



# Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos

Constanza Muñoz, Cecilia Zumarán, Tamara González,  
Aniela Wozniak, Claudia Castillo y Patricia García

Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.  
Escuela de Medicina (CM).  
Departamento de Laboratorios Clínicos (AW, PG).  
Servicio de Laboratorios Clínicos, Red de Salud UC-CHRISTUS. Laboratorio de Microbiología (CZ, TG, CC).

Patricia García Cañete ha recibido apoyo para viajes a congresos de Merck Sharpe & Dohme, Novartis, Pfizer, Roche, bioMérieux, Copan y Beckton Dickinson. El resto de los autores declara no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Fondo SENTRY Laboratorio de Microbiología, Departamento de Laboratorios Clínicos.

Recibido: 27 de julio de 2016  
Aceptado: 15 de junio de 2017

Correspondencia a:  
Patricia García Cañete  
pgarcia@med.puc.cl

## Test evaluation and strategy proposal to detect and to characterize carbapenemase-producing gram negative bacilli

**Introduction:** The detection of carbapenemase-producing gram negative bacilli is complicated, because there are available multiple options of test. The confirmation of the enzyme by molecular characterization is not available in all laboratories in our country. **Objective:** To propose a fast, efficient and simple strategy to detect and confirm CPB. **Materials and Methods:** 39 CPB isolates and 8 non-producing were used to evaluate the phenotypic test Carba NP, CarbAcineto NP and Blue-Carba, validating the test Xpert® Carba-R, to be used directly with bacterial colonies with conventional PCR. **Results:** The sensitivity of Carba NP, CarbAcineto NP and Blue-Carba was 79.5; 87.2 and 84.6%, respectively; and specificity was 79.5; 87.2 and 84.6%, respectively. The limit of detection of Xpert® Carba-R was different for each carbapenemase: 40.8 ufc/reaction to KPC and NDM and 30.6 ufc/reaction to VIM. **Discussion:** On isolates with decreased susceptibility to carbapenems we propose to use as screening the test CarbAcineto NP, follow by Xpert® Carba-R to characterize the carbapenemase and adopt specific infection control measures.

**Key words:** Carbapenemases, gram negative bacilli, Xpert® Carba-R, Carba NP.

**Palabras clave:** Carbapenemasas, bacilos gramnegativo, Xpert® Carba-R, Carba NP.

## Introducción

Las bacterias multi-resistentes constituyen en la actualidad un problema grave en el mundo, tanto por las escasas alternativas terapéuticas como por su diseminación entre pacientes en las instituciones de salud y en la comunidad.

En América Latina, el problema es especialmente relevante en enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Acinetobacter baumannii* multi-resistente y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

La situación respecto a los bacilos gramnegativos productores de carbapenemasas (BPC) es variable para los distintos países. Grecia e Italia destacan en Europa por la presencia endémica de BPC<sup>1</sup>, mientras que en América Latina, Brasil, Colombia y Argentina poseen las prevalencias más altas<sup>2,3</sup>. Países como Chile, en que el primer caso descrito fue en marzo de 2012 en un hospital de Santiago en un paciente procedente de Italia<sup>4</sup>, presentan hasta este momento, sólo casos autóctonos esporádicos en distintos centros del país<sup>5</sup>.

Los BPC están implicados comúnmente en infecciones en pacientes graves, hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, con antecedentes de uso de anti-

bióticos<sup>6</sup>, y son asociadas con altas tasas de mortalidad (40-50%)<sup>7</sup>. Existe consenso que para mantener baja la prevalencia de BPC es clave prevenir la diseminación en el hospital<sup>8</sup>. Por esta razón, la detección y confirmación rápida de pacientes portadores permite implementar protocolos de aislamiento precoz.

Actualmente, la detección de BPC es compleja y su confirmación requiere al menos dos días por los métodos convencionales. Además, el surgimiento de varios test, tanto fenotípicos como genotípicos, dificulta la decisión de cuál es el mejor método. Se han descrito al menos tres test fenotípicos basados en la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico del carbapenémico. El primero de ellos, Carba NP diseñado para la detección de carbapenemasas en enterobacterias, usa como tampón de lisis el B-PERII<sup>9</sup>. Blue-Carba, útil en la detección de enterobacterias, *Pseudomonas* sp y *Acinetobacter* sp usa como indicador el azul de bromotimol<sup>10</sup>. Y CarbAcineto NP diseñado para mejorar la detección de las carbapenemasas tipo OXA, usa como tampón una solución de NaCl que permite evidenciar mejor los cambios leves de pH<sup>11</sup>.

