

Detección por el Sistema DIRAMIC cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* productoras de Betalactamasa de espectro extendido

Detection by the DIRAMIC system of strains of Escherichia coli and Klebsiella spp producing broad-spectrum Betalactamase

Angela Mariana Zayas Tamayo^a, Leonora González^b, Grether Barreras García^a.

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave 25 y 158. Playa, la Habana, Cuba.

^b Centro de Neurociencias de Cuba.

Recibido: 17 de abril de 2019;

Aceptado: 25 de noviembre de 2019;

RESUMEN

Los antimicrobianos betalactámicos se emplean habitualmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas. No obstante, el incremento de la resistencia antimicrobiana, ha limitado su empleo en pacientes con estos tratamientos. El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad del sistema DIRAMIC en la detección cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido y su comparación con el método fenotípico confirmatorio de doble difusión con discos (DDD). Se analizaron 97 cepas previamente caracterizados e identificadas como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp*, y se determinó la sensibilidad, especificidad y concordancia entre los resultados. Mediante el empleo del método de DDD se detectaron 41 (42,3%) aislados productores de BLEE, y 42 (43,3%) por sistema DIRAMIC-10, obteniéndose para el sistema DIRAMIC una sensibilidad de 92,7% y una especificidad 92,9% en comparación con el método de doble difusión con discos. Los valores de concordancia encontrados resultaron adecuados con una índice kappa 0.852, demostrando la capacidad del sistema para la detección de betalactamasas. Los resultados obtenidos en el estudio avalan la utilidad del sistema DIRAMIC como vía rápida, para alertar al médico acerca de la presencia de cepas productoras de BLEE, en la mejor adecuación de los tratamientos antimicrobianos y en la mejora de la calidad y la gestión de los resultados.

Palabras clave: Betalactamasas de espectro extendido; *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*; resistencia; sensibilidad.

ABSTRACT

Beta-lactam antimicrobials are commonly used in the treatment of infections caused by gram-negative bacteria. However, the increase in antimicrobial resistance has limited its use in patients with these treatments. The purpose of this work was to evaluate the capacity of the DIRAMIC system in the detection of strains producing extended-spectrum betalactamase and its comparison with the double-diffusion confirmatory phenotypic method with discs (DDD). 97 strains previously characterized and identified as *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* were analyzed, and the sensitivity, specificity and concordance between the results were determined. By using the DDD method, 41 (42.3%) ESBL-producing isolates were detected, and 42 (43.3%) by DIRAMIC-10 system, obtaining a sensitivity of 92.7% and a specificity for the DIRAMIC system 92.9% compared to the double diffusion method with discs. The concordance values found were adequate with a kappa index 0.852, demonstrating the ability of the system to detect betalactamasas. The results obtained in the study guarantee the usefulness of the DIRAMIC system as a fast route, to alert the doctor about the presence of ESBL-producing strains, in the best adaptation of antimicrobial treatments and in the improvement of the quality and management of results.

Keywords: Extended spectrum betalactamasas; *Escherichia coli*; *Klebsiella spp*; resistance; sensitivity.

INTRODUCCIÓN

La elevada resistencia antibiótica representa en la actualidad un gran desafío terapéutico, y constituye un serio problema en salud pública a nivel mundial, pues a pesar de disponer de un gran número de antimicrobianos, el surgimiento de resistencia a los mismos se mantiene constante en los microorganismos patógenos, siendo una de las principales causas el inadecuado uso empírico de los antibióticos de amplio espectro (De La Rosa *et al.*, 2018).

La producción de β -lactamasas es el mecanismo de resistencia antibiótica más frecuente e importante en microorganismos Gram negativos. Existe una amplia variedad de enzimas β -lactamasas, algunas son de espectro reducido como las penicilinasas y cefalosporinasas, otras poseen un espectro ampliado, y son capaces de inactivar a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos incluyendo a monobactámicos, pero no a cefamicinas ni carbapenémicos (Padmini *et al.*, 2017).

Este último grupo de enzimas se conoce como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y derivaron de las β -lactamasas de espectro reducido a partir de una serie de mutaciones puntuales, que alteraron su centro activo permitiéndoles modificar su perfil de sustrato y mejorar su capacidad de hidrólisis frente a los β -lactámicos (Peroso *et al.*, 2017).

Actualmente las BLEE comprenden uno de los mecanismos de resistencia más frecuentemente encontrados en los microorganismos patógenos y son reportadas en elevado porcentaje en varios países (Castro *et al.*, 2014; Mazzario *et al.*, 2017). La importancia que implica la presencia de este mecanismo en aislados clínicos de enterobacterias se debe principalmente a la dificultad que representa el tratamiento antibiótico, ya que además de resistir al efecto de los β -lactámicos estos microorganismos tienden a ser resistentes a otros antibióticos como aminoglucósidos o fluoroquinolonas llevando con frecuencia a fallas terapéuticas que pueden ser fatales (Shaikh *et al.*, 2015).

