*Figura 5 Esquema general del funcionamiento de un espectrómetro de masas MALDI-TOF<sup>4</sup>*



<sup>4</sup> Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul;26(3):547-603

## **Sistemas y bases de datos disponibles**

Dentro de los fabricantes de espectrómetros de masas, existen dos sistemas MALDI-TOF diseñados para su uso en microbiología, uno comercializado por Bruker y el otro por Biomerieux. Cada equipo incluye un software de manipulación, una base de datos ya creada y un sistema experto responsable de la correcta identificación. La identificación de un determinado microorganismo se basa en el análisis del espectro generado y es en esto en lo que difieren los dos sistemas.

### ❖ BRUKER

El Software propuesto por Bruker se llama Biotyper y es capaz de identificar bacterias, Micobacterias y hongos. En este sistema los espectros obtenidos son comparados con una base de datos generada mediante múltiples repeticiones sobre cepas de referencia.

Una puntuación basada en las masas identificadas y su intensidad es utilizada para la emisión de los resultados de tal manera que una puntuación entre 2,33 y 3 es equivalente a una identificación muy probable a nivel de especie; entre 2 y 2,32 como una buena identificación a nivel de genero y probablemente a nivel de especie; entre 1,7 y 1,999 como identificación probable de genero mientras que puntuaciones inferiores a 1,699 suponen la no identificación de la muestra.

❖ BIOMERIEUX

Vitek-MS es el software propuesto por Biomerieux. Este sistema difiere del anterior en la presentación de los resultados que se expresa en porcentajes de concordancia de tal manera que porcentajes situados entre un 60% y un 100% significan que la identificación es fiable, mientras que un porcentaje inferior al 60% implica una baja correlación por lo que el sistema nos da a elegir entre varias identificaciones posibles.

## **Aplicaciones en microbiología clínica**

Su rápida expansión dentro de los laboratorios de microbiología clínica va acompañada de un elevado interés por intentar desarrollar nuevas utilidades como la identificación de microorganismos directamente de muestra clínicas sin cultivo previo (Ferreira et al. 2010, 2011a, 2011b), la detección de mecanismos de resistencia o el estudio de relaciones entre microorganismos mediante el análisis de su perfil proteico (Burckhardt et al. 2009; Mencacci et al. 2012), este ultima aplicación con resultados muy dispares (Spinali et al. 2014).

### **❖ DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA**

Aunque la rápida identificación de los microorganismos con la técnica MALDI-TOF permite mejorar el tratamiento empírico, la rápida determinación de las sensibilidades a las diferentes antibióticos sigue siendo la variable que más condiciona un buen manejo terapéutico del paciente. Ciertamente es que la identificación de las bacterias responsable de la infección permite acotar el tratamiento en función de los perfiles de resistencia de las especies implicadas pero no supone una ciencia exacta. La espectrometría de masas es una metodología que permite analizar las proteínas bacterianas por lo que no es descabellado pensar que se pueda utilizar para caracterizar las enzimas responsables de los diferentes mecanismos de resistencia. En esta línea varios han sido los trabajos publicados

(Edwards-Jones et al. 2000; Wybo et al. 2011; Griffin et al. 2012) aunque debido a su complejidad no son utilizados en la rutina diaria.

Una opción más simple y más viable dentro de los laboratorios de microbiología clínica es detectar los productos de degradación de los antibióticos debido a un determinado mecanismo de resistencia, en 2012 el grupo de Hooff presentó un trabajo en el cual detectaban la presencia de una  $\beta$ -lactamasa tipo TEM-1 en una cepa de *Escherichia coli* (Hooff et al. 2012). Para ello, incubaron esta cepa en una solución de ampicilina de manera que, después de esta incubación, se produjo un cambio en el peso molecular de la ampicilina debido a la hidrólisis de esta por la  $\beta$ -lactamasa; este cambio de masa, al ser sobre una molécula de bajo peso molecular, es fácilmente detectable lo que hace que esta técnica sea viable en rutina.

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

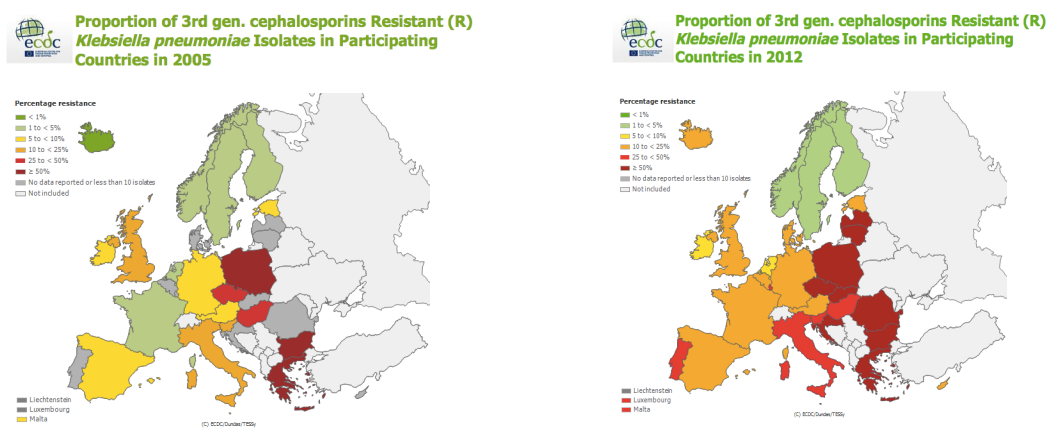


Tres factores explican la alarma creada ante este tipo de microorganismos:

- Su elevada diseminación por transferencia a través de plásmidos. Es inevitable la comparación con la evolución de las cepas productoras de CTX-M en la última década (Fig. 6)
- La extrema dificultad para detectar este tipo de mecanismos de resistencia.
- La posibilidad de fracaso terapéutico usando carbapenemes si hay alguna carbapenemasa implicada ( aunque la cepa en cuestión sea sensible a carbapenemes en el antibiograma).

Parece evidente que, tanto a nivel epidemiológico como a nivel clínico, es necesario la puesta a punto de nuevos métodos de diagnóstico rápidos y fiables para la detección de cepas productoras de carbapenemasas con el fin de optimizar el tratamiento y de limitar la difusión de este tipo de enzimas.

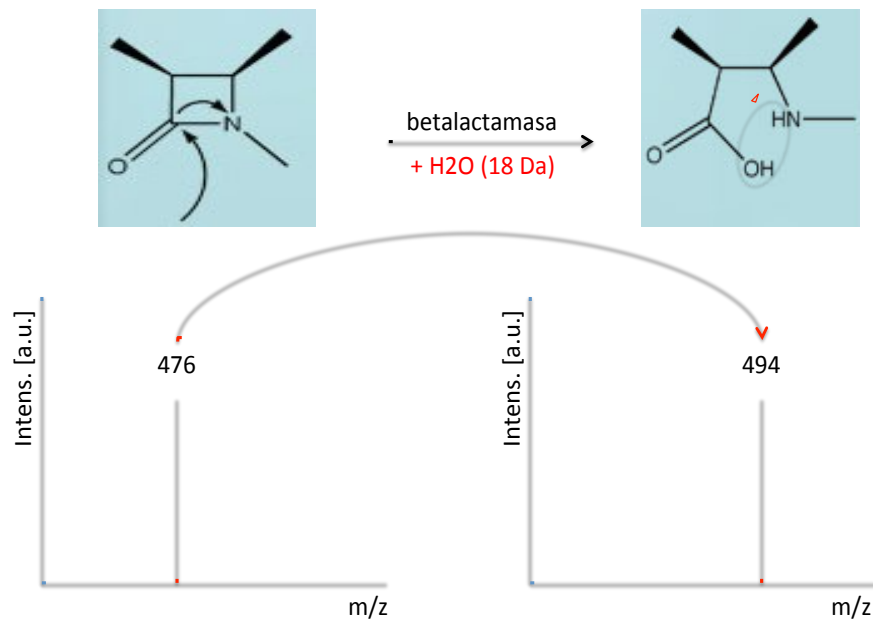
**Figura 6 ECDC. EARSS annual report from the European Surveillance System 2005 y 2012. Proporción de *Klebsiella pneumoniae* aislados de muestras invasivas resistentes a cefalosporinas de tercera generación**



Basándonos en la posibilidad de detectar indirectamente la hidrólisis enzimática producida sobre los anillos  $\beta$ -lactámicos (fig. 7), nuestro trabajo fue poner a punto esta metodología para poder aplicarla a la detección de carbapenemasas, con los siguientes objetivos generales y específicos:

*Figura 7 Incorporación de una molécula de H<sub>2</sub>O tras la hidrolisis del anillo  $\beta$ -lactámico por parte de la enzima y su monitorización mediante MALDI-TOF*

**MS**



## General

- Diseñar un método basado en la tecnología MALDI-TOF MS para poder identificar los microorganismos productores de carbapenemasas directamente de hemocultivos positivos.

## Específicos

- Diseñar una metodología para la detección de carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS.
- Validación prospectiva y estudio de incidencia.
- Identificar los microorganismos directamente de los frascos de hemocultivo positivos mediante lisis-centrifugación y MALDI-TOF MS.
- Detectar de carbapenemasas directamente desde los hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

# Ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF

## Listado de cepas

Todas las cepas fueron aisladas de muestras clínicas y pertenecen a la colección de nuestro laboratorio, todas fueron caracterizadas previamente a nivel molecular (anexo 1). La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se utilizó como control negativo.

- Cepas no productoras de carbapenemasas:
  - Enterobacterias (n = 29)
  - *Pseudomonas aeruginosa* (n=20)
- Cepas productoras de carbapenemasas:
  - Enterobacterias [n=6 (2 IMP, 3 VIM y 1 KPC)]
  - *Pseudomonas aeruginosa* [n = 8 (7 VIM y 1 IMP)]

## Protocolo de trabajo

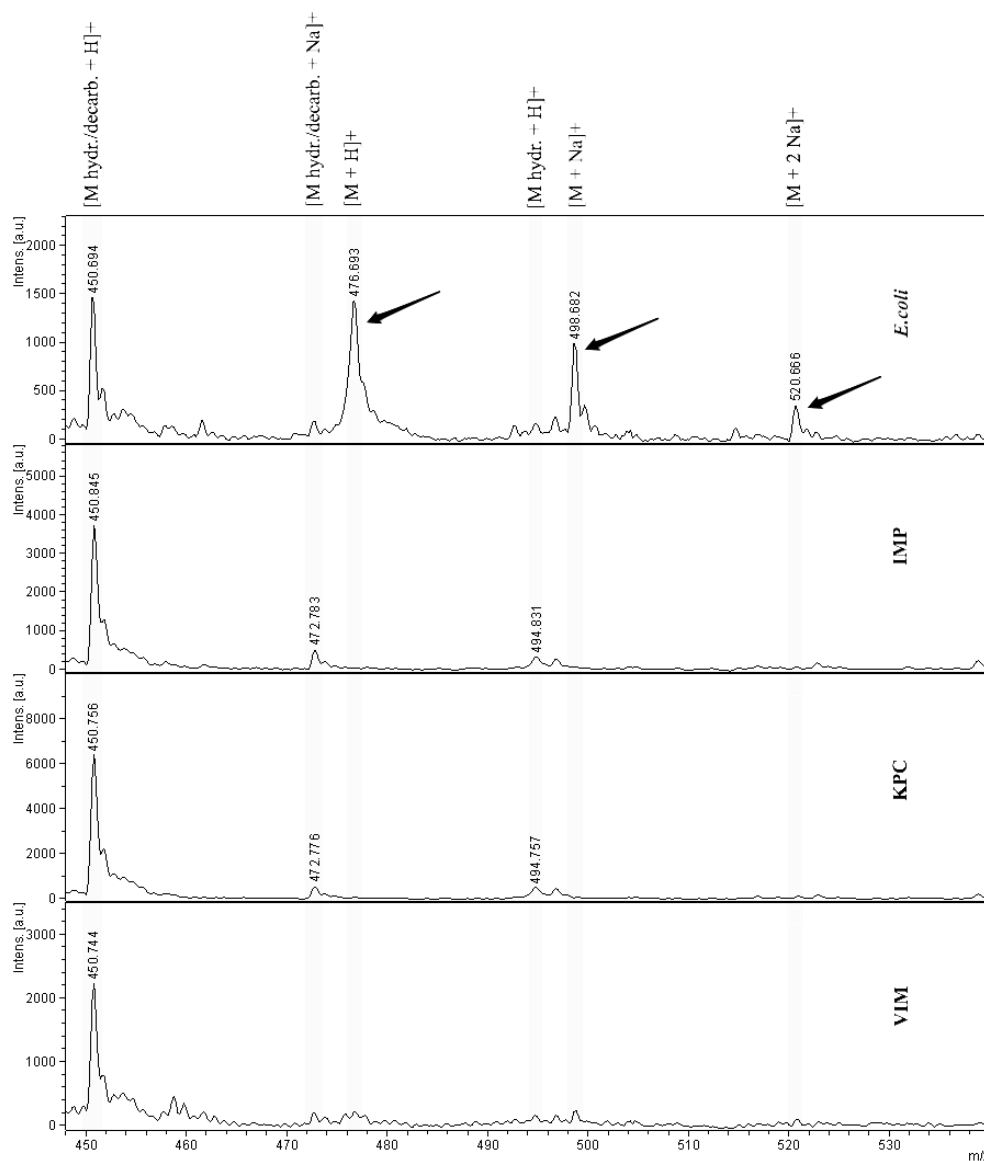
Para el ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF MS, se partió de cultivos de 18-24h en agar Muller-Hinton con los cuales se realizó una suspensión lechosa en tubos eppendorf con una solución de ertapenem 0,25 mg/ml (Invanz, Merck Sharp & Dohme, NJ) diluido en un buffer de reacción (20 mmol/l Tris-HCl, 0,01% sodium

dodecyl sulfate, pH 7.0). Esta suspensión se incubó durante 4 horas en agitación a 37°C. Pasadas estas cuatro horas, se centrifugaron los eppendorf (2 min a 12000 g) y finalmente se depositó un microlitro del sobrenadante junto con un microlitro de matriz HCCA (10 mg/ml).

## **Obtención y análisis de los espectros**

Para la obtención de los espectros (Fig. 8) se utilizó un aparato microflex, con el programa flexcontrol optimizado para detectar moléculas de bajo peso molecular.

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa flexanalysis (anexo 1)

Figura 8 Espectro del ensayo de hidrólisis<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Espectro del ensayo de hidrólisis (ertapenem) con *E. coli* ATCC 25922 y con cepas productoras de carbapenemasas (IMP, KPC, VIM). Los picos correspondientes a las formas no hidrolizadas del ertapenem están indicadas mediante flechas .

$[M + H]^+$  : pico del ertapenem

$[M + Na]^+$  : pico del aducto formado con una molécula de sodio

$[M + 2Na]^+$  : pico del aducto formado con dos moléculas de sodio

$[M_{hydr./decarb.} + H]^+$  : pico de la forma hidrolizada y descarboxilada

$[M_{hydr.} + H]^+$  : pico de la forma hidrolizada

$[M_{hydr./decarb.} + Na]^+$  : pico del aducto de la forma hidrolizada junto con una molécula de sodio.



# Validación prospectiva y estudio de incidencia

## Material biológico

Todos los aislados se trabajaron en el contexto de la rutina de nuestro laboratorio. Para ello, las muestras clínicas fueron valoradas según los criterios establecidos en nuestro laboratorio. El antibiograma se realizó mediante el sistema MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA) y/o mediante disco/difusión, y la identificación se realizó mediante MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se interpretaron según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI 2013).