En el último tiempo, se han comercializado varios test moleculares basados en reacción de polimerasa en cadena (RPC) múltiple en tiempo real que amplifican los genes asociados a carbapenemasas validados para realizar



vigilancia directamente desde la tórula rectal: hyplex SuperBug ID (AmplexDiagnostics GmbH, Gars-Bahnhof, Germany)<sup>12</sup>, Check-Direct CPE<sup>®</sup> assay (Check-Points, Wageningen, The Netherlands)<sup>13</sup> y Xpert<sup>®</sup> Carba-R kit, comercializado por Cepheid (Sunnyvale, CA, USA) como test IVD (In Vitro Diagnostics Use), aprobado por la Comunidad Europea-CE<sup>14,15</sup>. Por otra parte, existen pocas evaluaciones para el uso de estos sistemas en forma directa sobre la colonia bacteriana<sup>16,17</sup>.

El objetivo de este trabajo fue realizar una evaluación de test rápidos fenotípicos y genotípicos y proponer una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativo.

## Material y Método

Los aislados fueron recolectados entre el año 2007 y 2014 y almacenados a -20 °C. Previo a su uso fueron descongelados y sembrados en agar sangre TSS (Trypcase Soy agar + 5% sheep blood, bioMérieux<sup>®</sup>SA, Marcy l'Etoile, France) con dos traspasos sucesivos, previo a su procesamiento.

Se utilizó un total de 39 aislados productores y ocho no productores de carbapenemasas. De los productores,

20 eran *Klebsiella pneumoniae*, 4 *Serratia marcescens*, 6 *A. baumannii*, 3 *Enterobacter cloacae*, 2 *Escherichia coli*, 1 *Pseudomonas fluorescens*, 1 *Citrobacter amalonaticus*, 1 *Morganella morganii* y 1 *Citrobacter freundii*. Los no productores correspondían a aislados de *K. pneumoniae*. El tipo de enzima presente en cada cepa y sus perfiles de susceptibilidad a carbapenémicos se muestran en la Tabla 1.

De las 20 *K. pneumoniae*, cinco correspondieron a controles de calidad externo enviados por el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), 10 aislados clínicos de pacientes y cinco cepas de vigilancia; *C. amalonaticus*, *M. morganii* y *C. freundii*, todas eran cepas de control de calidad externo CAP; *S. marcescens* correspondieron a dos cepas de control de calidad externo CAP y dos cepas de pacientes; *Acinetobacter baumannii*, todas cepas de pacientes; *E. cloacae*, dos cepas de control de calidad externo CAP y una cepa de paciente; *E. coli*, una cepa de control de calidad externo CAP y una cepa de paciente; y *P. fluorescens*, correspondió a una cepa aislada de paciente.

La caracterización y confirmación molecular de las carbapenemasas se realizó por RPC convencional en gel de agarosa utilizando los partidores y metodología referenciada en la Tabla 2.

**Tabla 1. Tipo de enzima presente en cada cepa y sus perfiles de susceptibilidad a carbapenémicos**

Enzima	Especie	n de aislados	% de cepas no susceptibles (Intermedias o resistentes)		
			Ertapenem (%)	Imipenem (%)	Meropenem (%)
KPC	<i>K. pneumoniae</i>	13	100	100	100
KPC	<i>Citrobacter spp</i>	2	100	100	100
KPC	<i>E. cloacae</i>	3	100	100	100
KPC	<i>E. coli</i>	2	100	100	50
KPC	<i>S. marcescens</i>	2	100	100	100
KPC	<i>M. morganii</i>	1	100	100	100
NDM	<i>K. pneumoniae</i>	4	100	100	100
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	1	100	100	100
OXA-370	<i>K. pneumoniae</i>	1	100	100	100
OXA-51 y OXA 58	<i>A. baumannii</i>	2	N/A	100	100
OXA-23 y OXA-51	<i>A. baumannii</i>	2	N/A	100	100
OXA-51	<i>A. baumannii</i>	2	N/A	100	100
SME	<i>S. marcescens</i>	1	0	0	0
IMP	<i>S. marcescens</i>	1	100	100	100
VIM-2	<i>P. fluorescens</i>	1	N/A	100	100
VIM-27	<i>K. pneumoniae</i>	1	100	100	100
No productoras de CPM	<i>K. pneumoniae</i>	8	87,5	50	75

N/A: no aplica. CPM: carbapenemasas.



