

Diagnóstico microbiológico, pasado, presente y futuro.

Elsa de la Cadena.¹

¹Bacterióloga y Laboratorista Clínica.M.Sc. en Ciencias Biomédicas Grupo de Investigación en Resistencia Antimicrobiana y Epidemiología Hospitalaria Universidad El Bosque. Bogotá, Colombia.

Memorias en presentación de PowerPoint.

Diagnostico Microbiológico: pasado, presente y futuro.



Elsa De La Cadena Vivas, M.Sc

Grupo RAEH

Universidad El Bosque

Enterobacterales / P. aeruginosa

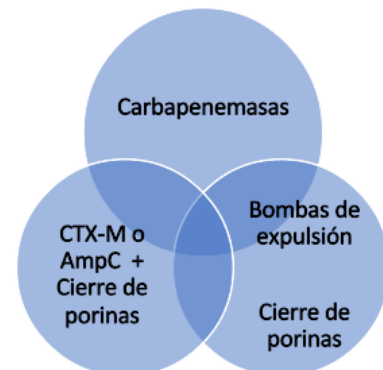


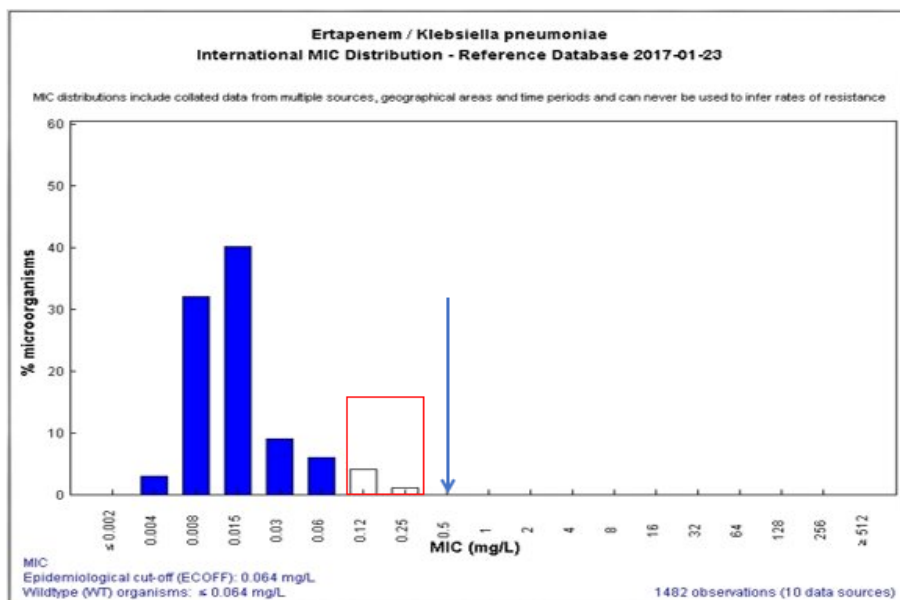
Identificar mecanismos de resistencia:

Carbapenemasas

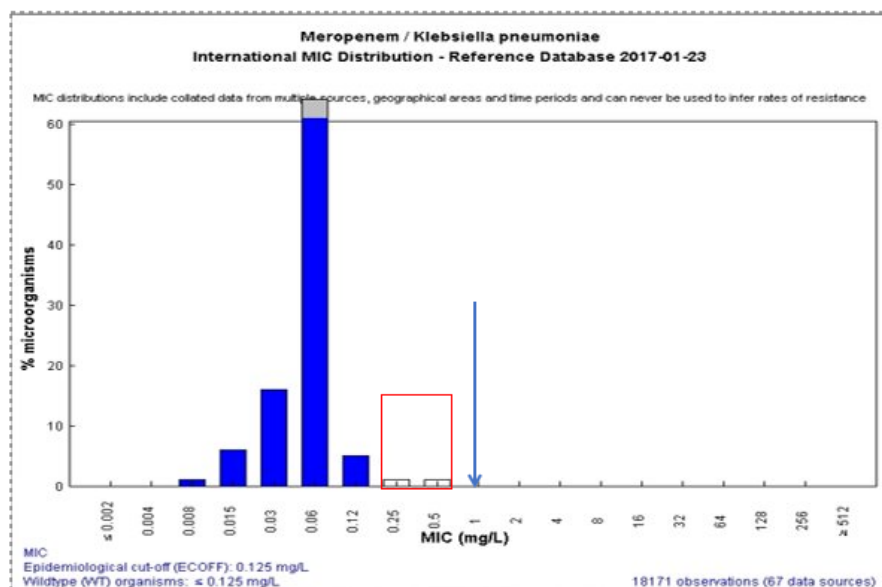
- Control de infecciones
- Epidemiología