Para la validación de la técnica de hidrolisis mediante MALDI-TOF MS y el estudio de incidencia se estudiaron las cepas que se aislaron de muestras clínicas durante 5 meses (21-01-2013 y el 21-06-2013) y que cumplieron los siguientes requisitos:

### ❖ ENTEROBACTERIAS

Se siguieron las recomendaciones de cribado establecidas en el documento de detección de mecanismos de resistencia de EUCAST.

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)

- halos < 25 mm para meropenem y/o CMI >0,125 mg/l para ertapenem y/o >1 mg/l para imipenem.
  - Excepciones: Géneros *Proteus/Providencia/Morganella* SÓLO se valora meropenem y ertapenem. Género *Enterobacter* SÓLO se valora imipenem y meropenem.

#### ❖ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Se siguieron las recomendaciones aportadas por el grupo de Willems (Willems et al. 2013) en el que establecen como punto de corte para el cribado una CMI  $\geq 4$  o lo que es lo mismo toda cepa que no presente un perfil de sensibilidad según los puntos de corte clínicos propuestos por el CLSI (CLSI 2013).

## Detección fenotípica de carbapenemasas

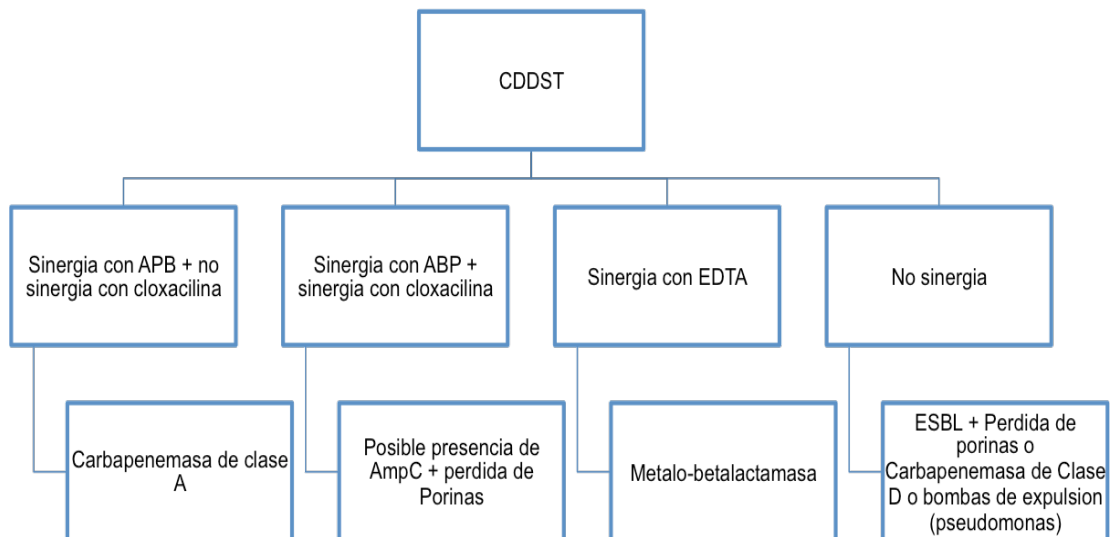
Con las cepas que cumplieron los criterios anteriores se realizó la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST) descrita por Willems (Willems et al. 2013), la cual se describe a continuación:

- a. Se inoculó una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.
- b. Se colocó discos de (se preparan añadiendo el volumen de inhibidor indicado en la tabla 2):
  - Meropenem, meropenem + cloxacilina, meropenem + ácido fenilborónico (APB) e imipenem + EDTA para enterobacterias
  - Meropenem, meropenem + cloxacilina, meropenem + ácido fenilborónico (APB) y ceftazidima + EDTA para *Pseudomonas* .
- c. Se Incubó a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 16-20 horas.
- d. Se midió en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa
- e. Se midió el incremento en el halo de inhibición del carbapenem con inhibidor respecto al del carbapenem solo.

**Tabla 2 Preparación de los discos con sus respectivos inhibidores e incremento de halos necesarios para considerar una sinergia**

| Microorganismo                | Enzima  | Disco/tableta       | Inhibidor           | [C]       | [V]   | Incremento |
|-------------------------------|---------|---------------------|---------------------|-----------|-------|------------|
| Enterobacterias               | Clase A | Meropenem (10 mg)   | Ácido fenilborónico | 60 mg/ml  | 10 ml | ≥ 4 mm     |
|                               |         |                     | Cloxacilina         | 75 mg/ml  | 10 ml | > 5 mm     |
|                               | Clase B | Imipenem (10 mg)    | EDTA                | 0,1M      | 10 ml | ≥ 5 mm     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Clase A | Meropenem (10 mg)   | Ácido fenilborónico | 60 mg/ml  | 10 ml | ≥ 4 mm     |
|                               |         |                     | Cloxacilina         | 300 mg/ml | 10 ml | > 3 mm     |
|                               | Clase B | Ceftazidima (30 mg) | EDTA                | 0,1M      | 8 ml  | ≥ 5 mm     |

**Figura 9 Algoritmo de interpretación de la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST)**



## Ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF

Para la validación de la técnica se realizó en paralelo esta técnica junto con la CDDST a todas las cepas que cumplieron los criterios de cribado. La metodología fue estrictamente la misma utilizada en el apartado anterior.

## Confirmación molecular de carbapenemasas

La confirmación de estas carbapenemasas se realizó mediante PCR multiplex con los cebadores descritos por diferentes grupos (Mendes et al. 2007; Cole et al. 2009; Poirel et al. 2011). En el contexto de la rutina de nuestro laboratorio sólo se realiza la confirmación mediante PCR cuando según el algoritmo de interpretación del CDDST se debe sospechar la presencia de una carbapenemasa. Pero en el contexto de validación de la técnica se realizó a todas las cepas que cumplieron los criterios de cribado

**Tabla 3 Primers y tamaño de los amplicones**

| Diana   | PRIMER   | Tamaño del amplicón (pb) | Referencia         |
|---------|--|--------------------------|--------------------|
| OXA- 48 | GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC<br>CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG | 438                      | Poirel et al. 2011 |
| VIM     | GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC<br>AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG | 382                      | Mendes et al. 2007 |
| IMP     | GAA TAG RRT GGC TTA AYT CTC<br>CCA AAC YAC TAS GTT ATC   | 188                      | Mendes et al. 2007 |
| KPC     | TCT GGA CCG CTG GGA GCT GG<br>TGC CCG TTG ACG CCC AAT CC | 399                      | Cole et al. 2009   |

## ❖ PREPARACIÓN DE MASTER MIX

**Tabla 4 Master mix para PCR multiplex**

| Reactivo                          | Cantidad (x1)               |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Buffer II (con Mg <sup>2+</sup> ) | 2,0 µl                      |
| dNTPs (10 mM)                     | 0,4 µl                      |
| Primers F y R ( mM)               | 0,8 ml (por cada primer)    |
| Taq (Kapa, 5 U/ ml )              | 0,1 µl                      |
| Agua                              | hasta volumen final (20 µl) |
| Muestra                           | 2 µl                        |

## ❖ PREPARACIÓN DE ADN MOLDE

- Se tomó 1 colonia de medio sólido y resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O
- Se calentó 10 min a 95°C
- Se centrifugó 5 min en ultracentrífuga
- Se recogió el sobrenadante

## ❖ CONDICIONES PCR

**Tabla 5 Condiciones de la PCR multiplex para genes IMP y OXA-48**

| Fase                      | IMP y OXA-48        |       |           |
|---------------------------|---------------------|-------|-----------|
|                           | T <sup>a</sup> (°C) | T     | Nº ciclos |
| Desnaturalización inicial | 95                  | 30 s  | 1         |
| Desnaturalización         | 95                  | 30 s  | 35        |
| Hibridación               | 52                  | 30 s  | 35        |
| Extensión                 | 72                  | 1 min | 35        |
| Extensión final           | 72                  | 2 min | 1         |
| Mantenimiento             | 4                   | ∞     | -         |

**Tabla 6 Condiciones de la PCR multiplex para genes VIM y KPC**

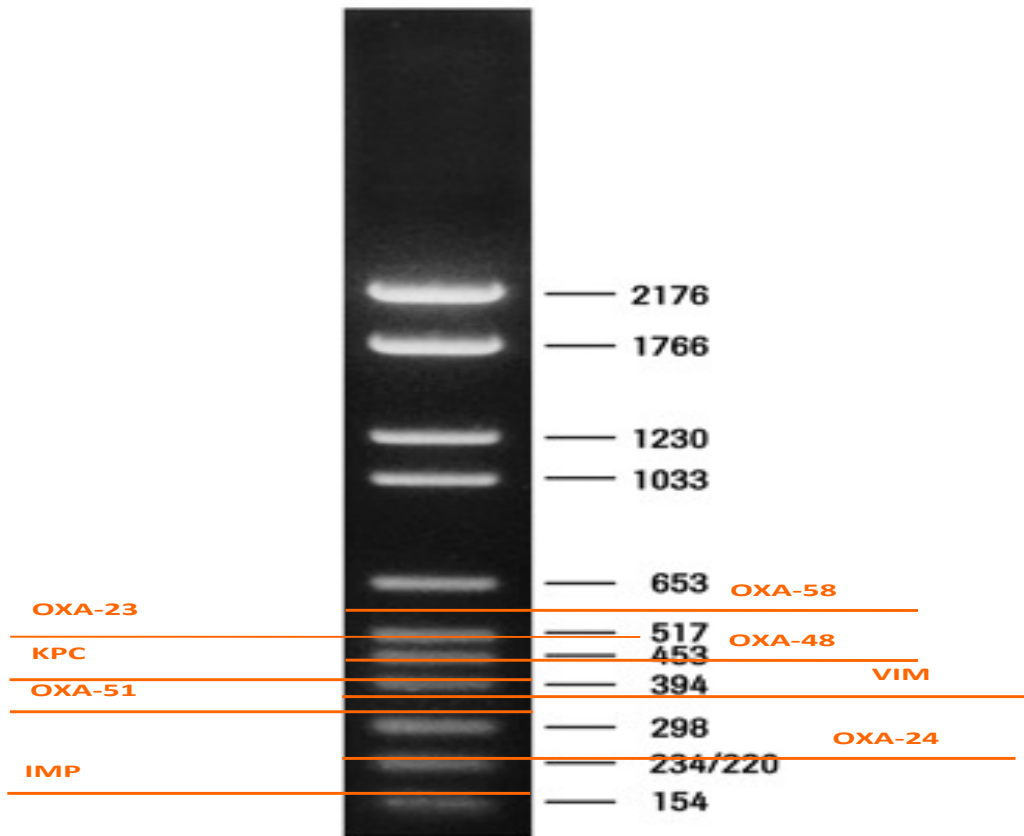
| Fase                      | VIM+ KPC            |       |           |
|---------------------------|---------------------|-------|-----------|
|                           | T <sup>a</sup> (°C) | T     | Nº ciclos |
| Desnaturalización inicial | 95                  | 2 m   | 1         |
| Desnaturalización         | 95                  | 30 s  | 35        |
| Hibridación               | 60                  | 30 s  | 35        |
| Extensión                 | 72                  | 1 min | 35        |
| Extensión final           | 72                  | 2 min | 1         |
| Mantenimiento             | 4                   | ∞     | -         |

#### ❖ DETECCIÓN Y REVELADO DEL AMPLIFICADO

La detección de los amplicones se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación (fig. 10)

- a. Preparación las muestras:
  - Se añadió 10 µl del amplificado + 2 µl de tampón de carga
- b. Preparación del Marcador de Peso Molecular (MPM: 150-2100 pb)
  - Se añadió 4 µl del MPM + 2 µl de tampón de carga
- c. Se mezcló en una tira de parafilm ambas cantidades y cargar en los pocillos del gel
- d. Se dejó correr el gel a 100v durante 30 minutos aproximadamente

*Figura 10 Gel con marcador de peso molecular*

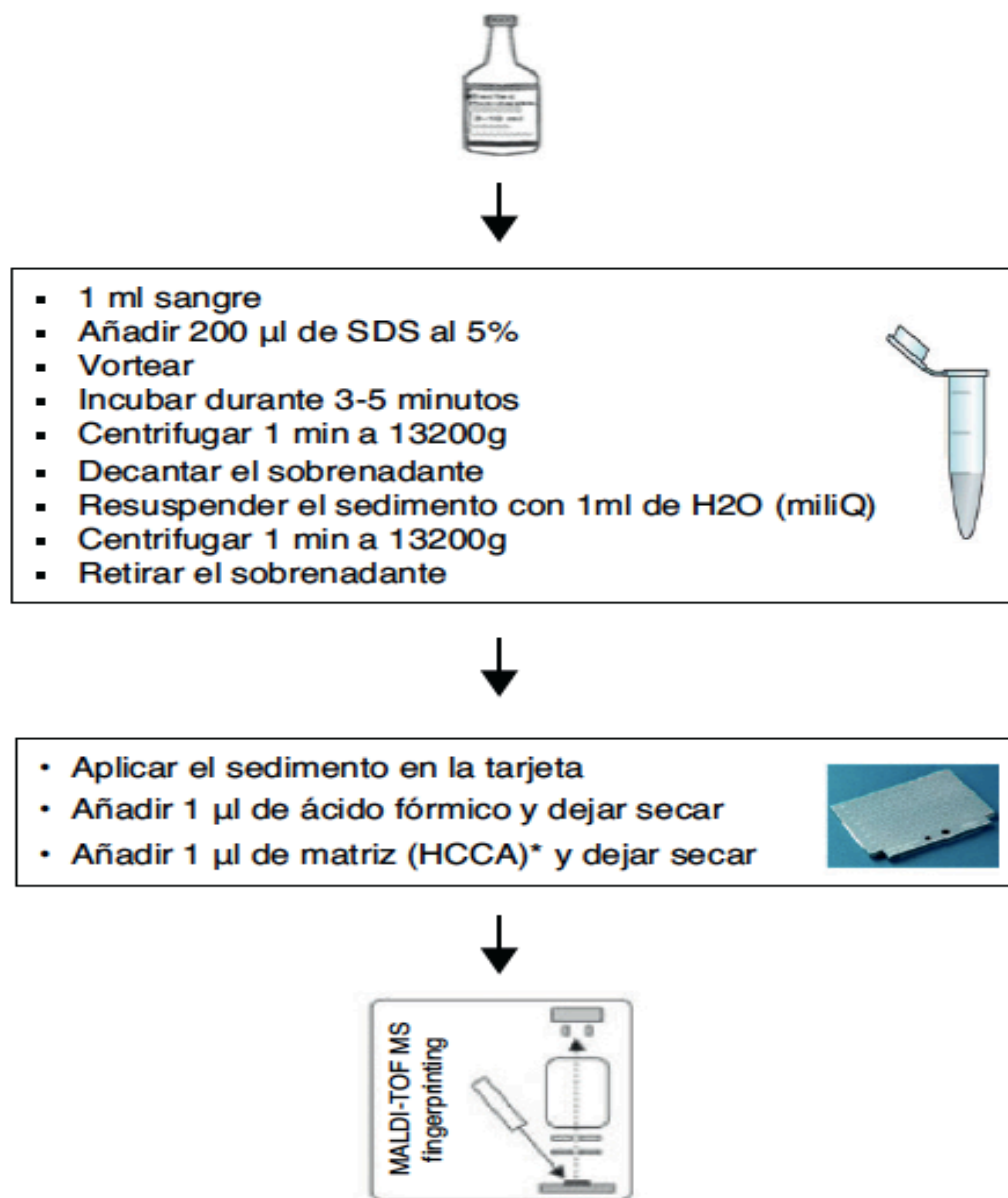




## **I**dentificación bacteriana de hemocultivos positivos mediante lisis centrifugación y MALDI-TOF

Durante el periodo comprendido entre febrero y abril 2012, 100 hemocultivos (BACTEC Plus Aerobic/Anaerobic, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) positivos elegidos aleatoriamente se estudiaron con la técnica de MALDI-TOF y se compararon simultáneamente con los métodos convencionales utilizados en nuestro laboratorio: tinción de Gram, WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid, España), Vitek (Biomerieux, Marcy L'Etoile, Francia) y MALDI-TOF de las colonias. Para la técnica de MALDI-TOF directamente del hemocultivo se utilizó como detergente para la lisis dodecilsulfato sódico (SDS) (fig. 11). Las muestras se analizaron en un microflex LT system, calibrado con Bruker Bacterial Test Standard. Para la identificación se sumaron hasta 240 disparos en modo automático, el espectro resultante se importó al software MALDI BioTyper 3.0 y se comparó con la base de datos existente.