**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la RPC en la detección de  $\beta$ -lactamasas**

Gen amplificado	Partidor	Secuencia	Tamaño Producto RPC (pb)	Referencia
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC F	5´-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3´	1010	21
	KPC R	5´-CTCAGTGTCTACAGAAAACC-3´		
<i>bla<sub>GES</sub></i>	Ges F	5´-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3´	864	22
	Ges R	5´-CTATTTGTCCTGCTCAGG-3´		
<i>bla<sub>IMI</sub></i>	IMI-A	5´-ATAGCCATCCTGTTTAGCTC-3´	818	23
	IMI-B	5´-TCTGCGATTACTTTATCCTC-3´		
<i>bla<sub>SME</sub></i>	Sme F	5´-ACTTTGATGGGAGGATTGGCGTCT-3´	574	24
	Sme R	5´-ACCCAATCAGCAGGAACACTAGCA-3´		
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM S	5´-CCGATGGTGTGGTCGCAT-3´	391	25
	VIM AS	5´-GAATGCGCAGCACCAGGAT-3´		
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	NDM1 F	5´-CGGGGCGAGTCGCTTCCAAGG-3´	295	26
	NDM1 R	5´-CCAGCCATTGGCGGCGAAAG-3´		
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP S	5´-AAAGA TACTGAAAAGTTAGT-3´	446	25
	IMP AS	5´-TCYCCAAYTTCACRTGACT-3´		
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-48A	5´-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3´	744	27
	OXA-48B	5´-GAGCACTCTTTTGTGATGGC-3´		

Tm: Temperatura de *melting*; Pb: pares de bases; F: *forward*; R: *reverse*; A: *forward*; B: *reverse*; S: sentido (*forward*); AS: anti-sentido (*reverse*).

Los test fenotípicos realizados fueron el test de Carba NP, CarbAcineto NP y Test Blue-Carba.

El test de Carba NP se realizó siguiendo las recomendaciones CLSI 2016<sup>9</sup>. Brevemente, se prepararon dos tubos Eppendorf (A y B) con 100  $\mu$ l de B-PER II, a los que se les adicionó tres a cinco colonias recolectadas con asa de 1  $\mu$ l. Se agregaron 100  $\mu$ l de la solución rojo fenol/ZnSO4 pH 7,8 (rojo fenol 0,5%, ZnSO4 0,1 M, agua purificada c.s.p) al tubo A, y 100  $\mu$ l de una solución preparada en el momento de 500  $\mu$ l de rojo fenol/ZnSO4 con 6 mg de imipenem (Tienam<sup>®</sup>, MSD) al tubo B, cuidando de agitar ambos tubos. Se incubaron a 35 °C y se evaluaron a los 15 min y dos horas. Se interpretó como test positivo (cepa productora de carbapenemasa) un cambio de color de rojo a naranja o amarillo del tubo B, mientras que la mantención de color rojo se interpretó como negativo. Un cambio de color en el tubo A invalidaba el test.

El test CarbAcineto NP se realizó siguiendo las recomendaciones de Dortet y cols.<sup>11</sup>. Se prepararon dos tubos Eppendorf que contenían 100  $\mu$ l de una solución de NaCl (5 molar) cada uno, a los que se les agregó un asa completa de 10  $\mu$ l de la cepa a evaluar. A un tubo se le adicionó 100  $\mu$ l de rojo fenol/ZnSO4 (rojo fenol 0,5%, ZnSO4 0,1 M, agua purificada c.s.p), mientras que al otro tubo 100  $\mu$ l de la mezcla de 500  $\mu$ l de rojo fenol/ZnSO4 con 6 mg de imipenem (Tienam<sup>®</sup>, MSD). Se incubaron a 35 °C y se evaluaron a los 15 min y dos horas. Se interpretó como test positivo (cepa productora de carbapenemasa) si el tubo

con imipenem viraba de color rojo a amarillo o naranja, y como test negativo si mantenía su color. Un cambio de color en el tubo sin antimicrobiano invalidaba el test. Si el resultado era positivo a los 15 min, el test se detenía.