ANTIBIOTICOS	MIC	I
Ampicilina	≥ 32	R
Ampicilina sulbactam	≥ 32	R
Aztreonam	> 64	R
Cefepime	32	R
Cefoxitina	> 64	R
Ceftazidima	> 64	R
Ceftriaxona	> 64	R
Ertapenem	> 16	R
Imipenem	4	R
Meropenem	1	S





<http://www.eucast.org/>



<http://www.eucast.org/>

QUE BUSCAR



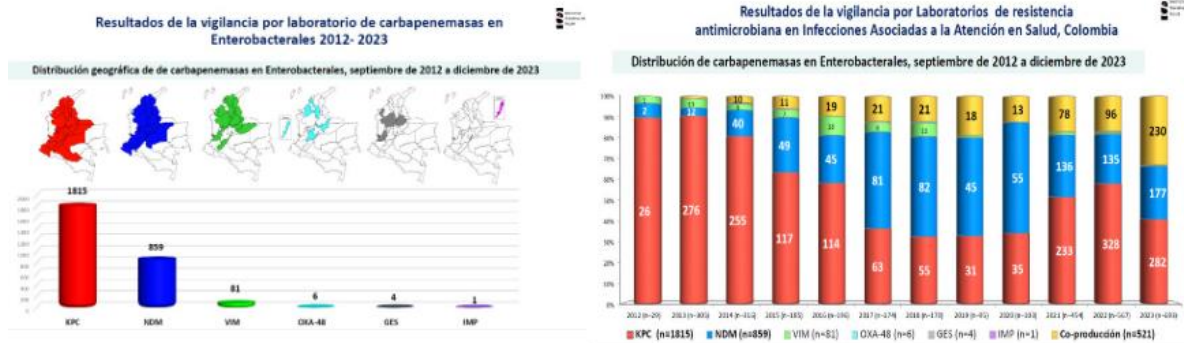
Enterobacterales: KPC – NDM
VIM – OXA-48 - IMP

P. aeruginosa: VIM – KPC

A. baumannii: OXA-23 - NDM

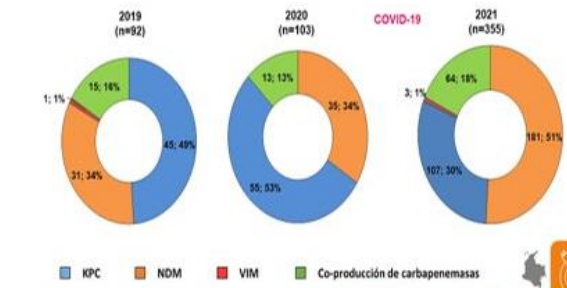
Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:1957–60.
Journal of Global Antimicrobial Resistance 6 (2016) 67–68
Antimicrobial Agents And Chemotherapy, May 2011, p. 2428–2430

Epidemiology of carbapenemases in Colombia 2013-2023



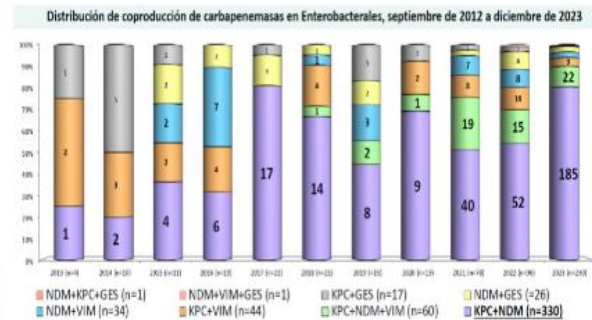
Data courtesy of: Grupo Microbiología, SLNR-DRSP Instituto Nacional de Salud (INS) -

Comparative analysis pre & post covid-19 pandemic



Epidemiology of carbapenemases co-production in Colombia 2013-2023

Resultados de la vigilancia por Laboratorios de resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Colombia



ta courtesy of: Grupo Microbiología, SLNR-DRSP Instituto Nacional de Salud (INS)