**Figura 11** Procedimiento esquematizado de MALDI-TOF MS directo de hemocultivo



# Identificación de carbapenemasas directamente del hemocultivo

## Cepas

Todas las cepas fueron aisladas de muestras clínicas y pertenecieron a la colección de nuestro laboratorio. Fueron caracterizadas previamente a nivel molecular. Se utilizaron las siguientes cepas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.
- Cepas no productoras de carbapenemasas:
  - Enterobacterias (n = 10)
  - *Pseudomonas aeruginosa* (n = 10)
- Cepas productoras de carbapenemasas
  - Enterobacterias [n = 11 (3 IMP, 4 VIM, 1 KPC y 3 OXA-48)]
  - *Pseudomonas aeruginosa* [n = 8 (6 VIM y 2 IMP)]

## **Simulación de los hemocultivos**

Debido a la baja incidencia encontrada de cepas productoras de carbapenemasas durante el estudio prospectivo, se decidió proceder a la simulación de los hemocultivos para poner a punto la técnica.

Para ello, se procedió a inocular viales de hemocultivo (BACTEC™ Plus Aerobic/F) con 10 ml de sangre suplementado con 1 ml de una suspensión con 10-100 unidades formadoras de colonia de la cepa a estudiar. Esta suspensión se realizó mediante sucesivas diluciones en H<sub>2</sub>O partiendo de un 0,5 de McFarland. Inmediatamente después, se introdujeron los viales en un BACTEC™ 9240 blood culture system (BD Diagnostic System, Sparks, MD) hasta su positividad.

## **Procesamiento de los hemocultivos positivos**

El procesamiento de los hemocultivos positivos se realizó según muestra la siguiente figura (fig. 12).

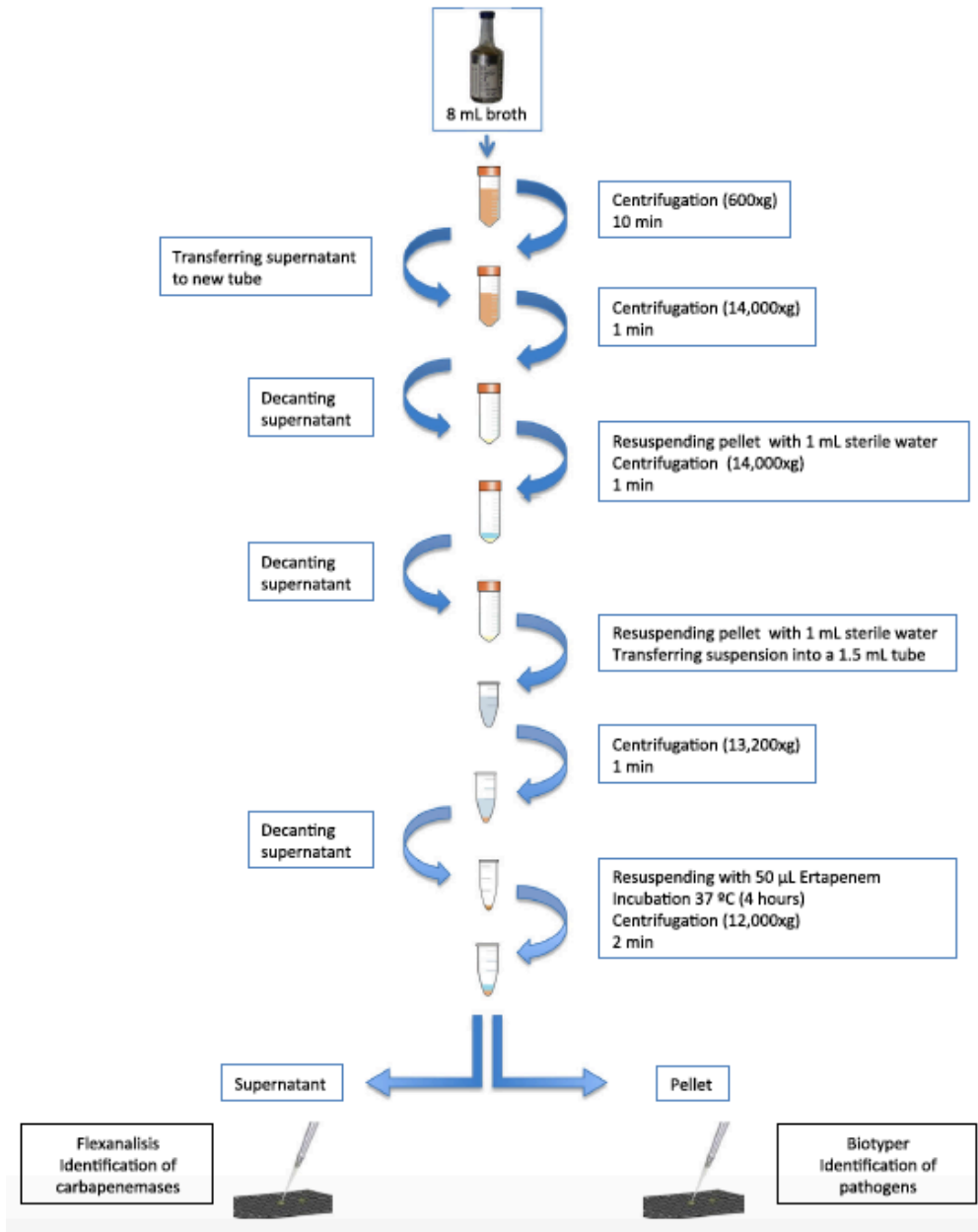
## **Obtención de los espectros**

Para la obtención de los espectros se utilizó un aparato microflex, con el programa flexcontrol optimizado para la detección de moléculas de bajo peso molecular (ver anexo 3).

## **Análisis de los espectros**

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa flexanalysis (ver anexo 3).

*Figura 12 Esquema de procesamiento mediante MALDI-TOF MS de los hemocultivos positivos*



# RESULTADOS

---

## **E**nsayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF (Ver anexo 1)

## **I**dentificación bacteriana de hemocultivos positivos mediante lisis centrifugación y MALDI-TOF (Ver anexo 2)

## **I**dentificación de carbapenemasas directamente del hemocultivo (Ver anexo 3)

## **V**alidación prospectiva y estudio de incidencia

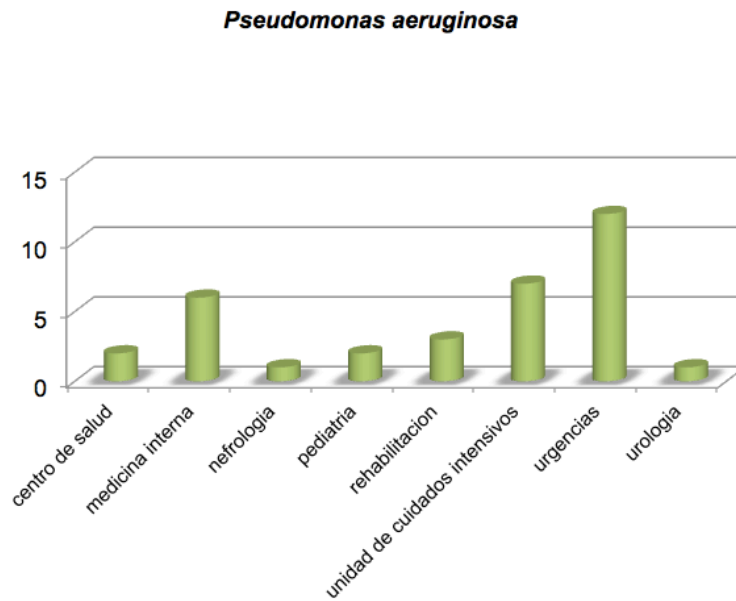
### **D**escripción de las cepas

Durante el periodo establecido 65 aislados cumplieron los criterios establecidos para la búsqueda de carbapenemasas, de los cuales 31 fueron enterobacterias y 34 *Pseudomonas aeruginosa*.

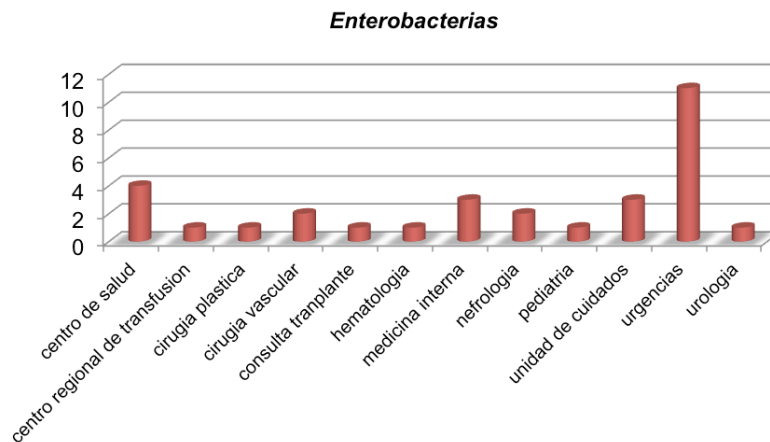


**Descripción según servicio asistencial**

**Figura 13** Numero de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* por servicio

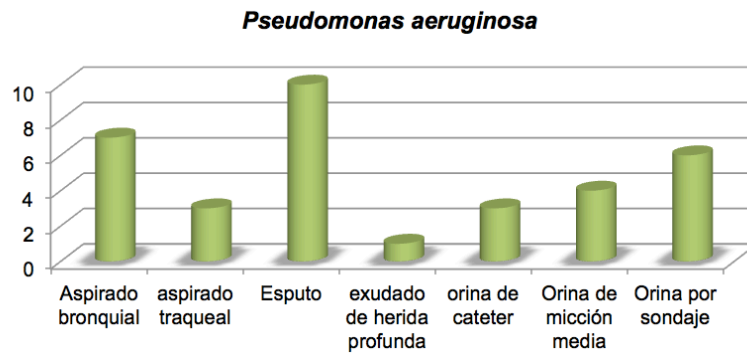


**Figura 14** Numero de aislados de enterobacterias por servicio

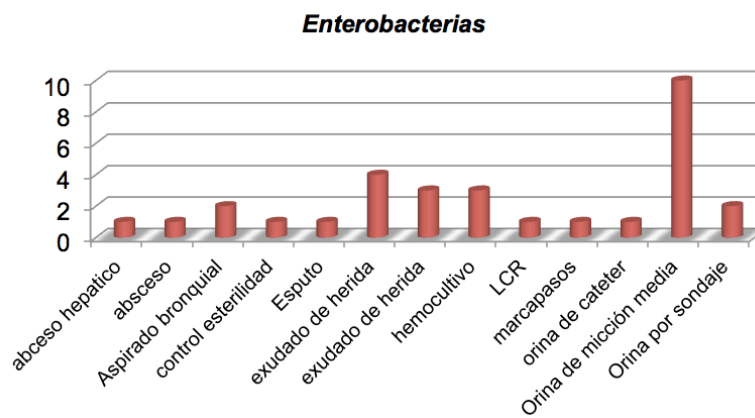


**Descripción según tipo de muestra**

**Figura 15** Numero de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* por tipo de muestra

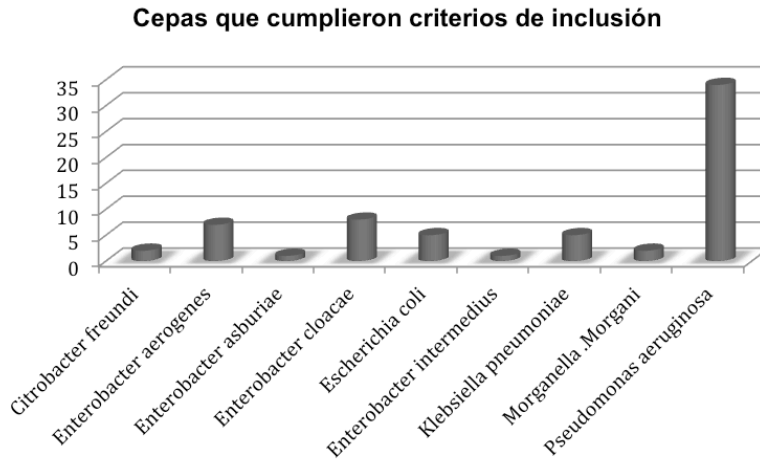


**Figura 16** Numero de aislados de enterobacterias por tipo de muestra



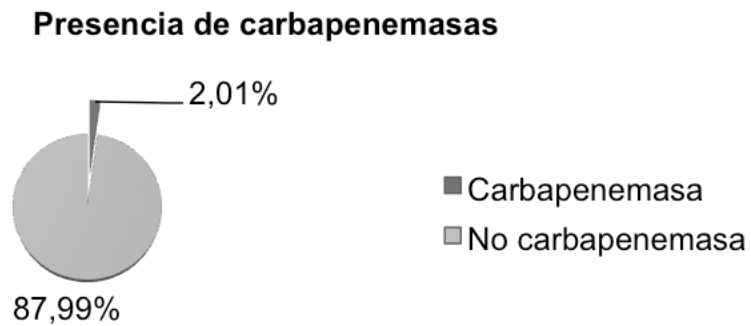
**Descripción según especies**

**Figura 17 Numero de cepas distribuido por especies**



Tan solo se aislaron 3 cepas productoras de carbapenemasas, todas de tipo VIM (2 *Enterobacter cloacae* y 1 *Pseudomonas aeruginosa*)

**Figura 18 Porcentaje de cepas productoras y no productoras de carbapenemasas**



## Resultados MALDI-TOF MS / CDDST / PCR

### *Pseudomonas aeruginosa*

- Detección de la hidrólisis por MALDI-TOF MS

La técnica de detección de la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico mediante MALDI-TOF MS presentó una sensibilidad y especificidad del 100%.

- Detección fenotípica mediante CDDST

La detección fenotípica utilizando la CDDST presentó una sensibilidad del 100% pero hubieron 4 falsos positivos (2 cepas categorizadas como metalo- $\beta$ -lactamasas y 2 categorizadas como clase A cuando no lo eran).

