



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Evaluación clínica de un nuevo método molecular para la detección de microorganismos multirresistentes



Alba de la Rica-Martínez^a, María Andres-Franch^a, Gabriel Estan-Cerezo^b, Montserrat Ruiz-García^a, Juan Carlos Rodríguez-Díaz^c, Nieves Gonzalo-Jimenez^a y Antonio Galiana-Cabrera^{a,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Elche, Alicante, España

^b Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Elche, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Elche, Alicante, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de julio de 2020

Aceptado el 6 de diciembre de 2020

On-line el 8 de febrero de 2021

Palabras clave:

Técnicas de diagnóstico molecular
Multirresistencia a fármacos en español
Análisis de microarrays
Epidemiología molecular

R E S U M E N

Introducción: El objetivo fue realizar la validación clínica del sistema molecular AMR Direct Flow Chip® para la detección de genes de resistencia a antimicrobianos partiendo de aislados bacterianos en cultivo, así como de hisopos de muestras nasales o rectales.

Métodos: El ensayo AMR es una PCR multiplex seguida de hibridación reversa tipo *dot blot* en arrays de ADN completamente automatizada mediante la plataforma HS24, con un tiempo de realización de 3 h. Se realizó la validación preclínica con 104 cepas bacterianas caracterizadas y posteriormente se analizaron 210 muestras de hisopos nasales o rectales.

Resultados: La sensibilidad y la especificidad del ensayo preclínico fueron del 100%, identificando correctamente las 104 cepas. En la validación clínica, la sensibilidad fue del 100% y la especificidad fue del 100% en muestras rectales y del 97% en hisopos nasales.

Conclusiones: El sistema AMR Direct Flow Chip® es un sistema rápido y eficaz para la detección de microorganismos multirresistentes a partir de muestras rectales y nasales.

© 2021 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Clinical evaluation of a new molecular method for the detection of multidrug-resistant microorganisms

A B S T R A C T

Introduction: The main objective of this work is to carry out the clinical validation of the trial with the AMR Direct Flow Chip® starting from either nasal swabs, rectal swabs directly or from isolated strains to detect antibiotic resistance genes.

Methods: We developed the preclinical validation of the assay with 104 known bacterial isolates. A total of 210 nasal or rectal swab samples were analyzed. The AMR assay is based on multiplex PCR followed by reverse dot blot hybridization on DNA arrays fully automated by using the HS24 platform. The completion time of the full analysis is 3 hours.

Keywords:

Molecular diagnostic techniques
Multiple drug resistance in English
Microarray analysis
Molecular epidemiology

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: antonio.galiana1@gmail.com (A. Galiana-Cabrera).

Results: Both the sensitivity and specificity of the preclinical assay were 100%, with the 104 samples correctly identified. In the clinical validation, the sensitivity was 100% and the specificity was between 100% in rectal swabs and 97% in nasal swabs.

Conclusions: The AMR Direct Flow Chip® is a rapid and effective assay for the detection of multidrug-resistant microorganisms from nasal and rectal swab samples.

© 2021 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La resistencia antimicrobiana es una amenaza para la salud pública mundial¹, ya que supone un aumento en la morbilidad². Aunque el desarrollo de resistencias es un fenómeno biológico natural, el uso de antibióticos ha contribuido al incremento de estas³.

El tiempo habitual para obtener la sensibilidad a antimicrobianos de un microorganismo varía entre 24 y 72 h, tiempo que se puede reducir mediante la utilización de pruebas rápidas de diagnóstico.

Existen diversas pruebas moleculares para el cribado de pacientes colonizados por microorganismos resistentes, como el Xpert® MRSA, el Xpert® vanA/vanB o el Xpert® Carba-R (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.), si bien todavía poseen algunas limitaciones en cuanto al número de dianas detectadas en un ensayo simple^{4,5}.