Métodos de tamizaje

Métodos de tamizaje no moleculares

- Medios cromogenicos
- Métodos basados en la inhibición del carbapenémico utilizando inhibidores específicos
- Métodos basados en la hidrólisis del carbapenémico

MEDIOS CROMOGENICOS PARA CARBAPENEMASAS

- ID 18 – 24 Horas
- Específicamente para identificar portadores asintomáticos (pacientes con factores de riesgo)
- Útil para la prevención y el control de infecciones

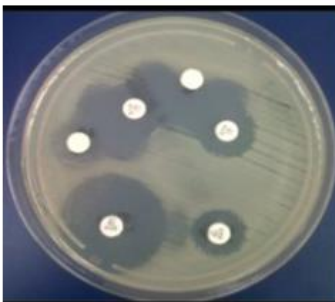
Desventajas

- Fecha de caducidad corta
- Difícil de interpretar en ocasiones
- Falsos positivos



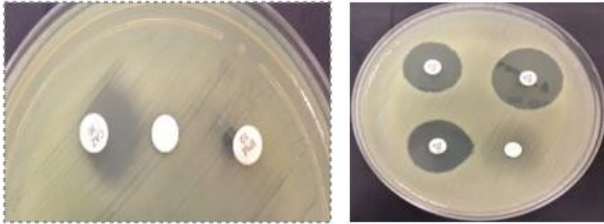
METODOS DE INHIBICIÓN

Se basa en la capacidad de algunos compuestos de inhibir específicamente algunas carbapenemasas



CLASE	CARBAPENEMASAS REPRESENTATIVAS	INHIBIDOR
A	KPC, GES, etc..	Acido boronico
B	NDM, VIM, IMP, SPM, etc..	EDTA, DPA
C	CMY-10	Cloxacilina, Acido boronico
D	OXA-48, etc..	No disponible

ACIDO BORONICO (AB) Y EDTA



Desventajas:

- AFB: Falsos positivos con hiperproducción de AmpC.
- No detecta OXAs
- Problemas con coproducciones

Sinergia:

- Hay que ajustar las distancias.

Ventajas:

- Rápido y fácil de realizar
- Bajo costo
- Identifica KPC y MBL

Doble disco:

Fácil de interpretar.

Resultado positivo ≥ 5 mm

Sinergia:

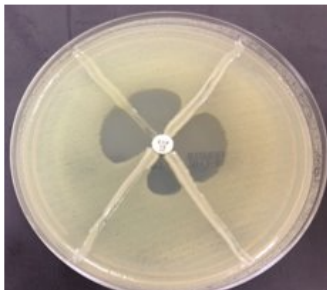
Disponible comercialmente

* Sensibilidad: 90 -100 %

* Especificidad: 96 – 100%

Pournaras S. J Antimicrob Chemother 2010;65:1319-21.

TEST DE HODGE MODIFICADO (THM)



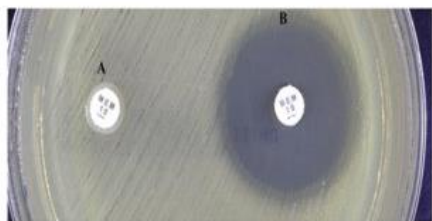
Ventajas:

- Rápido y fácil de realizar
- Bajo costo
- Sensibilidad y especificidad de $> 90\%$ en *Klebsiella* y KPC.

Desventajas:

- Sensibilidad y especificidad mas baja para otras Enterobacterias y otras enzimas (MBL $< 50\%$).
- Falsos positivos (CTX-M o AmpC + cierre de porinas).
- No reconoce el tipo de carbapenemasa

METODO DE INHIBICION DE CARBAPENEMASAS MODIFICADO (mCIM)



Ventajas:

- Alta sensibilidad y especificidad
- Fácil y barato
- Detecta doble mecanismo

Desventajas:

- No identifica clase de enzima

INTERPRETACIÓN:

NEGATIVO ≥ 19 mm

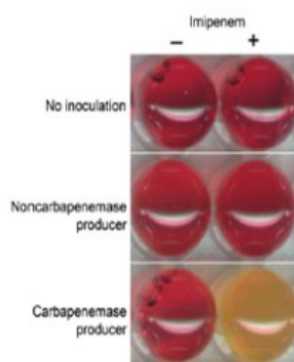
POSITIVO: 6 – 15 mm

INDETERMINADO: 16-18 mm



CLSI M100

CARBA NP



Ventajas:

- Rápido (3 horas)
- Alta sensibilidad y especificidad
- Detecta doble mecanismo

Desventajas:

- Difícil preparar reactivos
- No identifica clase de enzima

Limitaciones:

No sirve para muestras mucosas

* Sensibilidad: 100 %

* Especificidad: 90 – 100%

Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(12):6437.