CLSI 2017 ha normalizado procedimientos técnicos, entre los que se encuentra los discos combinados y la concentración mínima inhibitoria (CMI) para detectar y confirmar la presencia de BLEE en aislados de bacterias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* (Muthupandian *et al.*, 2018). Paralelamente a través de diferentes estudios han sido avalados otros métodos para estos fines como Doble Difusión en Disco (DDD), tiras de E-test y algunos sistemas automatizados como Vitek y Phoenix (Thomson *et al.*, 2007), desarrollados para dar respuesta al gran volumen de muestras que se procesan en los laboratorios.

Por lo que, debido a este aumento de muestras en los centros de asistencia médica se hizo necesario la implementación de sistemas automatizados y otros métodos rápidos, que permitan un reconocimiento de la presencia de estos mecanismos de resistencia, e iniciar un plan racional para el control de las infecciones que pudieran producirse.

El sistema DIRAMIC-10 permite diagnosticar la infección urinaria por *Escherichia coli* directamente a partir de una muestra de orina y determinar la sensibilidad antimicrobiana en 4 horas. Al sistema DIRAMIC-10 se le reconoce como uno de los productos autóctonos de la biotecnología en Cuba (Contreras *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005). Por lo anterior, fue de interés en el laboratorio de microbiología del Centro Nacional de Investigaciones Científicas demostrar la capacidad que tiene el sistema DIRAMIC en la detección cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido.

Se analizaron 97 cepas aisladas de diferentes tipos de muestras de pacientes con infección asociada a la asistencia sanitaria durante un período de un año procedentes de dos hospitales de la provincia La Habana, se les realizaron la prueba de DDD y se comparó con DIRAMIC-10.

Se calculó del porcentaje (medida de coincidencia entre los métodos), la sensibilidad (capacidad del equipo para detectar a los aislados productores de BLEE) y especificidad (capacidad del equipo para detectar a los no productores de BLEE); así como, los valores predictivos positivo (probabilidad de que un resultado positivo indique la presencia de BLEE) y negativo (probabilidad de que un resultado negativo indique la ausencia de BLEE)

Determinación de las BLEE

Mediante el empleo del método de DDD se detectaron 41 (42,3%) aislados productores de BLEE, y 42 (43,3%) por sistema DIRAMIC-10. En cuanto a las muestras negativas, por DDD se obtuvieron 56 aislados para un 57,7 % y con el sistema DIRAMIC-10 se detectaron 55 muestras lo que representa el 56.7% del total de muestras analizadas. Esto demuestra que tanto en la detección de aislados productores de BLEE como de muestras negativas ambos métodos tienen una alta coincidencia (Tabla I).

Evaluación del DIRAMIC-10 en la detección de BLEE

En el DIRAMIC-10, se observaron tres resultados negativos que resultaron positivos por DDD, y cuatro resultados positivos por DIRAMIC-10 que fueron negativos por DDD (Tabla II). La discrepancia que se observa en los resultados obtenidos, puede explicarse teniendo en cuenta que: los aislados de *E. coli* que fueron negativos por DIRAMIC-10 y positivos por DDD se comportaron como "medianamente susceptibles" para cefotaxima (CTX) y "sensibles" para la combinación cefotaxima+ ácido clavulánico (CTX+AC) resultado que pudo interpretarse interpretó como negativo según los criterios establecidos para el sistema DIRAMIC-10 en estas determinaciones.

Según lo establecido por la normativa del CLSI, la combinación simultánea de varias cefalosporinas aumenta la sensibilidad de detección de cualquier sistema, lo que significa de que un número importante de cepas productoras de BLEE, se puedan identificar por la presencia de varias cefalosporinas, ratifica, el incremento de la sensibilidad de detección cuando se conjugan varios de estos compuestos, y que la expresión enzimática puede variar en correspondencia con el sustrato utilizado y el método empleado, tal y como se observó en el presente trabajo, aspecto éste que fuera señalado antes por otros autores (Castro *et al.*, 2014).

Los resultados de sensibilidad y la especificidad del sistema DIRAMIC-10, en comparación con los reportes de los métodos empleados usualmente en la práctica clínica, pueden considerarse satisfactorios, ya que al confrontarlos con los métodos Phoenix, VITEK® y MicroScan para la detección de BLEE, se encontró una sensibilidad del 99, 86 y 84 % respectivamente para dichos sistemas automatizados (Wiegand *et al.*, 2007), lo que coincide con los niveles de sensibilidad alcanzados por el sistema DIRAMIC-10 que es 92,7% (Tabla III).