***Tabla 7 Comparación de resultados obtenidos en Pseudomonas aeruginosa con la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST) y la técnica de referencia (PCR)***

|                 |          | Resultado PCR             |                            |
|-----------------|----------|---------------------------|----------------------------|
|                 |          | Positivo                  | negativo                   |
| Resultado CDDST | Positivo | 1<br>(Verdadero Positivo) | 4<br>(Falso Positivo)      |
|                 | Negativo | 0<br>(Falso Negativo)     | 29<br>(Verdadero Negativo) |

- Sensibilidad:  $\frac{VP}{(VP+VN)} \times 100 = 100\%$
- Especificidad:  $\frac{VN}{(VN+FP)} \times 100 = 87,8 \%$
- Valor predictivo positivo:  $\frac{VP}{(VP+FP)} \times 100 = 20\%$
- Valor predictivo negativo:  $\frac{VN}{(FN+VN)} \times 100 = 100\%$

### Enterobacterias

- Detección de la hidrólisis por MALDI-TOF

La técnica de detección de la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico mediante MALDI-TOF presentó una sensibilidad y especificidad del 100%.

- Detección fenotípica mediante CDDST

En enterobacterias el test de CDDST presentó una sensibilidad y especificidad aceptables si bien 9 enterobacterias no produjeron sinergia con el CDDST por lo que la interpretación de estas cepas fue una producción de OXA-48 y/o ESBL + pérdida de porinas lo que supuso un 27 % de las enterobacterias estudiadas. Todas estas cepas resultaron no tener OXA-48 cuando se realizó la confirmación por PCR.

**Tabla 8 Comparación de resultados obtenidos en enterobacterias con la técnica de sinergia combinada de doble disco (CDDST) y la técnica de referencia (PCR)**

|                 |          | Resultado PCR             |                            |
|-----------------|----------|---------------------------|----------------------------|
|                 |          | Positivo                  | negativo                   |
| Resultado CDDST | Positivo | 2<br>(Verdadero Positivo) | 1<br>(Falso Positivo)      |
|                 | Negativo | 0<br>(Falso Negativo)     | 28<br>(Verdadero Negativo) |

- Sensibilidad:  $\frac{VP}{(VP+VN)} \times 100 = 100\%$
- Especificidad:  $\frac{VN}{(VN+FP)} \times 100 = 96,5 \%$
- Valor predictivo positivo:  $\frac{VP}{(VP+FP)} \times 100 = 66,6\%$
- Valor predictivo negativo:  $\frac{VN}{(FN+VN)} \times 100 = 100\%$

**Tabla 9 Resultado de las diferentes técnicas de detección de carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa***

| CEPA | Especie                       | PCR | MALDI | Interpretación CDDST      |
|------|-------------------------------|-----|-------|---------------------------|
| C3E6 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C3E8 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3F2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C3F3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C3F4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3G7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3G8 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3G9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C3H1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3H2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3H4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3H6 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3H9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C3I4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C3I5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | metalo-β-lactamasa        |
| C3I7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | metalo-β-lactamasa        |
| C4A1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C4A2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Carbapenemasa de clase A  |
| C4A3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C4B3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4B4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4C5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | VIM | +     | metalo-β-lactamasa        |
| C4C7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4D1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C4D4 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4D6 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4D7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | AmpC + pérdida de porinas |
| C4D8 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4D9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4E2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4E3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4E5 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4E7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Otros mecanismos          |
| C4F3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | -   | -     | Carbapenemasa de clase A  |

**Tabla 10 Resultado de las diferentes técnicas de detección de carbapenemasas en enterobacterias**

| CEPA | Especie                         | PCR | MALDI | Interpretación CDDST                 |
|------|---------------------------------|-----|-------|--------------------------------------|
| C3F8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4G1 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | VIM | +     | Metalo-β-lactamasa                   |
| C3E7 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3F1 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3F5 | <i>Escherichia coli</i>         | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C3F9 | <i>Escherichia coli</i>         | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C3G2 | <i>Morganella Morganii</i>      | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3G4 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3H3 | <i>Escherichia coli</i>         | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C3I2 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3I8 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C3I9 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4A7 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4A5 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4A6 | <i>Citrobacter freundii</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4A9 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4B1 | <i>Citrobacter freundii</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4B8 | <i>Escherichia coli</i>         | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4B9 | <i>Morganella Morganii</i>      | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4C2 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4C3 | <i>Escherichia coli</i>         | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4C4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4C9 | <i>Enterobacter aerogenes</i>   | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4D2 | <i>Enterobacter intermedius</i> | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4F2 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4F9 | <i>Enterobacter asburiae</i>    | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |
| C4F4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4F7 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | VIM | +     | metalo-β-lactamasa                   |
| C4F6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | -   | -     | ESBL + pérdida de porinas y/o OXA-48 |
| C4G9 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | Carbapenemasa de clase A             |
| C4H3 | <i>Enterobacter cloacae</i>     | -   | -     | AmpC +/- pérdida de porinas          |



# CONCLUSIONES

---

1. La identificación de carbapenemasas mediante MALDI-TOF puede ser una buena alternativa a los métodos tradicionales ya que es fácil de realizar, económica y con resultados en una jornada de trabajo. Su empleo, adicionando al buffer que contiene el carbapeneme diferentes tipos de inhibidores, para detectar la inhibición de la hidrólisis, puede ser de utilidad en estudios epidemiológicos y el tratamiento dirigido. No obstante, la ausencia de interpretación automatizada mediante software comercial limita actualmente su empleo en la rutina hospitalaria.
2. La validación prospectiva de esta metodología presentó una concordancia total con la técnica de referencia, confirmando así la excelente sensibilidad y especificidad de la misma.
3. La presencia en nuestro medio de cepas productoras de carbapenemasas en muestras clínicas de pacientes infectados durante el periodo estudiado es baja, en comparación con lo descrito en otras regiones.
4. La identificación directa de bacilos gramnegativos en hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF es adaptable a la rutina diaria del laboratorio y permite conocer la identidad del microorganismo responsable de una bacteriemia con 24 horas de antelación, sin presentar discordancia con la identificación mediante pruebas fenotípicas.

5. Tanto la detección de carbapenemasas como la identificación directa de bacilos gramnegativos desde hemocultivos positivos son totalmente compatibles y realizables en un protocolo unificado, con resultados en una jornada de trabajo. No obstante, requiere personal con experiencia para su realización. Esto unido a la baja frecuencia de presentación de estas enzimas hace que su utilidad sea debatible, aunque si su diseminación tiene el mismo curso que las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido se podría considerar su inclusión en la rutina

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321–31.
- Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J.* 1991 May 15;276(Pt 1):269–70.
- Aston FW. THE STORY OF ISOTOPES. *Science.* 1933 Jul 7;78(2010):5–6.
- Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Sep;74(1):88–90.
- Burckhardt I, Schutt S, Maier T, Zimmermann S. Outbreak analysis with MALDI-TOF Mass Spectrometry - Potentials and limits - An outlook. *Int J Med Microbiol.* 2009;299:69.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun 1;39(6):1211–33.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Apr;18(5):413–31.
- Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a  $\beta$ -Lactamase Gene, blaGIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec 1;48(12):4654–61.
- CLSI. M100\_S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013 Sep;1–205.
- Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, Nolte FS. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):322–6.
- Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier J-D, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Apr;29(4):380–8.
- Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug 1;65(8):1608–14.

- Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6437–40.
- Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):3877–80.
- Edwards-Jones V, Claydon M a, Evason DJ, Walker J, Fox a J, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2000;49(3):295–300.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2110–5.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011a;17(7):1007–12.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011b;17(4):546–51.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenemes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75(2):214–7.
- Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;17(4):552–6.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. The use of MALDI-TOF MS to identify Vancomycin Resistant Enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* [Internet].

- 2012;(June). Available from:  
<http://jcm.asm.org/content/early/2012/06/20/JCM.01000-12.short>
- Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010 Nov 18;15(46).
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Dec;51(12):4329–35.
- Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, van Belkum A, Goessens WHF, Luidert TM. Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012;11(1):79–84.
- Huang T-D, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):445–50.
- Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, et al. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Dec 1;50(12):4114–23.
- Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo).* 1979 Jan;32(1):1–12.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct 15;60(20):2299–301.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock\*: *Crit Care Med.* 2006 Jun;34(6):1589–96.
- Labuschagne CDJ, Weldhagen GF, Ehlers MM, Dove MG. Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Jun 1;31(6):527–30.

- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1584–90.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2001 Feb;7(2):88–91.
- Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2003 Oct;41(10):4623–9.
- Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J-D, et al. Novel Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaSIM-1, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov 1;49(11):4485–91.
- Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, et al. Identification of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;603–6.
- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):544–7.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Feb;16(2):112–22.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009 Apr;9(4):228–36.
- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):939–46.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1791–8.



- Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain (2012). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Sep 16;AAC.01513-13.
- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 1993 Feb;2(2):81-7.
- Peña C, Suarez C, Tubau F, Gutierrez O, Domínguez A, Oliver A, et al. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Oct;13(10):1026-9.
- Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011a Sep 1;55(9):4398-401.
- Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48  $\beta$ -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011b Sep;55(9):4398-401.
- Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-Encoded Ambler Class D  $\beta$ -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004a Jan 1;48(1):348-51.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004b Jan 1;48(1):15-22.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul 1;67(7):1597-606.
- Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar 1;44(3):622-32.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119-23.

- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs CD, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Sep 1;45(9):2598–603.
- Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Mar;46(3):932–3.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul 1;20(3):440–58.
- Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Sep 1;40(9):2080–6.
- Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(12):1699–701.
- Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Sep;57(6):493–5.
- Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, et al. First Description of an *Escherichia coli* Strain Producing NDM-1 Carbapenemase in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Sep 1;55(9):4402–4.
- Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. MICROBIAL TYPING BY MALDI-TOF MS: DO WE NEED GUIDANCE FOR DATA INTERPRETATION? *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Jul 23 [cited 2014 Aug 27]; Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01635-14>
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009 Sep 1;58(9):1133–48.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1988;2(8):151–3.
- Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Sep;57(9):4578–80.

- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Nov 1;50(5):673–9.
- Tórtola MT, Lavilla S, Miró E, González JJ, Larrosa N, Sabaté M, et al. First Detection of a Carbapenem-Hydrolyzing Metalloenzyme in Two Enterobacteriaceae Isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug 1;49(8):3492–4.
- Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4930–3.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1553–5.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005 Apr;18(2):306–25.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 Jan;35(1):147–51.
- Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Feb;41(2):99–109.
- Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of humanized carbapenem and ceftazidime regimens against Enterobacteriaceae producing OXA-48 carbapenemase in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Mar;58(3):1678–83.
- Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou M-FI, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the Novel KPC Variant KPC-5 and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):557–62.
- Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van CM, et al. Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1961–4.

- Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenemes from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 May;34(5):755–8.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151–61.
- Yu Y-S, Du X-X, Zhou Z-H, Chen Y-G, Li L-J. First Isolation of bla<sub>IMI-2</sub> in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr 1;50(4):1610–1.

# ANEXO 1: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

---

Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. Lett Appl Microbiol. 2014 Apr;58(4):325-9. doi: 10.1111/lam.12203

## ORIGINAL ARTICLE

## MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp.

Y. Hoyos-Mallecot<sup>1,2</sup>, J.J. Cabrera-Alvargonzalez<sup>1</sup>, C. Miranda-Casas<sup>1</sup>, M.D. Rojo-Martín<sup>1</sup>, C. Liebana-Martos<sup>1</sup> and J.M. Navarro-Marí<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

<sup>2</sup> Clinical Medicine and Public Health, Postgraduate programme, University of Granada, Granada, Spain

**Significance and Impact of the Study:** MALDI-TOF mass spectrometry is increasingly present in microbiology laboratories due to its increasing use for bacterial identification. This study describes a method for detection of carbapenemase activity using MALDI-TOF, which is similar to the reference method: the detection of imipenem hydrolysis using UV spectrometry.

### Keywords

antimicrobials, carbapenemases detection, epidemiology, resistance.

### Correspondence

Yannick Hoyos Mallecot, Department of Microbiology, University Hospital, Virgen de las Nieves, Avenida de las Fuerzas Armadas s/n, 18014 Granada, Spain.  
E-mail: yanhoma@me.com

2013/1773: received 29 August 2013, revised 28 October 2013 and accepted 7 November 2013

doi:10.1111/lam.12203

### Abstract

We have evaluated a matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method for the identification of carbapenemases and for distinguishing metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs). A total of 49 noncarbapenemase-producing and 14 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains, previously characterized by PCR, were included in the study. With MALDI-TOF MS, the presence of carbapenemases was confirmed by the detection of ertapenem hydrolysis (lost of molecular peaks: 476.5 Da, 498.5 Da, 520.5 Da and presence of degradation products) in the mixture of the bacteria with the antibiotic, and classification was achieved by selective inhibition of carbapenemase activity (the ertapenem molecular peak was maintained) with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). We obtained a good concordance among the results of PCR and MALDI-TOF MS. This method appears to be simple, fast and reliable for distinguishing in few hours different classes of carbapenemases, which can be very useful for epidemiological studies or to establish a specific antimicrobial therapy.

### Introduction

Gram-negative bacilli that are resistant to carbapenems due to carbapenemase production represent an emerging problem that limits available therapeutic options. Early detection of carbapenemase production is essential to administer appropriate treatment. Resistance to carbapenems can be determined on the phenotypic level with susceptibility tests; however, many carbapenemase producers do not confer resistance levels to carbapenems. Phenotypic methods for screening carbapenemase producers as modified Hodge test and techniques that use carbapenems in combination with different inhibitors (e.g. cloxacillin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or 3-aminophenyl

boronic acid (APB)) to differentiate among AmpC, metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) are available. The drawbacks of these phenotypic assays are a limited reliability and a delay in results of at least 18 h (Cohen Stuart and Leverstein-Van Hall 2010; Giske *et al.* 2011). Another approach to characterizing enzymatic mechanisms is to use molecular methods to detect specific DNA segments of these enzymes, which are faster (results in <4 h) and offer high sensitivity and specificity. However, their elevated specificity is also a drawback, because they only detect known enzymes; therefore, specific primers are required for each enzyme under study, increasing the complexity and cost of these techniques.

There have been recent reports of a method that examine  $\beta$ -lactamase activity using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to detect  $\beta$ -lactam ring hydrolysis (Burckhardt and Zimmermann 2011; Hrabák *et al.* 2011; Ledeboer and Hodinka 2011); the hydrolysis degradation product of the  $\beta$ -lactam antibiotic shows a molecular mass different from that of native molecule. Moreover, combination of the  $\beta$ -lactam antibiotic with clavulanic acid (CA) and APB inhibits the hydrolysis produced by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and KPC, respectively, permitting their identification (Sparbier *et al.* 2012). The goal of the present investigation was to apply this method that would also allow identification of MBLs from their inhibition with EDTA, for differentiating between metallo-beta-lactamases and other carbapenemases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp.

## Results and discussion

### Ertapenem hydrolysis assay

Spectra from the hydrolysis assay after incubation of *Escherichia coli* ATCC 25922 with ertapenem solution, at 4 h, showed the molecular peak of ertapenem  $[M + H]^+$  at 476.5 Da and peaks corresponding to adducts formed with one sodium,  $[M + Na]^+$ , at 498.5 Da and two sodium,  $[M + 2Na]^+$ , at 520.5 Da (Fig. 1a). Results of the hydrolysis assays of the carbapenem nonsusceptible strains, which do not produce carbapenemases ( $n = 49$ ), were analogous to those obtained with *E. coli* ATCC 25922.