**A Comparison of Eleven Phenotypic Assays for the Accurate Detection of
Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae***

Pranita D. Tamma¹, Belita N.A. Opene², Andrew Gluck², Krizia K. Chambers², Karen C. Carroll²,
& Patricia J. Simner^{2*}

Table 1: Accuracy of 11 phenotypic assays for carbapenemase detection using 191 retrospective *Enterobacteriaceae* isolates

	RAPIDE C® CARBA NP	Neo- Rapid Carb Screen ®	Rapid CARB Blue Screen ®	Manual Carba NP CLSI [†]	Manual Blue Carba	Modified Carba NP	Boronic Acid Synergy Test [†]	Metallo-β- lactamase Etest [†]	Modified Hodge Test	Carbapenem Inactivation Method	Modified Carbapenem Inactivation Method
Sensitivity (95% Confidence interval)											
KPC (n=43)	100% (90-100)	91% (77-97)	84% (69-93)	84% (69-93)	98% (86-100)	100% (90-100)	72% (56-84)	--	98% (86-100)	91% (77-97)	98% (86-100)
SME (n=8)	88% (47-99)	100% (60-100)	100% (60-100)	100% (60-100)	100% (60-100)	100% (60-100)	--	--	100% (60-100)	100% (60-100)	100% (60-100)
IMI (n=2)	100% (20-100)	100% (20-100)	100% (20-100)	100% (20-100)	100% (20-100)	100% (20-100)	--	--	100% (20-100)	100% (20-100)	100% (20-100)
NDM (n=36)	100% (88-100)	94% (80-99)	97% (84-100)	92% (76-98)	97% (84-100)	97% (84-100)	--	86% (70-95)	86% (70-95)	92% (76-98)	100% (88-100)
VIM (n=11)	100% (68-100)	91% (57-100)	100% (68-100)	100% (68-100)	100% (68-100)	100% (68-100)	--	91% (57-99)	100% (68-100)	100% (68-100)	100% (68-100)
IMP (n=6)	100% (52-100)	100% (52-100)	100% (52-100)	100% (52-100)	100% (52-100)	100% (52-100)	--	17% (9-64)	100% (52-100)	83% (36-99)	83% (36-99)
OXA-48-type (n=15)	93% (66-100)	60% (33-83)	67% (39-87)	40% (17-67)	100% (75-100)	100% (75-100)	--	--	100% (75-100)	80% (51-95)	100% (75-100)
All CPE [†] (n=122)	98% (94-100)	89% (82-94)	89% (82-94)	84% (76-90)	98% (94-100)	99% (95-100)	--	79% (66-89)	95% (89-98)	91% (84-95)	98% (94-100)
Specificity (95% Confidence interval)											
Non-CP (n=69)	99% (91-100)	99% (91-100)	100% (93-100)	100% (93-100)	96% (87-99)	100% (93-100)	88% [*] (81-92)	98% [*] (93-99)	91% (81-96)	99% (91-100)	99% (91-100)

J Clin Microbiol. 2017 Apr;55(4):1046-1055

Pruebas de Flujo Lateral



		PCR		
		Positivo	Negativo	total
IG-Test CARBA 5	Positivo	70	0	70
	Negativo	0	45	45
	Total	70	45	115
Sensibilidad	100%	CI 95% = 93.5 - 100%		
Especificidad	100%	CI 95% = 90.4 - 100%		

Saito K, et al. J Med Microbiol. 2022 Jun;71(6).

DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN EL LABORATORIO

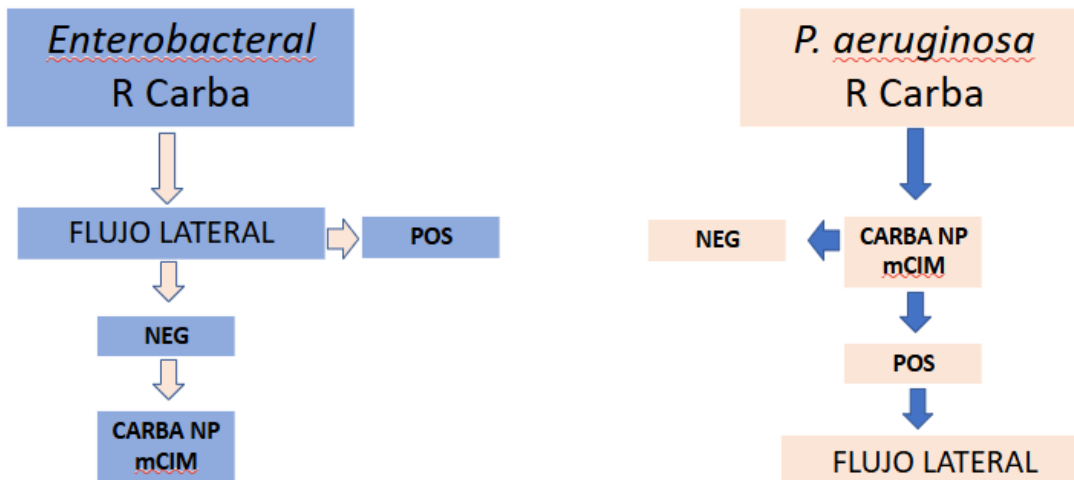


No existe un único método ideal para todas las situaciones

- **A TENER EN CUENTA**
- Costo
- Facilidad
- Equipos necesarios
- Tiempo de resultados
- Epidemiología

$$A \perp \dots \perp A \mid \dots$$

Flujograma



DIAGNOSTICO MOLECULAR

Ventajas del dx molecular

DIAGNOSTICO MAS
PRECISO

AHORRO DE TIEMPO EN EL
LABORATORIO

DIAGNOSTICO MAS
RAPIDO

DISMINUCIÓN EN LOS COSTOS DE
SERVICIOS DE SALUD

DIAGNOSTICO MOLECULAR



Sistemas cerrados

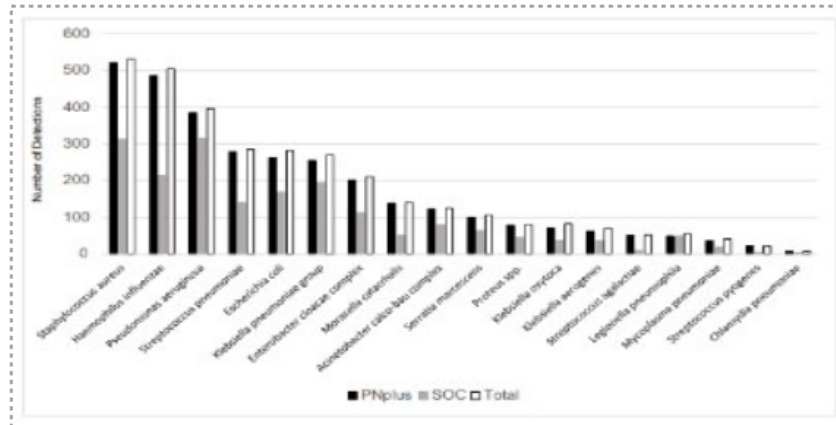


Sistemas abiertos

- Prueba única / múltiples
- Detecta microorganismos viables o no viables
- No todos los agentes etiológicos están incluidos

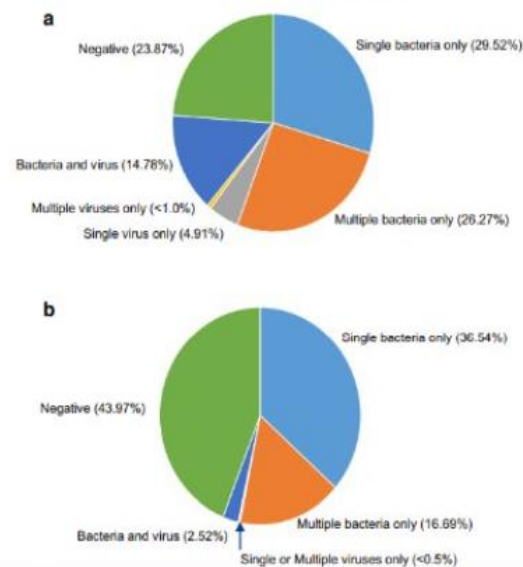
Identificación bacteriana

Métodos moleculares vs cultivos



Ginocchio et al. Multinational evaluation of the BioFire® FilmArray® Pneumonia plus Panel as compared to standard of care testing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021 Aug;40(8):1609-1622.