El test Blue-Carba se realizó siguiendo las recomendaciones de Pires y cols.<sup>10</sup>. Se depositó una asada de la cepa en estudio en dos celdas de una placa de poliestireno de 96 pocillos. A una celda se le adicionó 100  $\mu$ l de azul de bromotimol, mientras que a la otra se le agregó 100  $\mu$ l de la mezcla de 1 ml del reactivo anterior con 6 mg de imipenem (Tienam<sup>®</sup>, MSD). La placa fue incubada a 35 °C en agitación (100 rpm). Se evaluó a los 15 min y dos horas. Se interpretó como test positivo cualquier diferencia de color entre ambas celdas. Si el resultado fue positivo a los 15 min, no se continuó con el test.

Tanto para los test fenotípicos como genotípicos se utilizó como control positivo *K. pneumoniae* ATCC 1705 y como control negativo *K. pneumoniae* ATCC 1706.

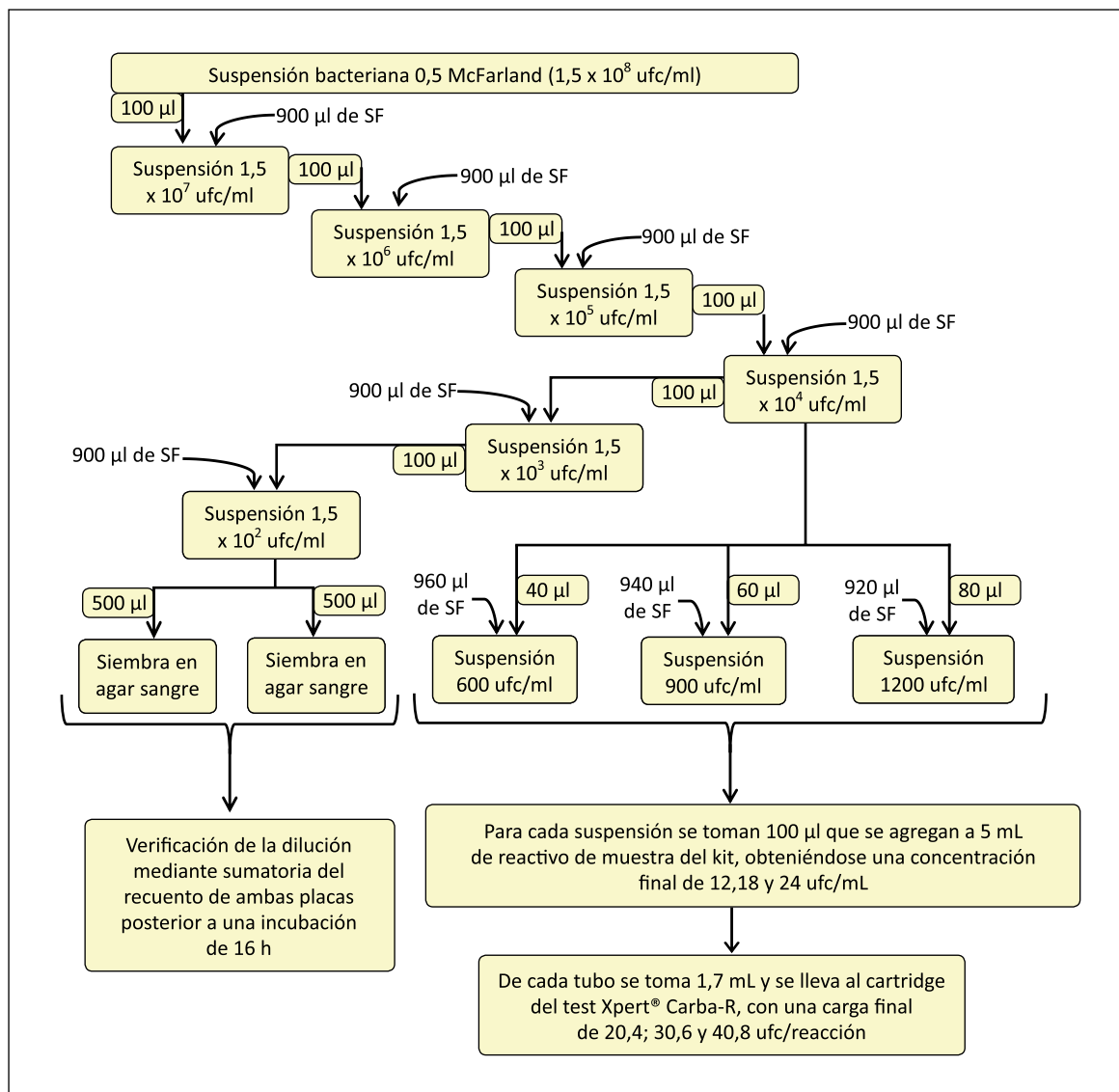
El test Xpert<sup>®</sup> Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) es un test molecular rápido basado en RPC múltiple en tiempo real, completamente automatizado, que en 58 min detecta las secuencias genéticas de *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* y *bla<sub>IMP-1</sub>*. Si bien el test fue elaborado para uso directo de la tórula con la muestra, en este estudio se utilizó un asa de 10  $\mu$ l para recolectar directamente las colonias, las que se disolvieron en el reactivo para la muestra Xpert<sup>®</sup> Carba-R (incluido en el kit). Luego de ser agitado, se traspasó 1,7 ml al *cartridge* Xpert<sup>®</sup> Carba-R y se cargó en la plataforma GeneXpert<sup>®</sup>. Todos los reactivos necesarios para realizar el RPC en tiempo real están incluidos en el *cartridge*<sup>18</sup>.