Hydrolysis assay results for the carbapenemase-producing strains (10 VIM, 3 IMP, 1 KPC) showed no peak corresponding to the nonhydrolysed forms of ertapenem (476.5 Da, 498.5 Da, 520.5 Da). We also found peaks corresponding to the hydrolysed, decarboxylated form  $[M_{\text{hydr./decarb.}} + H]^+$  at 450.5 Da, the hydrolysed form  $[M_{\text{hydr.}} + H]^+$  at 494.5 Da and the hydrolysed sodium adduct  $[M_{\text{hydr./decarb.}} + Na]^+$  at 472.5 Da.; however, the last two were not always present (Fig. 1a).

Peak corresponding to the hydrolysed, decarboxylated form  $[M_{\text{hydr./decarb.}} + H]^+$  at 450.5 Da was present in both sensitive and resistant strains as previously described (Burckhardt and Zimmermann 2011; Lee *et al.* 2013). This finding suggests that ertapenem molecule may suffer a spontaneous degradation.

Therefore, as previously reported (Burckhardt and Zimmermann 2011; Sparbier *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013), carbapenem hydrolysis was considered positive if the ertapenem intact molecule mass peaks (476.5 m/z, its monosodium salt, 498.5 m/z and its disodium salt, 520.5 m/z) completely disappeared.

### EDTA Inhibition hydrolysis assay

Ethylenediaminetetraacetic acid inhibition assay results showed peaks for the nonhydrolysed forms of ertapenem (476.5 Da, 498.5 Da and 520.5 Da) in the IMP-, VIM-producing strains, but not in the KPC-producing strain (Fig. 1b).

Additionally, the *E. coli* ATCC 25922 (used as no carbapenemase producer control) showed the same peaks than the MBL strains (Fig. 1b).

A MBL-producing strain was defined as a strain with carbapenemases that maintains at least the molecular peak of ertapenem after inhibition with EDTA.

Based on these criteria, we obtained a good concordance among the results of PCR and MALDI-TOF MS (Table 1).

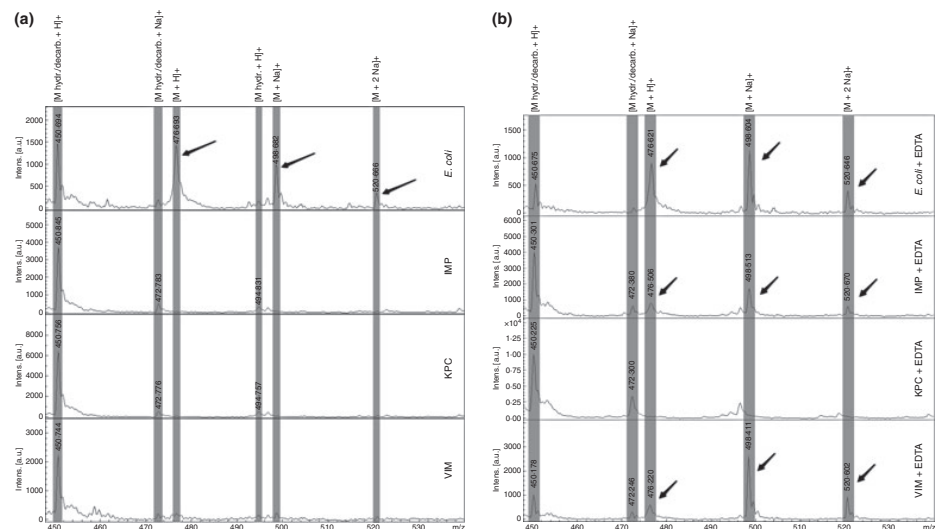
Our findings are in agreement with previous reports that techniques based on MALDI-TOF MS offer good reliability to detect carbapenemase-producing strains with respect to routine methods and have the advantage of greater speed, yielding results within two and 4 h (Burckhardt and Zimmermann 2011; Hrabák *et al.* 2011; Sparbier *et al.* 2012).

Other researchers have used various carbapenems and different incubation times in the hydrolysis assay. Sparbier *et al.* (2012) used imipenem, ertapenem and meropenem and 3 h of incubation time; Hrabák *et al.* (2011) used meropenem and the same incubation time; Burckhardt *et al.* used ertapenem and 1, 1.5 and 2.5 h of incubation. In our study, we used ertapenem because the peaks of meropenem are not clearly visible in a spectrum when HCCA matrix is employed.

A limitation of our study is the presence of only one KPC, due to its low prevalence in our region. However, our methodology shows that metal chelators such as EDTA would not affect this type of enzymes while KPC could be inhibited by APB as previously described (Sparbier *et al.* 2012).

From a clinical point of view, it is important to know quickly the presence of carbapenemases; however, identification of the type of carbapenemase involved is not so urgent and often is relegated to reference centres due to complexity of molecular methods and unreliability of the phenotypic assays. With this technique, simple and reliable results are achieved, and given the increasing use of MALDI-TOF MS in clinical microbiology makes this methodology an option in any laboratory routine.

In the near future, this approach may be useful for the early detection of mechanisms of resistance to different antibiotics, allowing a more rapid selection of the most effective treatment and complementing susceptibility testing methods. However, we think that there is a need to standardize protocols and validate methods based on



**Figure 1** Mass spectra of the ertapenem hydrolysis and inhibition assay. (a) MALDI-TOF MS spectra of ertapenem after hydrolysis assay with *E. coli* ATCC 25922 and carbapenemase-producing strains. (b) MALDI-TOF MS spectra of ertapenem after EDTA inhibition assay with *E. coli* ATCC 25922 and carbapenemase-producing strains. The most representative ertapenem's peaks are highlighted in grey. Peaks corresponding to non-hydrolyzed form of ertapenem are indicated with arrows. Units on the y axes represent relative intensity. 'IMP, KPC, VIM': carbapenemase-producing strains. 'EDTA': ethylenediaminetetraacetic acid (metallo- $\beta$ -lactamases inhibitor).

MALDI-TOF MS for clinical application in further studies with more strains and with different types and expression levels of enzymes.

## Materials and methods

### Bacterial isolates

Forty-nine noncarbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* ( $n = 29$ ) and *Ps. aeruginosa* ( $n = 20$ ), and 14 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [ $n = 6$  (2 IMP, 3 VIM and 1 KPC)] and *Ps. aeruginosa* [ $n = 8$  (7 VIM and 1 IMP)] were included in the study. Strains were clinical isolated from our laboratory collection (Table 1). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a carbapenemase-negative control strain.

### Identification and antimicrobial susceptibility

Species identification and antibiotic susceptibility testing were performed using the WIDER system (Francisco Soria Melguizo S.L. Madrid). MICs of carbapenems were confirmed using the E-test (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Results were interpreted according to the criteria

of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). All strains were resistant to at least one carbapenem.

### Genotypic confirmation

The presence of carbapenemases was established on the molecular level for all isolates, using multiplex real-time PCR assay for identification of metallo-beta-lactamase-encoding *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> (Mendes *et al.* 2007) and real-time PCR assay for detection of KPC genes (Cole *et al.* 2009).

### MALDI-TOF MS Ertapenem hydrolysis assay

For the carbapenem hydrolysis assay, the strains were grown for 18–24 h on Mueller-Hinton agar (Francisco Soria Melguizo. S.L. Madrid.), and a dense suspension of the organism was prepared in Eppendorf tubes with 50  $\mu$ L of a ertapenem solution 0.25 mg ml<sup>-1</sup> (Invanz, Merck Sharp & Dohme, NJ) diluted in reaction buffer: 20 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 7.0; Sigma-Aldrich (Hrabák *et al.* 2012). This suspension was incubated in agitation at 37°C for 4 h.



**Table 1** Summary of the ertapenem hydrolysis/inhibition assay data

| Strain type                                 | Bacterial species (no. of isolates tested) | Molecular assay | CLSI susceptibility interpretation (MIC) |                   |               | MALDI-TOF MS hydrolysis assay |       |                   |
|---|--|-----------------|--|-------------------|---------------|-------------------------------|-------|-------------------|
|   |  |                 | Meropenem                                | Ertapenem         | Imipenem      | ERT*                          | EDTA† | Result            |
| Noncarbapenemase-producing strains (n = 50) | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (n = 1) | ND              | S  | S                 | S             | –                             | –     | No Carbapenemases |
|   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 29)     | –               | I-R (4–>32)                              | ND                | I-R (4–>32)   | –                             | –     | No Carbapenemases |
|   | <i>Escherichia coli</i> (n = 2)            | –               | R ( $\geq$ 4)                            | I-R (1– $\geq$ 2) | S ( $\leq$ 1) | –                             | –     | No Carbapenemases |
|   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 3)       | –               | I-R (2– $\geq$ 4)                        | I-R (1– $\geq$ 2) | S ( $\leq$ 1) | –                             | –     | No Carbapenemases |
|   | <i>Enterobacter cloacae</i> (n = 15)       | –               | S ( $\leq$ 1)                            | I-R (1– $\geq$ 2) | I-R (2–4)     | –                             | –     | No Carbapenemases |
| Carbapenemase-producing strains (n = 14)    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 1)       | IMP             | R (>32)                                  | R (8)             | I (2)         | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Klebsiella oxytoca</i> (n = 1)          | IMP             | R (4)                                    | R (8)             | R (4)         | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 1)      | IMP             | R (>32)                                  | ND                | R (>32)       | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 1)       | VIM             | R (>32)                                  | R (>32)           | R (>32)       | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Enterobacter cloacae</i> (n = 2)        | VIM             | R (>32)                                  | R (16)            | R (>32)       | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 7)      | VIM             | R (8–>32)                                | ND                | R (>32)       | +                             | –     | MBL               |
|   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 1)       | KPC             | R (>32)                                  | R (>32)           | R (>32)       | +                             | +     | NO MBL            |

\*Ertapenem hydrolysis assay performing incubation with 50  $\mu$ L of ertapenem solution 0.25 mg ml<sup>-1</sup> (Invanz, Merck Sharp & Dohme, NJ) diluted in reaction buffer (20 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 7.0; Sigma-Aldrich).

†EDTA inhibition hydrolysis assay performing incubation with 50  $\mu$ L of ertapenem solution 0.25 mg ml<sup>-1</sup> supplemented with EDTA 50 mg ml<sup>-1</sup> (Merck).

The tubes were then centrifuged for 2 min at 12000  $\times$  g. Finally, 1  $\mu$ L of the supernatant was placed directly onto a MALDI-TOF target plate and dried at room temperature, subsequently adding 1  $\mu$ L of HCCA matrix solution (10 mg ml<sup>-1</sup> cyano-4-hydroxycinnamic acid) and drying.

#### MALDI-TOF MS EDTA Inhibition hydrolysis assay

The inhibition hydrolysis assay was performed using the same procedure described for ertapenem hydrolysis assay except that the ertapenem solution was supplemented with EDTA 50 mg ml<sup>-1</sup>.

#### MALDI-TOF MS measurements

Mass spectra were acquired with a Microflex LT mass spectrometer using FLEXCONTROL 3.3 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), following the protocol described by Sparbier *et al.* (2012). Spectra were recorded in the positive linear mode in the mass range of 100–1000 Da with 25–35% laser intensity; each spectrum was the sum of 240 laser shots.

For calibration, we used an external standard (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), consisting of bradykinin (1–5) and bradykinin (1–7). The HCCA peaks

[M + H]<sup>+</sup> at 190.05 Da and [2M + H]<sup>+</sup> at 379.02 Da, the bradykinin (1–5) peak [M + H]<sup>+</sup> at 573.31 Da and the bradykinin (1–7) peak [M + H]<sup>+</sup> at 757.40 Da were employed for calibration.

#### Data analysis

The FLEXANALYSIS 3.3 program (Bruker Daltonics GmbH) was used for the spectrum analysis. Peaks were detected using previously reported settings (Sparbier *et al.* 2012). Briefly, spectra were smoothed (algorithm, SavitzkyGolay; width, 0.2 m/z; cycles, 1) and baseline subtracted (algorithm, TopHat). Peaks were automatically selected with the following parameter settings: peak detection algorithm: centroid; signal-to-noise threshold, 2; relative intensity threshold, 0%; minimum intensity threshold, 100; peak width, 0.2 m/z; height, 80%; and were compared with the molecular masses of ertapenem [M + H]<sup>+</sup> at 476.5 and its salt [M + Na]<sup>+</sup> at 498.5 Da, with a tolerance of 0.5 m/z.

#### Conflict of interest

Authors have no conflict of interest to declare, financial or otherwise.

Y. Hoyos-Mallescot *et al.*MALDI-TOF MS, for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases

## References

- Burckhardt, I. and Zimmermann, S. (2011) Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* **49**, 3321–3324.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013) *M100\_S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 21st Informational Supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohen Stuart, J. and Leverstein-Van Hall, M.A. (2010) Dutch Working Party on the detection of highly resistant microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* **36**, 205–210.
- Cole, J.M., Schuetz, A.N., Hill, C.E. and Nolte, F.S. (2009) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol* **47**, 322–326.
- Giske, C.G., Gezelius, L., Samuelsen, Ø., Warner, M., Sundsfjord, A. and Woodford, N. (2011) A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* **17**, 552–556.
- Hrabák, J., Walková, R., Studentová, V., Chudáková, E. and Bergerová, T. (2011) Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **49**, 3222–3227.
- Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., Zemlicková, H., Jakubu, V., Chudáková, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y. *et al.* (2012) Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **50**, 2441–2443.
- Ledeboer, N.A. and Hodinka, R.L. (2011) Molecular detection of resistance determinants. *J Clin Microbiol* **49**, S20–S24.
- Lee, W., Chung, H.S., Lee, Y., Yong, D., Jeong, S.H., Lee, K. and Chong, Y. (2013) Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **77**, 227–230.
- Mendes, R.E., Kiyota, K.A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S.S., Gales, A.C., Pignatari, A.C. and Tufik, S. (2007) Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* **45**, 544–547.
- Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C. and Kostrzewa, M. (2012) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* **50**, 927–937.

## **ANEXO 2: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA**

---

**Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ramirez MD, Navarro-Marí JM. [Bacterial identification from blood cultures by a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry technique]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013 Mar;31(3):152-5. doi: 10.1016/j.eimc.2012.09.003**



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight

Yanick Hoyos-Mallecot, Consuelo Miranda-Casas, Jorge J. Cabrera-Alvargonzalez\*, Cristina Gómez-Camarasa, M. Dolores Pérez-Ramirez y José María Navarro-Marí

Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

*Historia del artículo:*  
Recibido el 27 de mayo de 2012  
Aceptado el 2 de septiembre de 2012  
On-line el 8 de diciembre de 2012

*Palabras clave:*  
Espectrometría de masas  
Matrix-assisted laser desorption-ionisation  
time-of-flight  
Identificación bacteriana  
Hemocultivo

*Keywords:*  
Mass spectrometry  
Matrix-assisted laser desorption-ionisation  
time-of-flight  
Bacteria identification  
Blood culture

### RESUMEN

**Introducción:** La espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) es una técnica rápida y fiable de identificación bacteriana.

**Métodos:** Se evalúa un método para identificación directa del hemocultivo fácil, rápido de realizar y de bajo coste.

**Resultados:** El porcentaje de identificaciones con puntos de corte de  $\geq 1,7$  y  $\geq 1,4$  para aceptable identificación de especie y género fue del 77,5 y del 93,8%, respectivamente.

**Conclusión:** El buen funcionamiento, la rapidez y el bajo coste hacen que esta técnica sea apropiada y fácil de implantar en los laboratorios de microbiología clínica.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Bacterial identification from blood cultures by a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry technique

#### ABSTRACT

**Introduction:** Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry is rapid and accurate for the bacterial identification.