Fig. 2 a Distribution of pathogens detected by BioFire® Pneumonia plus Panel (PNPplus) for all specimen types. **b** Distribution of pathogens detected by standard of care (SOC) for all specimen types

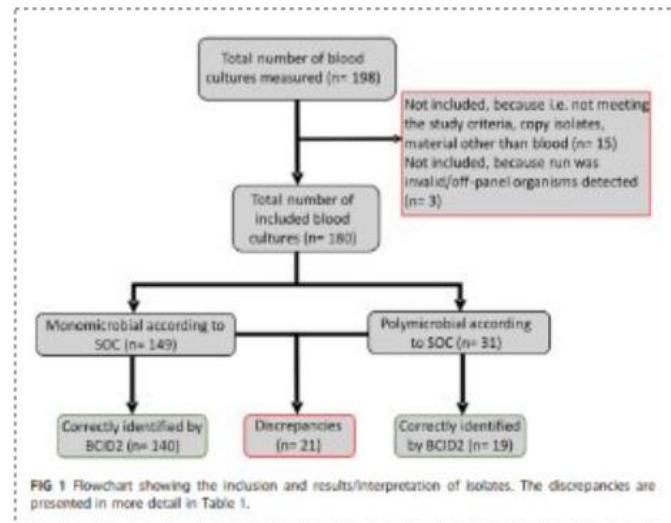


Ginocchio et al. Multinational evaluation of the BioFire® FilmArray® Pneumonia plus Panel as compared to standard of care testing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021 Aug;40(8):1609-1622.

BACTERIA: (Semi-Quantitative) • <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex • <i>Enterobacter cloacae</i> complex • <i>Escherichia coli</i> • <i>Haemophilus influenzae</i> • <i>Klebsiella aerogenes</i> • <i>Klebsiella oxytoca</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> group • <i>Moraxella catarrhalis</i> • <i>Proteus</i> spp. • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> ATYPICAL BACTERIA: (Qualitative) • <i>Chlamydia pneumoniae</i> • <i>Legionella pneumophila</i> • <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	VIRUSES: • Adenovirus • Coronavirus • Human metapneumovirus • Human rhinovirus/enterovirus • Influenza A virus • Influenza B virus • Paramyxovirus • Respiratory syncytial virus ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES: Carbapenemases: • IMP • KPC • NDM • OXA-48-like • VIM ESBL: • CTX-M Methicillin resistance: • <i>mecA/C</i> and <i>MREJ</i> (MRSA)
--	--

GRAM-NEGATIVE BACTERIA: • <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex • <i>Bacteroides fragilis</i> • <i>Enterobacteriales</i> • <i>Enterobacter cloacae</i> complex • <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella aerogenes</i> • <i>Klebsiella oxytoca</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> group • <i>Proteus</i> spp. • <i>Salmonella</i> spp. • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Haemophilus influenzae</i> • <i>Neisseria meningitidis</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GRAM-POSITIVE BACTERIA: • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Staphylococcus</i> spp. • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staphylococcus lugdunensis</i> • <i>Streptococcus</i> spp. • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i>	YEAST: • <i>Candida albicans</i> • <i>Candida auris</i> • <i>Candida glabrata</i> • <i>Candida krusei</i> • <i>Candida parapsilosis</i> • <i>Candida tropicalis</i> • <i>Cryptococcus</i> (<i>C. neoformans/C. gattii</i>) ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES: Carbapenemases • IMP • KPC • OXA-48-like • NDM • VIM Colistin Resistance • <i>pmx-1</i> ESBL • CTX-M Methicillin Resistance • <i>mecA/C</i> • <i>mecA/C</i> and <i>MREJ</i> (MRSA) Vancomycin Resistance • <i>vanA/B</i>
---	--

Utilidad de métodos moleculares



Sepsis

Berinson B et al. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice. J Clin Microbiol. 2021 Jul 19;59(8):e0054321...