Tabla. I Detección de las BLEE en los aislamientos clínicos por los métodos DDD, y el DIRAMIC-10.

Aislamiento/métodos	DDD	DIRAMIC-10
Positivas	41 (42,3)	42 (43,3)
Negativas	56 (57,7)	55 (56,7)

DDD: doble difusión de disco; DIRAMIC: Diagnóstico rápido microbiológico ND: no determinable.

Tabla. II Resultados discrepantes obtenidos con el DIRAMIC-10 en comparación con la DDD.

Identificación del aislado	Microrganismos	DDD	DIRAMIC-10
78-M-2	<i>Escherichia coli</i>	+	-
623	<i>Escherichia coli</i>	+	-
434-U (a)	<i>Escherichia coli</i>	+	-
879-U	<i>Escherichia coli</i>	-	+
845-M	<i>Escherichia coli</i>	-	-
844-M	<i>Escherichia coli</i>	-	-
1100	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-
36-TH	<i>Klebsiella ozaenae</i>	-	-
591-U1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
1-V	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
100-M	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+

+ positivo; - negativo. (a): Cepa para la que se obtuvo por DIRAMIC un resultado "intermedio" para cefotaxima (valor de inhibición entre 60-80%) y "sensible" (más de 80%) para la combinación cefotaxima / ácido clavulánico.

Tabla III. Comparación de los resultados obtenidos por DIRAMIC-10 con el DDD.

Método	DDD			Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	k	p**
	Positivo	Negativo	Total				
Positivo	38	4	42	92,7	92,9	0,852	<0,001
Negativo	3	52	55				
TOTAL	41	56	97				

K: Índice de concordancia (Kappa de Cohen); **: significativo $p < 0,05$

CONCLUSIONES

Con este estudio el sistema DIRAMIC 10 es posible disponer en 4 horas de los resultados del antibiograma a partir de cultivo de diferentes tipo de muestras clínicas y la rapidez de este reporte permite el establecimiento en menor tiempo de un tratamiento con el antibiótico más efectivo ventaja que se fortalece con su potencial para detectar, interpretar y corregir racional y adecuadamente este mecanismo de resistencia y en el conocimiento de la epidemiología de la resistencia, en la mejor adecuación de los tratamientos antimicrobianos y en la mejora de la calidad y la gestión de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- De La Rosa, R., Y Enciso., M Mazón., R Lugo., D Valencia., M Arenas y M Ballesteros (2018): Resistencia a β lactámicos por β -lactamasas en enterobacterias aisladas de infección urinaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. ISSN 2334-2501. www.reibci.org.
- Castro, N., J. F. Salgado., R. L. Ocampo., J. Silva y M. Ruiz (2014): Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido producidas por *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad de Chilpancingo, Guerrero, México. *Tlamati*, 5(1), 14-23.
- Contreras, O.R., G. Roura G., F. Novo., S. Hernández., N. Ramírez., I. Ramírez., F. Travieso., A. Zayas and Ch. Romay (2003) WO9847999A1: Equipment, kit and method for microbiological diagnosis.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 2017.

- Álvarez, E., R. Contreras y A. B. Álvarez (2005): Resistencia microbiana en la red nacional cubana de laboratorios con equipos DIRAMIC durante los años 2002 al 2004. *Rev. CENIC. Cienc. Biol.* 36, No. Especial.
- Mazzario A. I., Bazaj A., Cornaglia G (2017): Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy.*, vol. 29, no. S1.
- Muthupandian, S., B Ramachandran., H Barabadi (2018): The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing enterobacteriaceae in Africa. *Microbial Pathogenesis* 114: 180–192.
- Padmini N., Kennedy A. A., | Sivakumar N., Selvakuma G (2017): Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. *J Basic Microbiol.* 9999:1–11.
- Perozo L., M. Castellano., E Ling., D Nuñez , M Ginestre., J Villasmil., J Bermúdez (2017): “Detección de Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacteriaceae en un Centro de Salud de Maracaibo, Venezuela,” *Kasmera*, vol. 45, no. 2, pp. 88–99.
- Shaikh, S., J. Fatima., S. Shakil., S. M. D. Rizvi., and M. A. Kamal (2015): “Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 90–101.
- Thomson K., N. Cornish., S. Hong., K. Hemrick., C. Herdt y E. Moland (2007): Comparison of Phoenix and Vitek 2 ESBL Detection Tests Against *E. coli* and *Klebsiella* Isolates with Well-characterized β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00776-07
- Wiegand, I., H. K. Geiss., D. Mack, E. Stürenburg and H. Seifert (2007): Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *J. Clin. Microbio.* 45(4):1167-1174.