**Methods:** We have evaluated a less laborious and less time consuming method for microorganism identification directly from positive blood cultures.

**Results:** When we considered the scores  $\geq 1.7$  and  $\geq 1.4$  for acceptable identification of species and genus, the percentage of identification was 77.5% and 93.9%, respectively.

**Conclusions:** This method is reliable, rapid and cost-effective for implementation in routine use in clinical microbiology laboratories.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Introducción

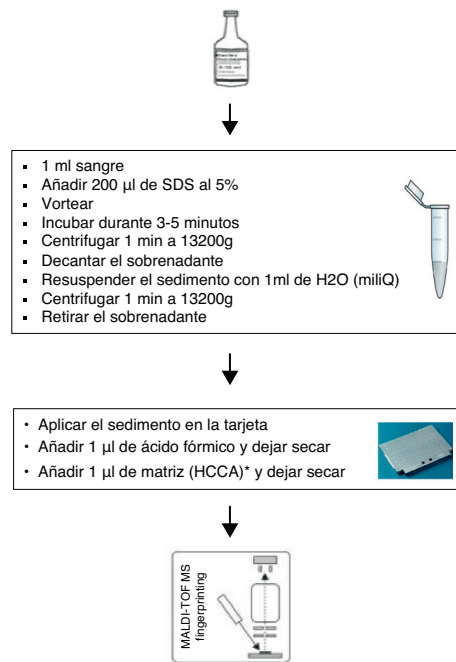
La espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) ha demostrado ser una técnica rápida y fiable para la identificación bacteriana en los laboratorios de microbiología clínica. Su realización directamente a partir de los hemocultivos positivos permite reducir considerablemente el tiempo de obtención del resultado respecto a los métodos

convencionales, ofreciendo la posibilidad de implementar un tratamiento antimicrobiano precoz más dirigido en los pacientes con sepsis.

Hasta la fecha se han publicado varios protocolos, algunos basados en diferentes centrifugaciones y lavados para eliminar los eritrocitos<sup>1</sup> y otros que utilizan tubos separadores de suero<sup>2</sup>, ambos seguidos de una extracción con ácido fórmico/acetónitrilo.

Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) ha comercializado un método, Sepsityper<sup>®</sup>, con el cual se han obtenido buenos resultados de identificación<sup>3</sup> pero que, al incluir también un paso de extracción, resulta laborioso cuando se utiliza en la rutina diaria del laboratorio de microbiología clínica.

\* Autor para correspondencia.  
Correo electrónico: xurxocabal@hotmail.com (J.J. Cabrera-Alvargonzalez).



**Figura 1.** Procedimiento esquematizado de MALDI-TOF directo de hemocultivo.  
\* HCCA: alfa-cyano-4-ácido hidroxicinámico.

En un estudio realizado con la base de datos de ANDROMAS<sup>4</sup> se ha descrito un método que permite reducir el coste y el tiempo utilizando saponina como agente lisante de eritrocitos. Más recientemente, Martiny et al.<sup>5</sup> han desarrollado un procedimiento parecido pero utilizando la base de datos de BRUKER (Biotyper), eliminando una de las 2 fases de lavado y sin ningún tipo de extracción, mostrando buenos resultados.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido evaluar los resultados de las identificaciones bacterianas obtenidas con MALDI-TOF directamente del hemocultivo, utilizando una modificación de la técnica de Martiny et al. que podría mejorar la tasa de identificaciones sin aumentar el tiempo de realización.

#### Métodos

Durante el periodo comprendido entre febrero y abril 2012, 100 hemocultivos (BACTEC Plus Aerobic/Anaerobic, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) positivos elegidos aleatoriamente se estudiaron con la técnica de MALDI-TOF y se compararon simultáneamente con los métodos convencionales utilizados en nuestro laboratorio: tinción de Gram, WIDER (Soria Melguizo, España), Vitek (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia) y MALDI-TOF de las colonias. La técnica de MALDI-TOF directamente del hemocultivo se realizó como la descrita por Martiny pero se añadió un procedimiento de extracción rápida con ácido fórmico<sup>6</sup> sobre la extensión de la muestra en la tarjeta y se utilizó como detergente dodecilsulfato sódico (SDS) en lugar de saponina (fig. 1).

Las muestras se analizaron en un microflex LT system, calibrado con Bruker Bacterial Test Standard. Para la identificación se sumaron hasta 240 disparos en modo automático, el espectro resultante

se importó al software MALDI BioTyper 3.0 y se comparó con la base de datos existente. El análisis se realizó siempre por duplicado y se retuvo el valor más alto de las 2 determinaciones. Los resultados de las identificaciones se clasificaron en diferentes franjas de valores y se caracterizaron utilizando 2 tipos de puntos de corte. Por una parte, los recomendados por los fabricantes, en donde  $\geq 2$  identifica como especie, entre 1,9 y 1,7 identifica como género y  $< 1,7$  no identifica. Por otra, los basados en la experiencia de otros autores<sup>2,7</sup> que consideran que puntos de corte más bajos (PCMB) como  $\geq 1,7$  y  $\geq 1,4$  son aceptables para especie y género, respectivamente, y  $< 1,4$ , «no identifica».

#### Resultados

De los 100 hemocultivos positivos, 2 fueron falsos positivos, los cuales, con valores  $< 1,4$ , se clasificaron por la técnica de MALDI-TOF como «no identifica» con ambos puntos de corte.

Los 98 restantes presentaron la siguiente distribución: 25 bacilos gramnegativos (BGN), 71 grampositivos (GP) y 2 levaduras. No hubo ningún hemocultivo polimicrobiano.

En la tabla 1 se reflejan los microorganismos aislados y la comparación de su identificación por los métodos convencionales usados en el laboratorio con la resultante del MALDI directo del hemocultivo con sus correspondientes valores.

A pesar de retener solo el microorganismo con el valor más alto de las 2 determinaciones, cabe destacar que coincidieron las identificaciones en todos los duplicados a excepción de 7 casos que correspondían a cepas con valor  $< 1,4$  y, por lo tanto, fueron considerados como «no identifica».

Utilizando los puntos de corte comerciales, se identificaron correctamente a nivel de género el 96% de los BGN y el 73,3% de los GP, a nivel de especie el 88% de los BGN y el 35,3% de los GP, y no se identificaron el 4% de los BGN y el 26,7% de los GP. Cuando se utilizaron los PCMB se obtuvo identificación correcta de género en el 100% de los BGN y en el 93% de los GP, identificación correcta de especie en el 96% de BGN y el 73,3% de GP, y el 7% de los GP no fueron identificados.

Dentro del grupo de los GP, la única identificación errónea fue un *Streptococcus mitis*, que se identificó como *Streptococcus pneumoniae*, un error bastante común debido a la gran semejanza de estas 2 especies<sup>8</sup> y que se produjo con los 2 tipos de punto de corte. En las últimas actualizaciones del software ya se advierte que la técnica no es capaz de diferenciar entre estas 2 especies, limitando la identificación a *S. pneumo/mitis*, por lo que más que un error debe considerarse una limitación de la técnica MALDI-TOF.

El único anaerobio aislado, *Clostridium baratii*, no fue identificado. Respecto a las levaduras, solo una pudo identificarse a nivel de género y cuando se utilizaron los PCMB.

El porcentaje total de identificaciones correctas usando los puntos de corte comerciales fue de 77,5% a nivel de género, 47,9% a nivel de especie y 22,5% no fueron identificados. Al utilizar los PCMB, las cifras fueron del 93,9, del 77,5 y del 6,1%, respectivamente.

#### Discusión

Nuestro protocolo, como el descrito por Martiny, es perfectamente adaptable a la rutina de trabajo en un laboratorio de microbiología clínica y proporciona un mayor porcentaje de identificaciones correctas que puede deberse al uso del método de extracción rápida con ácido fórmico. Saffert et al.<sup>9</sup>, combinando SDS y una extracción larga, obtienen resultados muy similares a los nuestros con una serie muy semejante.

La gran diferencia entre el porcentaje de identificaciones correctas entre BGN y GP es un hecho ya constatado en otras series<sup>1,5</sup>. En nuestro estudio se ha aislado un mayor porcentaje de GP y

**Tabla 1**

Comparación de la identificación bacteriana con los métodos convencionales y la técnica rápida de MALDI-TOF directa del hemocultivo

| Métodos convencionales                        | MALDI directo del hemocultivo                 | Franjas de valores |               |               |               |             |
|---|---|--------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|   |   | 3-2,3              | 2.299-2       | 1.999-1,7     | 1.699-1,4     | <1,4        |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 1)        | <i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 1)        | 1                  |               |               |               |             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3)         | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3)         |                    | 1             | 1             | 1             |             |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (n = 1)           | <i>Enterobacter cloacae</i> (n = 1)           | 1                  |               |               |               |             |
| <i>Escherichia coli</i> (n = 15)              | <i>Escherichia coli</i> (n = 15)              | 7                  | 8             |               |               |             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 5)          | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 5)          | 3                  | 1             | 1             |               |             |
| <b>Totales gramnegativos (n = 25)</b>         |   | 48%                | 40%           | 8%            | 4%            | 0%          |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 1)     | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (n = 1)     |                    | 1             |               |               |             |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 9)          | <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 9)          | 2                  | 5             | 2             |               |             |
| <i>Staphylococcus capitis-capitis</i> (n = 4) | <i>Staphylococcus capitis-capitis</i> (n = 4) |                    | 2             | 1             | 1             |             |
| <i>Staphylococcus hominis</i> (n = 11)        | <i>Staphylococcus hominis</i> (n = 11)        | 2                  | 4             | 4             | 1             |             |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 4)    | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n = 4)    |                    | 1             | 2             | 1             |             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 22)    | <i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 21)    |                    | 1             | 12            | 7             | 1           |
|   | <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 1)          |                    |               |               | 1             |             |
| <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> (n = 2)    | <i>Staphylococcus pettenkoferi</i> (n = 1)    |                    |               |               | 1             |             |
|   | <i>Starkeya novella</i> (n = 1)               |                    |               |               |               | 1           |
| <i>Staphylococcus cohnii</i> (n = 1)          | <i>Staphylococcus cohnii</i> (n = 1)          |                    |               | 1             |               |             |
| <i>Staphylococcus warneri</i> (n = 1)         | <i>Staphylococcus warneri</i> (n = 1)         |                    | 1             |               |               |             |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> (n = 1)       | <i>Staphylococcus pasteurii</i> (n = 1)       |                    |               | 1             |               |             |
| <i>Micrococcus luteus</i> (n = 1)             | <i>Micrococcus luteus</i> (n = 1)             |                    |               | 1             |               |             |
| <i>Enterococcus faecium</i> (n = 2)           | <i>Enterococcus faecium</i> (n = 2)           |                    | 2             |               |               |             |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (n = 5)          | <i>Enterococcus faecalis</i> (n = 5)          |                    | 3             | 2             |               |             |
| <i>Enterococcus durans</i> (n = 1)            | <i>Enterococcus durans</i> (n = 1)            |                    |               | 1             |               |             |
| <i>Streptococcus mitis/oralis</i> (n = 1)     | <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n = 1)       |                    | 1             |               |               |             |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> (n = 2)     | <i>Streptococcus thermophilus</i> (n = 1)     |                    |               |               | 1             |             |
|   | <i>Enterococcus faecium</i> (n = 1)           |                    |               |               |               | 1           |
| <i>Corynebacterium urealyticum</i> (n = 1)    | <i>Corynebacterium urealyticum</i> (n = 1)    |                    |               |               | 1             |             |
| <i>Corynebacterium freneyi</i> (n = 1)        | <i>Enterococcus faecium</i> (n = 1)           |                    |               |               |               | 1           |
| <i>Clostridium baratii</i> (n = 1)            | <i>Pseudomonas syringae</i> (n = 1)           |                    |               |               |               | 1           |
| <b>Totales grampositivos (n = 71)</b>         |   | 5,7%               | 29,6%         | 38%           | 19,7%         | 7%          |
| <i>Candida albicans</i> (n = 2)               | <i>Candida albicans</i> (n = 1)               |                    |               |               | 1             |             |
|   | <i>Filifactor villosus</i> (n = 1)            |                    |               |               |               | 1           |
| <b>Totales levaduras (n = 2)</b>              |   |                    |               | 50%           | 50%           |             |
| <b>Totales (n = 98)</b>                       |   | 16/98 (16,3%)      | 31/98 (31,6%) | 29/98 (26,6%) | 16/98 (16,4%) | 6/98 (6,1%) |

observamos que la baja tasa de identificación correcta, sobre todo a nivel de especie y con los puntos de corte establecidos por los comerciantes (35,3%), se debe principalmente a especies de estafilococos coagulasa negativos, que en muchos casos son considerados contaminantes pero que son aislados frecuentemente en hemocultivos. La mejora que resulta cuando aplicamos los PCMB (73,3%) podría ser mayor con la ampliación del número de espectros de cada especie incluida en la base de datos<sup>10</sup>.

Pensamos que la fiabilidad de las identificaciones con PCMB, ya demostrada por varios artículos, sugiere un reajuste de los puntos de corte. Nosotros también observamos en este estudio la buena concordancia de las identificaciones de MALDI-TOF y de los métodos convencionales cuando se aplican PCMB. Algunos autores consideran adecuado aplicar en estos casos criterios adicionales, como la necesidad de que coincidan las 3 primeras identificaciones de MALDI-TOF o que exista una diferencia significativa (generalmente 0,3) entre las primeras identificaciones coincidentes y la primera discrepante. En nuestro estudio, aunque solo hemos aplicado el criterio de PCMB, hemos observado que además en todos los casos en que se consideró aceptable identificación de género o aceptable identificación de especie, las 3 primeras identificaciones de MALDI-TOF coincidían en el género y en la especie, respectivamente. En 15 de los 16 microorganismos con valores en el intervalo de 1,7 a 1,4, la identificación con ambos métodos coincidía incluso también a nivel de especie, aunque 5 coincidían solo en la primera identificación proporcionada por MALDI-TOF.

Como limitación de nuestro trabajo tendríamos que destacar la casi ausencia de anaerobios (solo un aislado) o de levaduras (solo 2), que no nos permite sacar conclusiones. En ambos tipos de microorganismos se ha descrito su dificultad para ser identificados por la técnica de MALDI-TOF y se ha sugerido la necesidad de ampliar

la base de datos para ellos. Algunos autores mejoran sus resultados con las 2 modificaciones que aquí se realizan, la extracción rápida con ácido fórmico y PCMB similares a los aquí utilizados<sup>6</sup>.

Por último nos gustaría resaltar el bajo coste de este método, tanto en reactivos como en tiempo. La técnica para un hemocultivo se realiza en aproximadamente 20 min, pero si consideramos que en la rutina diaria se suelen trabajar varios hemocultivos a la vez, el tiempo por hemocultivo se vería aún más reducido.

Concluimos que los buenos resultados, unidos a la rapidez y al bajo coste de esta técnica, hacen de ella una medida apropiada y fácil de implantar dentro de los laboratorios de microbiología clínica.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Bibliografía

1. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:546-51.
2. Moussaoui W, Jaulhae B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1631-8.
3. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper<sup>TM</sup> and time of flight mass spectrometry. *PLoS one.* 2011;6:e23285.
4. Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux M-E, Beretti J-L, Lotz A, et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2011;27.

5. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 25.
6. Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaïd M, Boekhout T, de Baere T, Surmont I, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31: 841–8.
7. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1542–8.
8. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, Filimonova AV, Ilina EN, Dubovickaya VA, et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1709–15.
9. Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73:21–6.
10. Alatoom A, Cunningham S, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2868–73.