Para determinar el límite de detección se utilizaron tres diluciones que contenían 600, 900 y 1.200 ufc/ml de aislados productores de carbapenemasas. Para cada familia de carbapenemasa (KPC, NDM, VIM, OXA-48, IMP-1) las determinaciones se realizaron en duplicado. Las concentraciones se obtuvieron a partir de una solución McFarland 0,5 (1,5 x 10<sup>8</sup> ufc/ml), con la que se hicieron diluciones seriadas como se observa en la Figura 1.

De cada una de las diluciones finales (600, 900 y 1.200 ufc/ml) se extrajo 100  $\mu$ l que se depositaron en los 5 ml de reactivo para la muestra Xpert<sup>®</sup> Carba-R, a partir de lo cual se realizó el procedimiento según las instrucciones del fabricante. Además, se sembró la dilución 1,5 x 10<sup>2</sup> ufc/ml en dos placas de agar sangre (500  $\mu$ l por placa) y se cuantificó el número de colonias a las 24 h con el objetivo de comprobar la presencia de bacterias en la solución y que la concentración fuese la correcta.

## Resultados

Para la evaluación de los test fenotípicos (Carba NP, CarbAcineto NP, Blue-Carba) se utilizó como

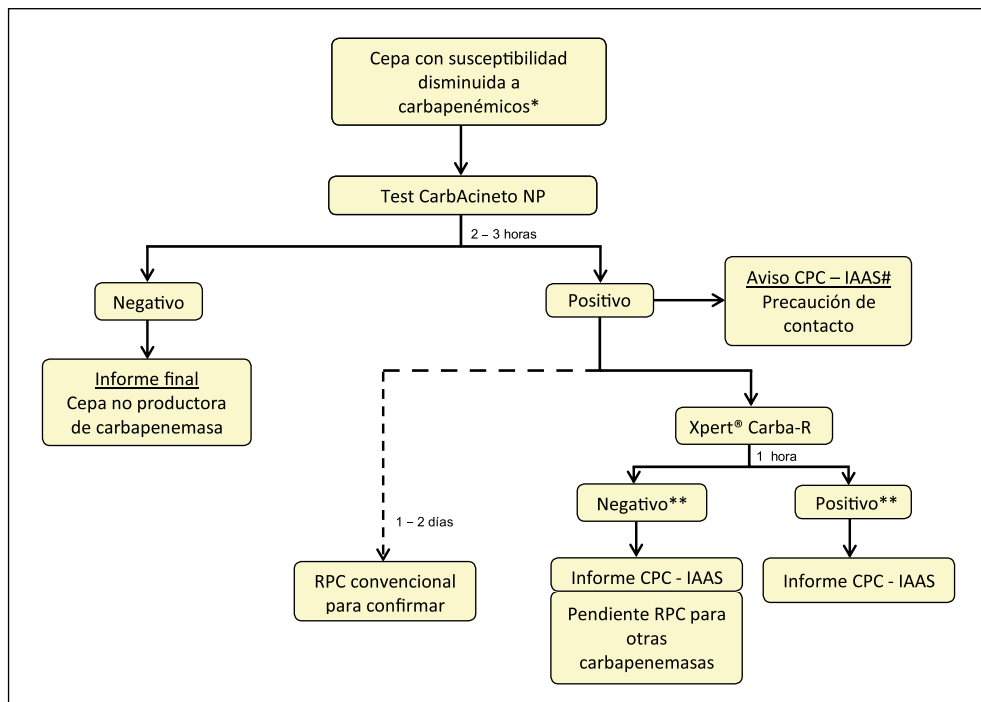


**Figura 1.** Protocolo de diluciones de los aislados para inoculación de los cartuchos para determinar el límite de detección. SF: Suero fisiológico (NaCl 9%).