El kit Antimicrobial Resistance Direct Flow Chip® (Master Diagnóstica, Granada, España) (AMR) es un sistema de diagnóstico molecular basado en una PCR multiplex seguida de hibridación reversa tipo *dot blot* en arrays de ADN, completamente automatizada mediante la plataforma HS24. Este sistema permite detectar 20 familias de genes de resistencia en bacterias grampositivas y gramnegativas (genes *mecA*, *vanA/B* y genes de betalactamasas de espectro extendido [BLEE], de carbapenemasas de clase A, B y D, así como la especie *Staphylococcus aureus*) (tabla 1). El ensayo se puede realizar directamente sobre hisopos nasales o rectales, colonias bacterianas o hemocultivos, con un tiempo de obtención de resultados de aproximadamente 3 h.

El objetivo fue realizar una evaluación clínica de este kit AMR para la detección de pacientes críticos colonizados por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) en hisopos nasales, por *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (ERV), BLEE o productores de carbapenemasas en hisopos rectales.

Material y métodos

Muestras

Para la evaluación preclínica del kit AMR se emplearon 104 cepas bien caracterizadas de nuestra colección procedentes de muestras clínicas (Tabla S1). Las cepas se caracterizaron mediante el Xpert® MRSA y Xpert® VanA/VanB (aislados grampositivos) y mediante un ensayo TaqMan® multiplex PCR en aislados gramnegativos y posterior secuenciación^{6,7}.

Para la evaluación clínica se emplearon 210 muestras (90 nasales y 120 rectales) recogidas secuencialmente de pacientes ingresados en la UCI en 2 periodos independientes de 4 meses cada uno. Las muestras se recogieron con hisopos con medio de transporte (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, CA, EE. UU.) y se analizaron en paralelo empleando métodos microbiológicos convencionales y el kit AMR, para el que se utilizó el excedente de la muestra una vez utilizada para el diagnóstico convencional. Los datos se analizaron de forma anonimizada.

Cribado mediante métodos convencionales

Los 90 hisopos nasales para la detección de SARM se cultivaron en medio ChromID® MRSA agar (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) a 37 °C durante 24 h, identificando los microorganismos mediante MALDI-TOF. En el caso de *S. aureus* se realizó una confirmación adicional mediante Xpert® MRSA para la detección de la resistencia a meticilina.

Para el cribado de ERV, cepas productoras de BLEE y de carbapenemasas, las muestras se cultivaron en placas ChromID® VRE, ESBL y Carba Smart (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia), respectivamente, con incubación a 37 °C, 24 h. Los microorganismos crecidos se identificaron mediante MALDI-TOF. La detección de los genes *vanA/B* se realizó mediante el sistema Xpert® vanA/vanB, y la de los genes codificantes de BLEE, carbapenemasas y AmpC, mediante métodos previamente publicados⁸.

Ensayo con el kit AMR Direct Flow Chip®

Para la validación preclínica, las cepas se sembraron en medio agar-sangre (5% Columbia Blood Agar; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y se incubaron a 37 °C, 18–24 h. Tras resuspender una única colonia en 100 µl de agua destilada estéril, se cogieron 5 µl de esa muestra y se llevaron hasta 50 µl con los reactivos de amplificación del kit (43,5 µl de solución tampón y 1,5 µl de la enzima PCR).

Para la validación clínica, los hisopos nasales y rectales se resuspendieron en 0,5 ml de agua estéril y se mezclaron mediante agitación. Para la PCR se emplearon 5 µl de la suspensión de los hisopos nasales y 5 µl de una dilución (1/10) de la suspensión de los hisopos rectales. La PCR se realizó del modo descrito anteriormente (termociclador GeneAmp® PCR System 9600; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), como sigue: 10 min a 25 °C; 3 min a 95 °C; 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, seguidos de 45 s a 50 °C, un minuto a 72 °C y almacenamiento a 4 °C. El tiempo total fue de 2 h.

Tras la realización de la PCR se empleó la plataforma automatizada hybriSpot HS24 (Master Diagnóstica, Granada, España) (fig. 1A), que realiza una hibridación reversa tipo *dot blot* de hasta 24 muestras simultáneamente e interpreta los resultados en una hora. Cuando los amplicones específicos hibridan con sus correspondientes sondas, las señales se visualizan a través de una reacción colorimétrica (fig. 1B y C). La plataforma hybriSpot HS24 captura la imagen del chip, que es analizada automáticamente mediante un patrón de puntos que corresponde a un perfil de determinantes genéticos de resistencia (fig. 1).