## **ANEXO 3: PUBLICACIÓN CIENTÍFICA**

---

**Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Gutiérrez-Fernández J, Navarro-Marí JM. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. J Microbiol Methods. 2014 Oct;105:98-101. doi:  
10.1016/j.mimet.2014.07.016**





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Note

## Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS

Y. Hoyos-Mallecot<sup>a,b</sup>, C. Riazco<sup>a,\*</sup>, C. Miranda-Casas<sup>a</sup>, M.D. Rojo-Martín<sup>a</sup>, J. Gutiérrez-Fernández<sup>a,b</sup>, J.M. Navarro-Marí<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain<sup>b</sup> Clinical Medicine and Public Health, Postgraduate programme, University of Granada, Granada, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 March 2014

Received in revised form 12 July 2014

Accepted 14 July 2014

Available online 23 July 2014

## Keywords:

MALDI-TOF

Carbapenemases

Blood culture

## ABSTRACT

MALDI-TOF MS has been evaluated to detect carbapenemases activity and pathogen identification directly from positive blood cultures. 21 non-carbapenemase producers and 19 carbapenemase producers Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* strains were included in the study. This technique is simple and detects carbapenemases in 4.5 h with high sensitivity and specificity.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

In the last decade we have observed a rapid increase of infections due to carbapenem resistant bacteria (Cantón et al., 2012), putting in danger our antibiotic options. Carbapenems resistance is often due either to the amount of processes like efflux pumps, porin loss and hyperproduction of enzymes, or to acquisition of genes encoding enzymes capable of hydrolysing carbapenems (carbapenemases) (Walsh et al., 2005).

The use of mass spectrometry for detection of carbapenemase activity seems to be generally accepted (Hrabák et al., 2013). Matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight (MALDI-TOF) equipment is increasingly used in microbiological laboratory (Clark et al., 2013) making this approach a rapid and easy way to detect carbapenemases. Early detection of these enzymes responds mainly to epidemiological studies, but for bacteremic patients, choosing an inappropriate antimicrobial therapy can considerably worsen their prognosis (Qureshi et al., 2012), justifying the need of an accurate and rapid test to detect carbapenemases producing strains directly from positive blood cultures.

The goal of the present investigation was to apply mass spectrometry directly from positive blood cultures in order to detect and identify carbapenemases carrying strains.

A panel of 20 non-carbapenemase producing Enterobacteriaceae (n = 10) and *P. aeruginosa* (n = 10), and 19 carbapenemase producing Enterobacteriaceae (n = 11, 3 IMP, 4 VIM, 1 KPC and 3 OXA 48) and *P. aeruginosa* (n = 8, 6 VIM and 2 IMP) clinical strains from our

laboratory collection were included in the study, all of them not sensitive to at least one carbapenem. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a carbapenemase negative control strain (Table 1). The presence of carbapenemases was established on the molecular level for bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>VIM</sub> and bla<sub>KPC</sub> genes, as previously described (Hoyos-Mallecot et al., 2014). Additionally, a PCR with specific primers for bla<sub>OXA-48</sub> (Poirel et al., 2011) was performed for all the isolates.

For each strain, BACTEC™ Plus Aerobic/F culture vials were inoculated with 10 mL of fresh sterile blood and supplemented with 1 mL suspension containing 10–100 CFU (colony-forming unit) of an 18–24 hour culture. The inoculum was prepared by doing serial dilutions of 0.5 McFarland (McFarland, 1907) in sterile H<sub>2</sub>O. Immediately after inoculation, the bottles were loaded into the BACTEC™ 9240 blood culture system (BD Diagnostic System, Sparks, MD) until positivity was detected (Positivity time: 9.89–19.43 h). The inoculum (CFU/mL) was always checked after positivity (Table 1).

Positive blood cultures were processed as follow (Fig. 1): 8 mL sample of positive broth was extracted and centrifuged at 600 g for 10 min in order to remove blood cells. The supernatant was collected and centrifuged at 14,000 g for 1 min, then the supernatant was removed and the pellet was washed twice using 1 mL of sterile water. Finally a last centrifugation at 13,200 g for 1 min was performed in a 1.5 mL tube in order to pellet bacteria. Once microorganisms were pelleted, carbapenem hydrolysis assay was performed as previously described (Hoyos-Mallecot et al., 2014); briefly we resuspended the pellet with 50 µL of a carbapenem solution 0.25 mg·mL<sup>-1</sup> (Invanz, Merck Sharp&Dohme, NJ, USA) diluted in reaction buffer: 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 7.0 (Sigma-Aldrich). This suspension was

\* Corresponding author at: Department of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain. Tel.: +34 958 020465.

E-mail address: [riazcoc@gmail.com](mailto:riazcoc@gmail.com) (C. Riazco).

**Table 1**  
Summary of the pathogen identification and ertapenem hydrolysis assay data performed directly from positive blood cultures.

| Bacterial species             | Molecular assay | CLSI susceptibility interpretation (MIC) |           |          | MALDI-TOF MS Pathogen identification (score) | MALDI-TOF MS Hydrolysis assay <sup>1</sup> | Cfu/mL 10 <sup>8</sup> |
|-------------------------------|-----------------|--|-----------|----------|--|--|------------------------|
|                               |                 | Meropenem                                | Ertapenem | Imipenem |  |  |                        |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC  | ND              | S  | S         | S        | <i>E. coli</i> (2191)                        | –  | 3                      |
| <i>Enterobacter asburiae</i>  | –               | ND                                       | S (≤0.5)  | I (2)    | <i>Enterobacter kobei</i> (1.73)             | –  | 2                      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>   | –               | ND                                       | S (≤0.5)  | I (2)    | <i>E. cloacae</i> (2.115)                    | –  | 2.5                    |
| <i>E. cloacae</i>             | –               | ND                                       | S (≤0.5)  | I (2)    | <i>E. cloacae</i> (2.287)                    | +  | 5                      |
| <i>E. cloacae</i>             | –               | ND                                       | R (2)     | S (≤1)   | <i>E. cloacae</i> (2.236)                    | –  | 8                      |
| <i>E. coli</i>                | –               | S (≤1)                                   | R (2)     | S (≤1)   | <i>E. coli</i> (2.299)                       | –  | 5                      |
| <i>E. coli</i>                | –               | S (≤1)                                   | I (1)     | S (≤1)   | <i>E. coli</i> (2.37)                        | +  | 5                      |
| <i>E. coli</i>                | –               | S (≤1)                                   | I (1)     | S (≤1)   | <i>E. coli</i> (2.348)                       | –  | 10                     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | –               | S (≤1)                                   | S (≤0.5)  | I (2)    | <i>K. pneumoniae</i> (2.286)                 | –  | 9                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | –               | S (≤1)                                   | R (2)     | S (≤1)   | <i>K. pneumoniae</i> (2.122)                 | –  | 7                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | –               | ND                                       | S (≤0.5)  | I (2)    | <i>K. pneumoniae</i> (2.129)                 | –  | 10                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | –               | R (8)                                    | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.161)                 | –  | 1.5                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (>8)                                   | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.148)                 | –  | 4                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (8)                                    | ND        | R (8)    | <i>P. aeruginosa</i> (2.01)                  | –  | 3                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (>8)                                   | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.271)                 | –  | 4                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | I (4)                                    | ND        | I (4)    | <i>P. aeruginosa</i> (2.34)                  | –  | 2                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (>8)                                   | ND        | I (4)    | <i>P. aeruginosa</i> (2.277)                 | –  | 2.5                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | I (4)                                    | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.08)                  | –  | 2                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (8)                                    | ND        | R (8)    | <i>P. aeruginosa</i> (2.06)                  | –  | 2.5                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (>8)                                   | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.328)                 | –  | 0.9                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | –               | R (8)                                    | ND        | R (8)    | <i>P. aeruginosa</i> (2.052)                 | –  | 1                      |
| <i>E. cloacae</i>             | IMP             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>E. kobei</i> (2.329)                      | +  | 6                      |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>     | IMP             | R (4)                                    | R (8)     | R (4)    | <i>K. oxytoca</i> (2.323)                    | +  | 5                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | IMP             | R (>32)                                  | R (8)     | I (2)    | <i>K. pneumoniae</i> (1.99)                  | +  | 3                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | IMP             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.115)                 | +  | 3                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | IMP             | R (8)                                    | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.22)                  | +  | 1.5                    |
| <i>E. cloacae</i>             | VIM             | I (2)                                    | R (4)     | I (2)    | <i>E. kobei</i> (2.239)                      | +  | 5                      |
| <i>E. cloacae</i>             | VIM             | R (>32)                                  | R (16)    | R (>32)  | <i>E. cloacae</i> (2.342)                    | +  | 5                      |
| <i>E. cloacae</i>             | VIM             | R (32)                                   | R (4)     | ND       | <i>E. kobei</i> (2.245)                      | +  | 10                     |
| <i>K. pneumoniae</i>          | VIM             | R (>32)                                  | R (>32)   | R (>32)  | <i>K. pneumoniae</i> (2.334)                 | +  | 5                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.352)                 | +  | 1.5                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.292)                 | +  | 6                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.355)                 | +  | 1                      |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (>32)                                  | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.3)                   | +  | 1.8                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (>32)                                  | ND        | R (>8)   | <i>P. aeruginosa</i> (2.2)                   | +  | 1.5                    |
| <i>P. aeruginosa</i>          | VIM             | R (8)                                    | ND        | R (>32)  | <i>P. aeruginosa</i> (2.289)                 | +  | 4                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | OXA-48          | I (2)                                    | ND        | R (>32)  | <i>K. pneumoniae</i> (2.212)                 | +  | 7                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | OXA-48          | S (1)                                    | ND        | R (4)    | <i>K. pneumoniae</i> (2.175)                 | +  | 4                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | OXA-48          | S (1)                                    | ND        | R (16)   | <i>K. pneumoniae</i> (2.159)                 | +  | 4                      |
| <i>K. pneumoniae</i>          | KPC             | R (>32)                                  | R (>32)   | R (>32)  | <i>K. pneumoniae</i> (2.106)                 | +  | 6                      |

<sup>1</sup> – Ertapenem hydrolysis assay performing incubation with 50 µL of ertapenem solution 0.25 mg·mL<sup>-1</sup> (Invanz, Merck Sharp&Dohme, NJ, USA) diluted in reaction buffer (20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 7.0; Sigma-Aldrich).

incubated in agitation at 37 °C for 4 h, (for *E. coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* KPC we also checked hydrolysis at 1 and 2 h). The tubes were then centrifuged for 2 min at 12,000 g. Finally 1 µL of the supernatant was placed directly onto a MALDI-TOF target plate and dried at room temperature, subsequently adding 1 µL of HCCA Matrix solution (10 mg mL<sup>-1</sup> cyano-4-hydroxycinnamic acid) and drying.

Mass spectra were acquired with a Microflex LT mass spectrometer using FlexControl 3.3 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany), following the protocol described by Sparbier et al (Sparbier et al., 2012). For spectrum analysis the FlexAnalysis 3.3 program (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) was used. Peaks were compared with the molecular masses of ertapenem ([M + H]<sup>+</sup> at 476.5 Da, [M + Na]<sup>+</sup> at 498.5 Da, [M + 2Na]<sup>+</sup> at 520.5 Da, and [M<sub>hydr./decarb.</sub> + H]<sup>+</sup> at 450.5 Da) with a tolerance of 0.5 m/z.

Carbapenemase producers were established using the following criteria: absence of all ertapenem intact peaks ([M + H]<sup>+</sup> at 476.5 Da, [M + Na]<sup>+</sup> at 498.5 Da and [M + 2Na]<sup>+</sup> at 520.5 Da) and presence of peak corresponding to hydrolysed, decarboxylated form [M<sub>hydr./decarb.</sub> + H]<sup>+</sup> at 450.5 Da, this peak has been described in both carbapenemase and non-carbapenemase producers when done directly from plated microorganisms (Burckhardt and Zimmermann, 2011; Lee et al., 2013). This peak in fact is not really useful for discrimination purpose, but its absence may reveal interferences between ertapenem and blood cells, so when the peak corresponding to [M<sub>hydr./decarb.</sub> + H]<sup>+</sup> at

450.5 Da disappeared, the assay was classified as invalid (Fig. 2). This problem was observed in 2 of the 40 strains (Table 1), however when the hydrolysis assay was repeated, both strains could be classified correctly. Using these criteria, we only found 2 discrepancies between PCR and this technique corresponding to one *Enterobacter cloacae* and one *E. coli*, which were classified wrongly as carbapenemase producers because of over expression of AMPc as previously described (Burckhardt and Zimmermann, 2011).

Identification was performed after hydrolysis assay through an in plate extraction (Hoyos-Mallecot et al., 2013) using the remaining pellet of the last centrifugation. FlexControl 3.3 and Maldityper 3.0 software (Bruker Daltonics) were used for the analysis. Identification of bacteria to species level was consistent with conventional identification for all the strains tested (Table 1) with the exception of *Enterobacter* sp., which species differentiation in the *cloacae* complex was nonconcordant as previously described (Risch et al., 2010).

Using MALDI-TOF MS for bacteria identification directly from blood cultures represents an advance in the treatment of septic patients (Clerc et al., 2013). Nevertheless, the prediction of resistance patterns in bacteria is not possible just with pathogen identification. For this purpose, MALDI-TOF has been evaluated recently for detecting resistance against 3rd generation cephalosporins and aminopenicillins in *Enterobacteriaceae* (Jung et al., 2014).

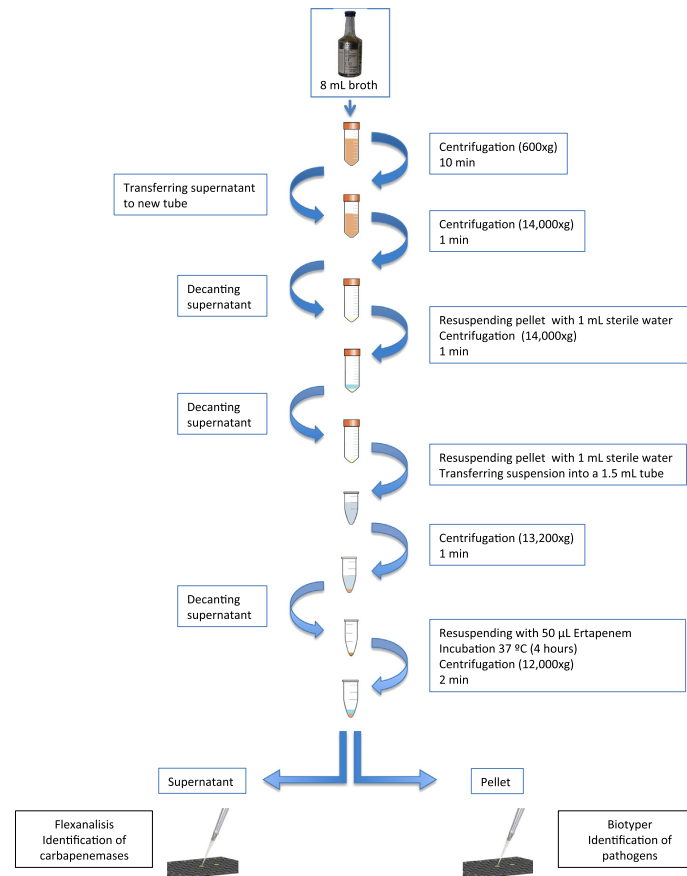


Fig. 1. Protocol for detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from spiked blood cultures using MALDI-TOF MS.