test de referencia la RPC convencional. Los resultados expresados en porcentaje y número de test positivos en las cepas estudiadas, diferenciadas por cada familia de enzima, se observan en la Tabla 3. Destaca que los tres test fenotípicos y Xpert® Carba-R tienen buena capacidad de detección de las carbapenemasas KPC, NDM, OXA-48, IMP, VIM-2 y VIM-27, independiente del género y especie bacteriana. No ocurrió lo mismo con las enzimas tipo OXA-23, 51, 58 en *A. baumannii* en que ningún test fenotípico pudo detectarlas en su totalidad; Xpert® Carba-R no fue realizado para este tipo de enzimas, ya que el test no está diseñado para estos genes. En OXA-370 y SME se obtuvieron buenos resultados con los test fenotípicos con excepción de Carba NP.

El análisis de la sensibilidad y especificidad de los tres test fenotípicos se muestra en la Tabla 4, donde la mayor sensibilidad y especificidad la obtuvo el test CarbAcinetone NP con 87,2 y 100%, respectivamente. Blue-Carba mostró una sensibilidad intermedia (84,6%) y la menor especificidad (87,5%), mientras que Carba NP mostró la menor sensibilidad (79,5%) con una especificidad de 100%.

Los límites de detección para KPC y NDM fueron de 40,8 ufc/reacción y para VIM de 30,6 ufc/reacción. No se pudo determinar con exactitud los límites de detección para OXA-48 e IMP, pero se puede deducir que para OXA-48 es menor a 20,4 y para IMP es mayor a 40,8 ufc/reacción (Tabla 5).



**Figura 2.** Algoritmo propuesto para la detección rápida mediante test fenotípicos y confirmatorio por test moleculares. \*Considere siempre la epidemiología local. \*\*Resultado aplicable sólo para carbapenemasas KPC, NDM, IMP, VIM y OXA-48. #CPC-IAAS: Comité de Prevención y Control de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud.

**Tabla 3. Resultados expresados en porcentaje y número de test positivos en las cepas estudiadas, diferenciadas por cada familia de enzima**

Enzima	Especie	n de aislados	Resultados positivos			
			Carba NP % (n)	Test fenotípicos CarbAcineto % (n)	Blue-Carba % (n)	Test genotípico Xpert® Carba-R % (n)
KPC	<i>K. pneumoniae</i>	13	92,3 (12)	100 (13)	100 (13)	100 (13)
KPC	<i>Citrobacter spp.</i>	2	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)
KPC	<i>E. cloacae</i>	3	100 (3)	100 (3)	100 (3)	100 (3)
KPC	<i>E. coli</i>	2	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)
KPC	<i>S. marcescens</i>	2	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)
KPC	<i>M. morgani</i>	1	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
NDM	<i>K. pneumoniae</i>	4	100 (4)	100 (4)	100 (4)	100 (4)
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	1	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
OXA-370	<i>K. pneumoniae</i>	1	0 (0)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
OXA-51 y OXA 58	<i>A. baumannii</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N/A
OXA-23 y OXA-51	<i>A. baumannii</i>	2	50 (1)	50 (1)	0 (0)	N/A
OXA-51	<i>A. baumannii</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	N/A
SME	<i>S. marcescens</i>	1	0 (0)	100 (1)	100 (1)	N/A
IMP	<i>S. marcescens</i>	1	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
VIM-2	<i>P. fluorescens</i>	1	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
VIM-27	<i>K. pneumoniae</i>	1	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
No productoras de CPM	<i>K. pneumoniae</i>	8	0 (0)	0 (0)	12,5* (1)	N/A

\*Resultado dudoso. N/A: No aplica porque test declara no detectar estas enzimas.



La verificación de las diluciones por siembra de la suspensión  $1,5 \times 10^2$  ufc/ml mostró una desviación de 18% del esperado teórico (150 ufc).

## Discusión

Este trabajo permitió comparar diferentes test fenotípicos para la detección de BPC y validar un test genotípico (Xpert® Carba-R) para su uso directo de colonia. En base a los resultados encontrados, se planteó una estrategia rápida y eficiente de detección y confirmación de BPC.