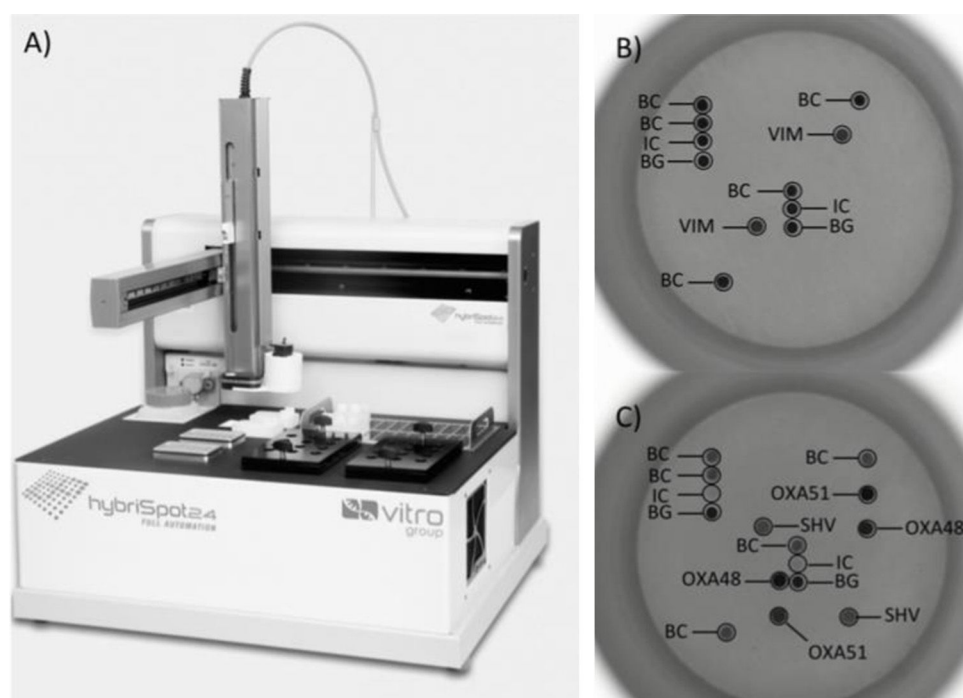
Análisis estadístico

Se calcularon las tablas de contingencia teniendo en cuenta los resultados obtenidos por técnicas convencionales (*gold standard*) y mediante el AMR. La sensibilidad, la especificidad y los intervalos de confianza del 95% se calcularon empleando el software SPSS v17.0.

Tabla 1
Determinantes genéticos de resistencia detectados mediante el ensayo con el kit AMR Direct Flow Chip®

Microorganismos			Determinantes genéticos de resistencia
Bacterias grampositivas	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina	-	SA-mec
	<i>Enterococcus</i> spp. resistentes a la vancomicina	-	vanA y vanB
Bacterias gramnegativas	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clase A	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{SME} , <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NMC/IMI} y <i>bla</i> _{GES}
Productoras de BLEE y de carbapenemasas		Clase B	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{GIM} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{SPM} , <i>bla</i> _{SIM} y <i>bla</i> _{NDM}
		Clase D	<i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-24-like} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{OXA51-like} y <i>bla</i> _{OXA-58-like}

BLEE: betalactamasas de espectro extendido.