Utilidad de métodos moleculares

180 BSIs, 159 (88.3%) fueron correctamente identificados BCID2.

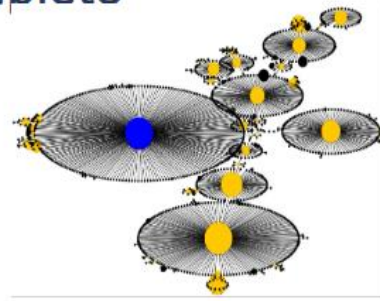
TABLE 1 Overview on discordant species identification by SOC analytics and the BCID2 assay system

Study no.	SOC identification	BCID2 identification
Monomicrobial Gram positive		
6	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.
47	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
54	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i>
62	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
97	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
118	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Monomicrobial Gram negative		
17	<i>K. pneumoniae</i>	None
28	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>
70	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>
Polymicrobial culture		
5	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. capitis</i>	<i>K. pneumoniae</i> group
14	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i>
20	<i>E. faecium</i> , <i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i>
51	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>
58	<i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> group
73	<i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.
75	<i>S. haemolyticus</i> , <i>C. krusei</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. krusei</i>
82	<i>E. coli</i> , <i>S. anginosus</i> group	<i>E. coli</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
123	<i>C. perfringens</i> , <i>S. epidermidis</i>	None
127	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
129	<i>Candida albicans</i>	<i>K. oxytoca</i>
178	<i>P. agglomerans</i> , <i>S. haemolyticus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. epidermidis</i>

Berinson B et al. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice. J Clin Microbiol. 2021 Jul 19;59(8):e0054321...

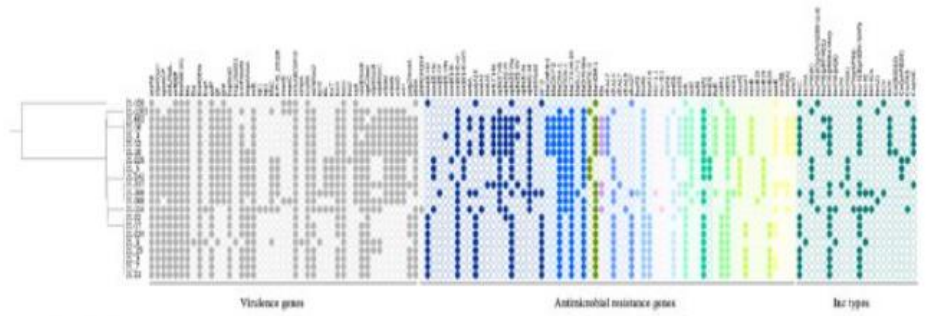
Secuenciación de Genoma Completo

- Anotación de Genoma
- Identificación de brotes
 - Tipificación molecular: MLST, Capsule (WZI)
- Presencia/ausencia de genes de interés
 - Resistencia
 - Virulencia
 - Plásmidos



E. J. et al. *J. Bacteriol.* 2004
 i, C. A. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017

Secuenciación de Genoma Completo

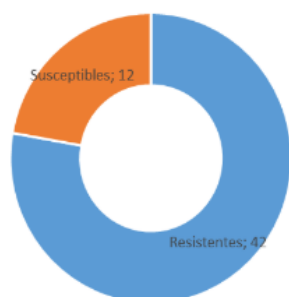


Episeq®

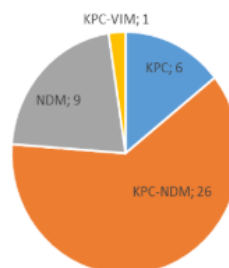
U. Garza-Ramos, N. Rodríguez-Medina, C. Córdova-Fletes et al. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 33 (2023) 61–71

Aislamientos resistentes a ceftazidime avibactam

Aislamientos resistentes a CZA
N= 54



Carbapenemasas N= 42

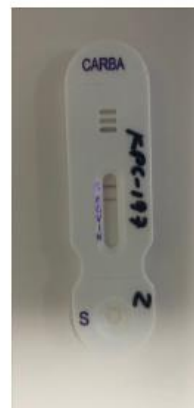
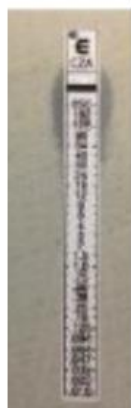