When considering bacteremia due to carbapenemase producers almost all  $\beta$ -lactams are not useful against these isolates. Therefore, having a short-term tool to predict the presence of carbapenemases would be very useful for an early and appropriated treatment. Both real-time PCR (Francis et al., 2012) and carba NP test (Dortet et al., 2013) have showed to be reliable techniques for rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures. Our protocol not only detected carbapenemase producing strains with excellent values of sensitivity (100%) and specificity (90%), but also identified the pathogen involved in bacteremia. Moreover, although we used a 4 h incubation time because it was suitable for our laboratory routine, this test can be performed even in less time as the process of pelleting microorganisms takes 20 min and the detection of hydrolysis could be as short as 1 h for KPC producing *K. pneumoniae* (data not shown), allowing carbapenemase detection and pathogen identification in a maximum of 4.5 h.

We conclude that this technique is simple, fast and reliable for detection of carbapenemases directly from positive blood cultures; however additional studies with more strains should be performed in order to confirm sensitivity and specificity.

## References

- Burckhardt, I., Zimmermann, S., 2011. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 h. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3321–3324.
- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P., European Network on Carbapenemases, 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 413–431.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., 2013. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 547–603.
- Clerc, O., Prod'homme, G., Vogne, C., Bizzini, A., Calandra, T., Greub, G., 2013. Impact of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 56, 1101–1107.
- Dortet, L., Brécard, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2013. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 4, 340–344.
- Francis, R.O., Wu, F., Della-Latta, P., Shi, J., Whittier, S., 2012. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in enterobacteriaceae directly from blood culture bottles by real-time PCR. *Am. J. Clin. Pathol.* 137, 627–632.
- Hoyos-Mallecot, Y., Cabrera-Alvargonzalez, J.J., Miranda-Casas, C., Rojo-Martín, M.D., Liebana-Martos, C., Navarro-Marí, J.M., 2014. MALDI-TOF MS, a useful instrument

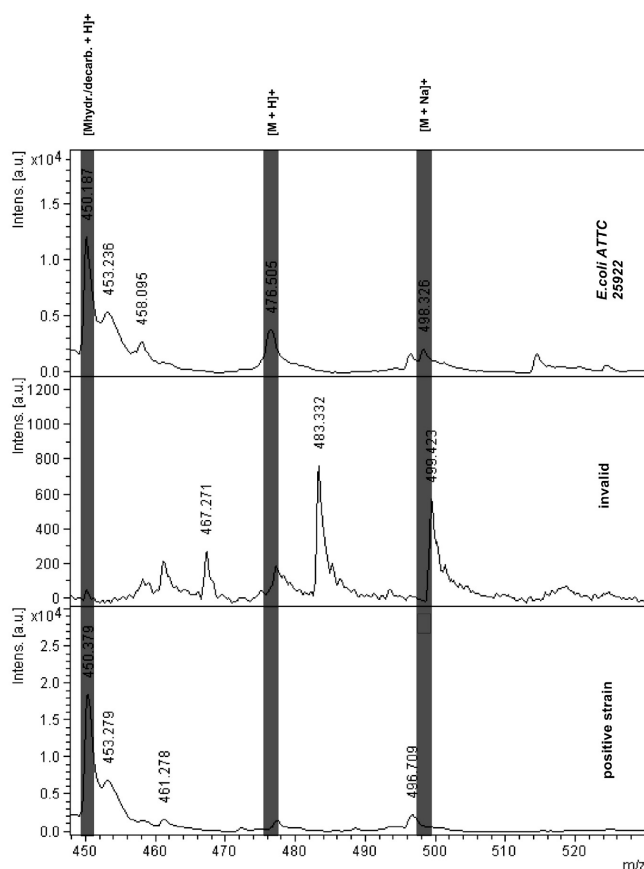


Fig. 2. Mass spectra of the ertapenem hydrolysis.

- for differentiating metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. Lett. Appl. Microbiol. 58 (4), 325–329.
- Hoyos-Mallecot, Y., Miranda-Casas, C., Cabrera-Alvargonzalez, J.J., Gómez-Camarasa, C., Pérez-Ramírez, M.D., Navarro-Marí, J.M., 2013. Bacterial identification from blood cultures by a rapid matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry technique. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 31, 152–155.
- Hrabák, J., Chudáková, E., Walková, R., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clin. Microbiol. Rev. 26, 103–114.
- Jung, J.S., Popp, C., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., 2014. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteriaceae derived from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 52 (3), 924–930.
- Lee, W., Chung, H.-S., Lee, Y., Yong, D., Jeong, S.H., Lee, K., Chong, Y., 2013. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 77 (3), 227–230.
- McFarland, J., 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index for vaccines. JAMA 49, 1176–1178.
- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 70, 119–123.
- Qureshi, Z.A., Paterson, D.L., Potoski, B.A., Kilayko, M.C., Sandovsky, G., Sordillo, E., Polsky, B., Adams-Haduch, J.M., Doi, Y., 2012. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 2108–2113.
- Risch, M., Radjenovic, D., Han, J.N., Wydler, M., Nydegger, U., Risch, L., 2010. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. Swiss Med. Wkly. 140.
- Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., Kostrzewa, M., 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. J. Clin. Microbiol. 50, 927–937.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. 18, 306–325.

## **ANEXO 4: RESUMEN (FRANCÉS)**

---

Les carbapenems (imipenem, meropenem,ertapenem et doripenem) sont les antibiotiques du groupe des bêta-lactamines qui ont le plus grand spectre d'activité en incluant un grand nombre de bacilles a Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, enterobacteries) Ces antibiotiques ont un usage restreint au milieu hospitalier et sont prescrits en général dans un contexte d'infections nosocomiales. Ils ont une excellente activité antibactérienne due à leur perméabilité élevée et à une grande stabilité face à la grande majorité des bêta-lactamases.

La résistance aux carbapenems se doit surtout à la perte des porines pour ces antibiotiques avec, en même temps la production d'une céphalosporinase ou d'une bêta-lactamase au spectre étendu (BLEEs); mais, dernièrement, un nouveau phénomène de résistance lié à la production de bêta-lactamases avec une extraordinaire activité face aux carbapenems est apparu: les carbapénémases.

Ces enzymes se divisent en trois classes selon la classification d'AMBLER:

- La classe **A**: Dont les représentants majeurs sont les enzymes de type SME, IMI, NMC, KPC et GES. Leur particularité réside dans le fait qu'elles sont inhibées in-vitro par l'acide boronique et par l'acide clavulanique, Elles hydrolysent toutes les bêta-lactamines.

- La classe **B**: Ce sont des métallo-bêta-lactamases de type IMP, VIM, NDM, SPM, GIM et SIM. Elles ont besoin de zinc dans leur site actif, ce qui explique leur inhibition par des agents chélatants de cations tels que l'acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) ou l'acide dipicolinique; cependant, elles ne sont pas affectées par les inhibiteurs suicides type clavulanique ou tazobactam. Elles hydrolysent toutes les bêta-lactamines à exception de l'aztreonam.
- La classe **C**: correspond aux enzymes de type oxacilinases du groupe OXA-48 like (OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247, etc.) Ces enzymes sont actives face aux carbapenems mais peu ou pas actives face aux céphalosporines de troisième génération même si elles sont en général toujours accompagnées d'une coproduction de BLEEs qui confère ainsi une multirésistance à la bactérie. Ce type d'enzymes n'est pas affecté non plus par les inhibiteurs suicides.

Trois facteurs expliquent l'alarme suscitée face à ce type de micro-organismes:

- Leur dissémination élevée par transfert au travers de plasmides. La comparaison avec l'évolution des souches productrices de CTX-M dans leur dernière décennie est inévitable, ce qui laisse supposer que, si nous n'employons pas les moyens nécessaires, nous trouverons bientôt ce type

de micro-organismes multirésistants pas uniquement dans le milieu hospitalier.

- L'extrême difficulté pour détecter ce type de mécanisme de résistance, parce qu'à l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir de méthode totalement fiable pour pouvoir écarter la présence d'une carbapénémase.
- La possibilité d'un échec thérapeutique en utilisant des carbapénems s'il y a une carbapénémase impliquée (même si la souche en question est sensible aux carbapénems in-vitro).

Traditionnellement, la détection des carbapénémases repose sur un premier screening basé sur l'analyse du phénotype de résistance obtenu à partir d'un antibiogramme classique. Postérieurement, on peut utiliser les propriétés d'inhibition de chaque groupe pour confirmer la présence d'un type déterminé de carbapénémase même si cela s'avère très compliqué et très laborieux car les méthodes décrites présentent des sensibilités et des spécificités très variables.

Pour finir, la confirmation finale doit se faire par des méthodes moléculaires dont le principal inconvénient est qu'elles détectent que des enzymes déjà connues et qu'en plus, elles sont en général seulement disponibles dans des centres de référence.



Il paraît évident que, tant au niveau épidémiologique qu'au niveau clinique, la mise au point de nouvelles méthodes de diagnostic rapide et fiable pour la détection des souches productrices de carbapénémases est nécessaire pour optimiser le traitement et limiter la diffusion de ce type d'enzymes.

Ces dix dernières années, les laboratoires de microbiologie clinique subissent une révolution; en effet, on est en train de vivre une substitution de la microbiologie classique au bénéfice de nouvelles techniques de diagnostic basées sur la génomique et plus récemment dans l'aire de la protéomique.

Une des caractéristiques de ces dernières est leur extrême fiabilité mais surtout, et, c'est ce qui les convertit en un outil fondamental, leur simplicité et leur court délai de réponse pouvant ainsi guider le praticien dans ses décisions jusqu'à 24 h. avant.

Parler de protéomique, c'est parler de spectrométrie de masses et, dans le champ de la microbiologie clinique, c'est synonyme de Matrix-Assisted Laser Desorption ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF). La spectrométrie de masse MALDI-TOF est un spectromètre avec une source d'ionisation en forme de laser assisté d'une matrice et d'un analyseur de temps de vol. La ionisation des molécules au moyen de cette technique est plus douce qu'avec d'autres types de spectromètres, ce qui permet d'analyser des molécules de taille supérieure peu volatiles et sensibles à la chaleur sans qu'elles se dégradent. C'est pourquoi, on l'utilise pour l'analyse

des molécules comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines ou les oligonucléotides. Il s'agit d'une méthode qui, au moyen de l'application de l'énergie laser à un échantillon imbibé dans une matrice, arrive à la vaporiser et à l'ioniser (et, éventuellement, il peut se produire un phénomène d'entraînement qui va ioniser à son tour une partie des protéines contenues dans l'échantillon). Ces protéines ionisées sont soumises à une accélération dans un champ électrique et à une migration à travers un tube à vide jusqu'à un détecteur. Le temps passé depuis sa vaporisation/ionisation jusqu'à sa détection dépendra du quotient masse/charge ( $m/z$ ) de cette protéine. Ce quotient  $m/z$  permettra de déterminer la masse exacte de la protéine de manière extrêmement fiable.

Dans le cas des micro-organismes on génère de cette façon un profil de protéines avec différents quotients  $m/z$  qui se comporte comme une empreinte digitale en permettant d'identifier avec une grande fiabilité le micro-organisme à partir dudit profil moyennant sa comparaison avec une base de données préalablement créée. C'est pour cette utilité que ces appareils ont été fabriqués dans le champ de la microbiologie clinique mais, s'agissant d'un spectromètre de masse, ses applications sont illimitées. C'est pourquoi, il n'est pas étonnant qu'on ait essayé d'utiliser ce type d'instruments à d'autres fins comme l'étude des relations entre les microorganismes avec l'analyse de leur profil protéique ou la détection de mécanismes de résistance toujours avec le même objectif de raccourcir le temps de réponse par rapport aux méthodes plus traditionnelles.

Dans le cas des carbapénémases, s'agissant d'un mécanisme enzymatique, ces enzymes vont provoquer l'inactivation des bêta-lactamines grâce à une hydrolyse de leur anneau central avec la conséquente incorporation d'une molécule d'eau qui entraîne une augmentation du poids moléculaire de ce composé d'environ 18 Da. Ce changement de masse peut se détecter moyennant MALDI-TOF MS de sorte que les souches non productrices de carbapénémases ne modifient pas le poids moléculaire du carbapénem.

Cette méthode, comparée aux méthodes de routine classique, proportionnerait une information beaucoup plus rapide parce qu'elle est basée sur une activité enzymatique et pas sur une croissance bactérienne qui nécessite des incubations d'au moins 18h.

En nous basant sur la possibilité de détecter indirectement l'hydrolyse enzymatique produite sur les anneaux bêta-lactamiques, notre objectif a été de mettre au point une méthodologie qu'on puisse appliquer à la détection des carbapénémases à partir de cultures bactériennes ou d'échantillons directs comme les hémocultures.

A cette fin, on a mis au point une technique à partir de cultures de 24h sur Agar Muller-Hinton. Une fois au point, cette technique a été validée moyennant une étude prospective pendant une période de 5 mois, en profitant ainsi pour évaluer l'incidence de ce type de micro-organismes dans notre milieu. En plus, on a utilisé

cette méthodologie pour détecter la présence de ce type de micro-organismes dans un échantillon clinique aussi remarquable que les hémocultures.

A propos de l'incidence des cèpes productrices de carbapenemases, cette dernière a été assez modérée en comparaison à ce qui a été décrit dans d'autres régions, même si, dans notre hôpital, on ne réalise pas de manière systématique des études de colonisation, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de souches productrices de carbapenemases trouvées.

A propos de la détection de carbapenemases moyennant MALDI-TOF, on peut arriver à la conclusion que c'est une technique facile et très fiable parce qu'elle a présenté une sensibilité et une spécificité de 100% pendant l'étude prospective. Son application pour la détection directement de l'hémoculture s'est révélée également excellente même si la faible incidence de ce type de micro-organismes, à l'heure actuelle, en fasse une technique non suggestive à inclure en routine.

## **ANEXO 5: CONCLUSIONES (FRANCÉS)**

---

1. La détection de carbapénemases par MALDI-TOF peut supposer une bonne alternative aux tests phénotypiques puisque ce test là est facile à réaliser, économique et fournit des résultats en quelques heures. Son emploi avec des différents types d'inhibiteurs permet la différenciation du genre de carbapénémase produite, ce qui peut résulter très utile en épidémiologie ou pour choisir un traitement plus spécifique. Cependant l'absence d'une interprétation automatisée à travers un logiciel limite l'emploi de cette technique en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique.
2. La validation prospective de cette méthodologie présente une concordance parfaite avec la technique de référence, confirmant ainsi l'excellente sensibilité et spécificité de celle-ci.
3. La présence de souches productrices de carbapénemases dans notre région, sur des prélèvements de patients infectées pendant la période étudiée, est relativement basse si on la compare avec les données fournies dans d'autres régions.
4. L'identification directe des bacilles à Gram négatif sur des flacons d'hémoculture positifs par MALDI-TOF, est une méthodologie totalement adaptable à la routine du laboratoire et permet de connaître l'espèce responsable d'une bactériémie avec 24 heures d'avance sans présenter de discordance avec l'identification phénotypique.

5. Tantôt la détection de carbapénemases comme l'identification des bacilles à Gram négatif directement sur des flacons d'hémocultures positifs sont totalement réalisables dans un même procès avec des résultats disponibles en quelques heures. Cependant la difficile interprétation des résultats additionnée à la rare présence de bactériémies produites par de souches productrices de carbapénemases fait que l'inclusion de cette technique en routine de nos jours ne sois pas tout a fait envisageable.