**Figura 1.** Plataforma HS24 y chip AMR Direct Flow Chip®. A) Plataforma automatizada HS24 para el procesamiento de la hibridación inversa y análisis de la imagen. B) Resultados para una cepa de *Escherichia coli* productora de carbapenemasas. C) Detección de microorganismos MDR en un hisopo rectal positivo que albergaba *Klebsiella pneumoniae* *bla*_{OXA-48}/*bla*_{SHV} y *Acinetobacter baumannii* *bla*_{OXA-51}. Todas las sondas se disponen por duplicado en la matriz del chip y un resultado se considera positivo si se detectan ambas señales. Sondas positivas detectadas: control de biotina (BC); control exógeno de amplificación (IC), para la detección de ADN sintético incluido en el mix de la PCR; control endógeno de amplificación (BG), para la detección del gen *beta-globina* humano; *bla*_{VIM} (VIM); *bla*_{SHV} (SHV); *bla*_{OXA-48} (OXA48) y *bla*_{OXA-51} (OXA51). La imagen está ampliada ×5 en comparación con el tamaño real del chip.

Resultados y discusión

Resultados de la validación preclínica

Los resultados obtenidos en la validación preclínica con el AMR obtuvieron un 100% de concordancia con los resultados esperados para la colección de cepas empleadas (ver material suplementario, [Tabla S1](#)).

Resultados de la validación clínica

Tras el análisis de 90 hisopos nasales en paralelo para la detección de SARM, el método convencional detectó 8 muestras positivas y 82 negativas, mientras que el kit AMR detectó 10 muestras positivas (positivo gen *mecA*) y 80 negativas, con 2 falsos positivos. La sensibilidad y la especificidad en muestras clínicas fueron del 100 y el 97%, respectivamente ([tabla 2](#)).

En cuanto a los hisopos rectales, empleando los métodos convencionales se detectaron 30 muestras positivas para la producción de betalactamasas, de las cuales 24 fueron clasificadas como BLEE y 6 como productoras *ampC*. Los resultados obtenidos con el AMR se muestran en la [tabla 2](#). Entre las 24 muestras en las que se detectaron BLEE, el kit AMR detectó simultáneamente hisopos que contenían microorganismos con más de un marcador genético de resistencia, una muestra con una cepa de *Acinetobacter baumannii* con los genes *bla*_{CTX}/*bla*_{OXA-51} y 5 muestras con *Klebsiella pneumoniae*, productora de BLEE y carbapenemasas (*bla*_{CTX}/*bla*_{SHV}/*bla*_{VIM}). En 6 muestras se detectó la presencia de genes *ampC*, encontrando en 3 de ellas *Escherichia coli* con *bla*_{CTX}, una con *A. baumannii* con *bla*_{MOX} y 2 con *Enterobacter cloacae* con el gen cromosómico *bla*_{EBC}. Para la detección de cepas productoras de carbapenemasas, el método convencional señaló 9 muestras positivas, donde los microorganismos portadores de estos marcadores genéticos de resistencia fueron *K. pneumoniae*, *E. coli* y *A. baumannii*. En cuanto a la detección de ERV, el kit AMR mostró una concordancia absoluta

Tabla 2

Sensibilidad y especificidad para los ensayos realizados empleando el kit AMR Direct Flow Chip® en hisopos nasales y rectales para la detección de determinantes genéticos de resistencia

Microorganismos resistentes	Número de muestras positivas	Número de muestras detectadas por AMR	Resultado AMR	Sensibilidad (%)	IC95%	Especificidad (%)	IC95%
Hisopos nasales (n = 90)							
SARM	8	10	<i>S. aureus</i> + <i>mecA</i>	100	59-100	97	90-99
Hisopos rectales (n = 120)							
BLEE							
<i>K. pneumoniae</i> (12), <i>E. coli</i> (10), <i>A. baumannii</i> (1)	23	23	<i>bla</i> _{CTX}	100	82-100	100	95-100
<i>K. pneumoniae</i> (5)	5	5	<i>bla</i> _{SHV}	100	46-100	100	96-100
<i>K. oxytoca</i> (1)	1	1	<i>bla</i> _{GES}	100	5-100	100	96-100
Productores de carbapenemasas	9	9	-	100	62-100	100	96-100
<i>K. pneumoniae</i> (6), <i>E. coli</i> (2)	8	8	<i>bla</i> _{VIM}	100	60-100	100	95-100
<i>A. baumannii</i> (1)	1	1	<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	100	5-100	100	96-100
ERV	6	-	100	52-100	100	96-100	
<i>E. faecium</i> (2)	2	2	<i>vanA</i>	100	20-100	100	96-100
<i>E. faecium</i> (3), <i>E. faecalis</i> (1)	4	4	<i>vanB</i>	100	40-100	100	96-100