Klebsiella pneumoniae

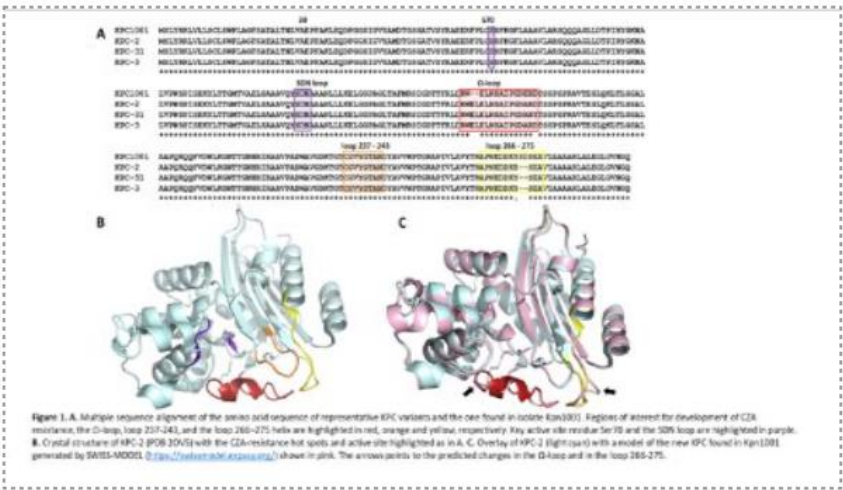
Caso 1

ANTIBIOTICOS	MIC	I
BLEE		
Ampicilina	>32	R
Ampicilina sulbactam	>32	R
Piperacilina tazobactam	>128	R
Ceftazidima	> 32	R
Ceftriaxona	>32	R
Cefepime	>32	R
Aztreonam	>32	R
Ertapenem	<=0.25	S
Imipenem	<=1	S
Meropenem	<=0.25	S
Ceftazidime avibactam	> 128	R

- CARBAPENEMICOS: SENSIBLES
- CARBA NP: NEGATIVO
- KPC



Variantes de KPC (KPC-31 / KPC-197)

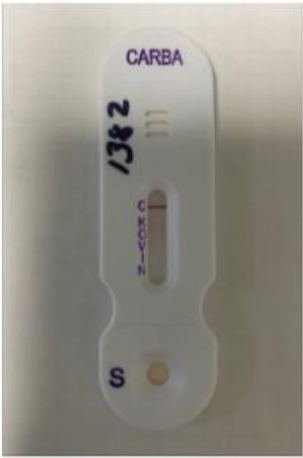


De la Cadena et al., First report of KPC variants conferring ceftazidime-avibactam resistance in Colombia: introducing KPC-197. Microbiol Spectr. 2024 Jun 4;12(6):e0410523. doi: 10.1128/spectrum.04105-23. . .

Klebsiella pneumoniae

ANTIBIOTICOS	MIC	I
BLEE		
Ampicilina	>32	R
Ampicilina sulbactam	>32	R
Piperacilina tazobactam	>128	R
Ceftazidima	> 32	R
Ceftriaxona	>32	R
Cefepime	>32	R
Aztreonam	>32	R
Ertapenem	<=0.25	S
Imipenem	<=1	S
Meropenem	<=0.25	S
Ceftazidime avibactam	> 128	R

- CARBAPENEMICOS: SENSIBLES
- CARBA NP: NEGATIVO
- qPCR in house: NEGATIVO



Caso 2

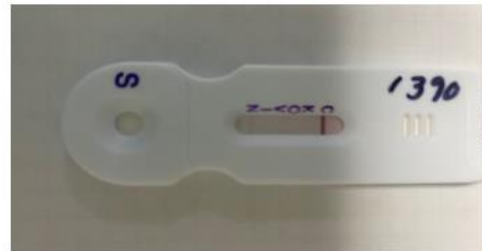
Caso 3

Proteus mirabilis

- CARBAPENEMICOS: SENSIBLES
- Ceftazidime avibactam: Resistente
- CARBA NP: NEGATIVO
- FilmArray: NEGATIVO

UEB

- qPCR: NDM POSITIVA
- CARBA 5: ?



Klebsiella pneumoniae

ANTIBIOTICOS	MIC	I
BLEE		
Ampicilina	>32	R
Ampicilina sulbactam	>32	R
Piperacilina tazobactam	>128	R
Ceftazidima	> 32	R
Ceftriaxona	>32	R
Cefepime	>32	R
Aztreonam	>32	R
Ertapenem	> 8	R
Imipenem	> 16	R
Meropenem	> 16	R
Ceftazidime avibactam	> 128	R

Caso 4

- CARBAPENEMICOS: RESISTENTES
- CARBA NP: POSITIVO
- qPCR in house: KPC
- WGS: KPC-8

Gregory CJ et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010 May;31(5):476-84



GRACIAS !!
ecadenav@unbosque.edu.co