Los test fenotípicos basados en el cambio de pH que se genera al romper el anillo  $\beta$ -lactámico por carbapenemasas, y evidenciados con cambios de color de la solución, han demostrado ser más rápidos, simples y menos costosos de realizar, además de más específicos y sensibles que otros test fenotípicos como el test de Hodge modificado<sup>9</sup>.

Nuestros resultados de los test fenotípicos orientan en la elección del test CarbAcineto NP ya que muestra una mayor, aunque discreta, sensibilidad y especificidad en comparación con Carba NP. En cuanto al test Blue-Carba, éste puede dar diferencias poco claras entre los colores de la celda con imipenem y sin imipenem del mismo aislado. Esto puede llevar a falsos positivos y negativos en la interpretación. Además, algunos test claramente positivos a los 15 min se tornaban indeterminados a las dos horas.

Un problema transversal a todos los test evaluados en este trabajo fue la difícil detección de la familia de las OXA. De los seis aislados que presentaban OXA-23, OXA-51 y/o OXA-58, que correspondían a *A. baumannii*, cinco no fueron detectados por alguno de los tres test, mientras que el sexto fue detectado sólo por Carba NP y CarbAcineto NP (Tabla 4). Por su parte, para el RPC en tiempo real automatizado Xpert® Carba-R, los falsos negativos corresponden a SME, OXA 23, OXA 51 y OXA 58, los que no pueden ser detectados por el diseño del test.

El algoritmo propuesto se inicia con la realización de un test fenotípico (CarbAcineto NP o Carba NP) en todos los aislados de bacilos gramnegativos con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos. Estos test entregan un primer resultado en 15 min y un segundo resultado en dos horas.

En caso de ser positivo el test fenotípico, nuestra propuesta es realizar Xpert® Carba-R directo de la colonia, para obtener la caracterización del tipo de carbapenemasa dentro de una hora para dar aviso oportuno al Comité de Prevención y Control de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud.

Otros trabajos han evaluado y propuesto algoritmos para la detección y caracterización molecular de BPC<sup>17,19</sup>. En común podemos destacar el uso en combinación de test fenotípicos y genotípicos, con el fin de disminuir costos y aumentar sensibilidad y especificidad. Boran y

**Tabla 4. Sensibilidad y especificidad para los test fenotípicos en comparación con el método de referencia (RPC convencional)**

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Carba NP	79,5	100
CarbAcineto NP	87,2	100
Blue-Carba	84,6	87,5

**Tabla 5. Límites de detección encontrados para Xpert® Carba-R para cada familia de enzima**

Dilución (ufc/reacción)	KPC		NDM		VIM		OXA-48		IMP	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
40,8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30,6	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
20,4	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-

cols., encontraron que el uso secuencial de CARB screen y Check-MDR Carba (Check-Points, Wageningen, The Netherlands) tenía una sensibilidad y especificidad de 97,3 y 99,6%, respectivamente<sup>17</sup>. Por otro lado, Maurer y cols., obtuvieron buenos resultados utilizando un tamizaje en puntos de corte de disco < 25 mm para meropenem y como test confirmatorio discos combinados de ertapenem (o meropenem) con ácido fenilborónico y ácido etilendiamino tetracético<sup>19</sup>.

La principal limitación de este trabajo fue el bajo número de cepas evaluadas, tanto productoras como no productoras de carbapenemasas, lo que está en concordancia con la realidad epidemiológica actual del país<sup>20</sup>.

El principal aporte de este trabajo es que se valida un test rápido para realizar la confirmación y caracterización molecular de BPC de manera directa desde la colonia frente a una cepa con test fenotípico positivo, de modo de poder aplicar las medidas de control específicas para cada caso.

## Resumen

**Introducción:** La detección de bacilos gramnegativos productores de carbapenemasas es compleja, existiendo actualmente varios test disponibles. La confirmación mediante la caracterización molecular de la enzima no está disponible en todos los laboratorios del país. **Objetivo:** Plantear una estrategia rápida, eficiente y sencilla para la detección y confirmación de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. **Material y Métodos:** Se utilizaron 39 aislados productores y ocho no productores de carba-





penemasas para evaluar los test fenotípicos Carba NP, CarbAcineto NP, Blue-Carba y validar el test molecular Xpert® Carba-R directo de la colonia en comparación con RPC convencional. **Resultados:** La sensibilidad para Carba NP, CarbAcineto NP y Blue-Carba fue de 79,5; 87,2 y 84,6%, respectivamente; mientras que la especificidad fue de 100; 100 y 87,5%, respectivamente. La concordancia entre RPC convencional y Xpert® Carba-R fue de 100%.