AMR: AMR Direct Flow Chip®; BLEE: betalactamasas de espectro extendido; ERV: enterococo resistente a vancomicina; IC95%: intervalo de confianza al 95%; SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

con los resultados obtenidos mediante los métodos convencionales. Cinco de las 6 muestras positivas contenían *Enterococcus faecium* y la restante, *Enterococcus faecalis* con los genes *vanA* o *vanB*. Estos resultados se muestran en la tabla 2. La sensibilidad y la especificidad del kit fueron del 100% en hisopos rectales.

Las principales ventajas de este test fueron el tiempo para obtener el resultado (3 h) y la variedad de determinantes genéticos de resistencia que detecta. Sin embargo, se obtuvieron 2 falsos positivos para SARM en hisopos nasales. Esta limitación se podría explicar por la tecnología empleada en el kit, ya que detecta de forma independiente la presencia de genes de *S. aureus* y el gen *mecA*. En el caso de gramnegativos, la limitación fue la no identificación de microorganismos portadores de *ampC*, lo que puede ser un problema de cara a implementar políticas de control de infecciones.

Según los resultados de este estudio preliminar, el kit AMR es un ensayo versátil para el cribado de pacientes portadores de microorganismos multirresistentes directamente a partir de muestras clínicas, ya sea mediante hisopos nasales o rectales, reproduciendo resultados similares a los obtenidos por otras pruebas de diagnóstico, como el Xpert® MRSA⁹ o el Xpert® Carba-R¹⁰.

El método detecta, empleando un ensayo sencillo y directo, 21 dianas, incluyendo SARM, ERV, BLEE y carbapenemasas, por lo que puede ser una herramienta útil en los programas de vigilancia de resistencia. No obstante, se deberán realizar otros estudios adicionales para analizar el impacto clínico a largo plazo de esta nueva herramienta de diagnóstico.

Financiación

Esta investigación ha sido financiada por la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) con referencia UGP-14-216.

Conflicto de intereses

Para la realización de este trabajo la empresa Master Diagnóstica ha cedido al equipo investigador los kits de diagnóstico AMR Direct Flow Chip®.

Agradecimientos

Parte de los datos han sido obtenidos del trabajo de diagnóstico habitual desarrollado en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Elche.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.eimc.2020.12.001](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.12.001).

Bibliografía

- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—The need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1057–98.
- Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance. *N Engl J Med*. 2013;368:299–302.
- Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1:63–9.
- Jacqmin H, Schuermans A, Desmet S, Verhaegen J, Saegeman V. Performance of three generations of Xpert MRSA in routine practice: Approaching the aim? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:1363–5.
- Moore NM, Cantón R, Carretto E, Peterson LR, Sautter RL, Traczewski MM, Carba-R Study Team. Rapid identification of five classes of carbapenem resistance genes directly from rectal swabs by use of the Xpert Carba-R assay. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2268–75.
- Lee TD, Adie K, McNabb A, Purych D, Mannan K, Azana R, et al. Rapid detection of KPC, NDM, and OXA-48-like carbapenemases by real-time PCR from rectal swab surveillance samples. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2731–3.
- GeneBank [Internet]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information; 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Swayne R, Ellington MJ, Curran MD, Woodford N, Aliyu SH. Utility of a novel multiplex TaqMan PCR assay for metallo-β-lactamase genes plus other TaqMan assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum β-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42:352–6.
- Wolk DM, Picton E, Johnson D, Davis T, Pancholi P, Ginocchio CC, et al. Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares. *J Clin Microbiol*. 2009;47:758–64.
- Traczewski MM, Carretto E, Cantón R, Moore NM, Carba-R Study Team. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase genes in Gram-negative isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e00272–318.