El límite de detección para Xpert® Carba-R fue diferente según el tipo de carbapenemasa: 40,8 ufc/reacción para KPC y NDM y 30,6 ufc/reacción para VIM. **Discusión:** En aislados con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos se propone realizar un tamizaje con CarbAcineto NP, para luego caracterizar la carbapenemasa con Xpert® Carba-R y adoptar las medidas de contención específicas para cada caso.

## Referencias bibliográficas

- Grundmann H, Livermore D M, Giske C G, Canton R, Rossolini G M, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; 15 (46). (Accedido el 20 de julio de 2015). Disponible en <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>.
- Perenguez M, Moto G, Correa A, Rosso F, Álvarez C, Matta L, et al. Molecular characterization of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Latin America. Abstracts C-801 of the 54<sup>th</sup> ICAAC, Washington DC, USA, Sept 2014.
- Gales A, Castanheira M, Jones R, Sade H. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73 (4): 354-60.
- Cifuentes M, García P, San Martín P, Silva F, Zúñiga J, Reyes S, et al. Primer caso de detección de blaKpc en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29 (2): 224-8.
- Recomendaciones para inclusión de pruebas de screening para carbapenemasas en *Klebsiella* spp. Ordinario N°160. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud. (Accedido el 3 de julio de 2015). Disponible en <http://www.ispch.cl/documento/20990>.
- Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 2014; 44 (2): 51-6.
- Hanemaaijer N, Nijhuis R, Slotboom B, Mascini E, van Zwet. New screening method to detect carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in patients within 24 hours. *J Hosp Infect* 2014; 87 (1): 47-9.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). 2012. (Accedido el 20 de julio de 2015). Disponible en <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100S, 26th Edition. 2016.
- Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (12): 4281-3.
- Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP Test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (7): 2359-64.
- Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermanna S. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (9): 3115-8.
- Huang T, Bogaerts P, Ghilani E, Heinrichs A, Gavage P, Roisin S, et al. Multicentre evaluation of the Check-Direct CPE assay for direct screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1669-73.
- Belmekki M, Hamdad F, Mammeri H, Biendo M. Performance evaluation of Cepheid Xpert® Carba-R-ruo PCR currently on the market using in-house PCR as the gold standard. Abstracts D-900c of the 54th ICAAC, Washington DC, USA, Sept 2014.
- Tenover F, Canton R, Kop J, Chan R, Ryan J, Weir F, et al. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (11): 3780-7.
- Findlay J, Hopkins K, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1338-42.
- Boran N, Vivian B, Logan C, Grogan J. Formation of a carbapenemase resistance detection algorithm for use in the routine laboratory. *Br J Biomed Sci* 2015; 72 (1): 12-22.
- Xpert® Carba R. Disponible en [http://www.cephheid.com/administrator/components/com\\_productcatalog/library-files/b5ffba61638dfd0064e436c6111141e-Xpert-CarbaR-Brochure-CEIVD-3017-03.pdf](http://www.cephheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/b5ffba61638dfd0064e436c6111141e-Xpert-CarbaR-Brochure-CEIVD-3017-03.pdf) (Accedido el 17 de julio de 2015).
- Maurer F, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg G, Hombach M. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests in *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol* 2015; 53 (1): 95-104.
- Vigilancia de resistencia a antimicrobianos en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en salud. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile 2015; 5 (4 de abril) (versión 2, actualizada). Disponible en [http://www.ispch.cl/sites/default/files/ResistenciaAntimicrobianosV2-06072015A\\_0.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/ResistenciaAntimicrobianosV2-06072015A_0.pdf)
- Yigit H, Queenan A M, Anderson G, Domenech-Sánchez A, Biddle J, Steward C, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (4): 1151-61.
- Poirel L, Le Thomas I, 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; 44: 622-32.
- Aubron C, Poirel L, Ash R J, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 260-4.
- Gales A C, Biedenbach D J, Winokur P, Hacek D M, Pfaller M A, Jones R N. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39: 125-7.
- Pérez A, García P, Poggi H, Braun S, Castillo C, Román J, et al. Presence of metallo β-lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Med Chile* 2008; 136: 423-32.
- Wozniak A, Villagra N, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol* 2012; 61: 1270-9.
- Queenan A M, Bush K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.