

“Uso actual de herramientas biotecnológicas en la identificación y diagnóstico de las resistencias a carbapenémicos”

Sandra Lorena Reyes Giraldo

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA

Cali

2017

Uso actual de herramientas biotecnológicas en la identificación y diagnóstico de las resistencias a carbapenémicos.

Sandra Lorena Reyes

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE MAGISTER EN BIOTECNOLOGIA

Tutor

Adriana Correa, MSc, PhD

Cali

2017

**FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO DE
GRADO II**

Firma Aval del Asesor:

Adriana Correa

Nombre del Asesor: Adriana Correa

Firma del Aval del Asesor 2, Co-asesor o Co-asesor académico (Según sea el caso):

Nombre del Asesor 2 (Según sea el caso)

Firma del estudiante 1:

Sandra Lorena Reyes Giraldo

Nombre del Estudiante: Sandra Lorena Reyes Giraldo

Firma del estudiante 2(según sea el caso):

Nombre del Estudiante 2 (según sea el caso)

Formato de Presentación de Cuarta página:

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermana quienes emprendieron conmigo este nuevo reto acompañándome y apoyándome en todo momento. A Adriana Correa por su apoyo incondicional. A bioMérieux Colombia por su colaboración en el proceso.

Tabla de Contenidos

Resumen del Trabajo	7
Introducción	8
Planteamiento de la de investigación	9
Objetivos	11
Marco teórico y estado del arte	11
Avance de la resistencia bacteriana a carbapenémicos	12
Carbapenemasas Clase A	14
Carbapenemasas Clase B	17
Carbapenemasas Clase C	20
Carbapenemasas Clase D	21
Herramientas diagnósticas disponibles para detectar carbapenemasas	22
Pruebas fenotípicas	23
Pruebas moleculares	37
Utilidad de las herramientas de diagnóstico molecular dentro de un programa de uso racional de antibióticos	54
Impacto económico de la utilización de las herramientas biotecnológicas en los sistemas de salud para el diagnóstico de las bacterias portadoras de carbapenemasas.	61
Metodología Utilizada	65
Análisis de la monografía	66
Conclusiones	68
Bibliografía	69

I. Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación molecular de las carbapenemasas.	13
Tabla 2. Especies clínicamente relevantes con carbapenemasas adquiridas.	14
Tabla 3. Variabilidad de la resistencia a carbapenémicos en Gram negativos productores de carbapenemasas.....	25
Tabla 4. Interpretación de resultado Carba NP.	28
Tabla 5. Comparación medios cromogénicos.	35
Tabla 6. Características de las herramientas de detección de carbapenemasas.	55

II. Lista de Figuras

Figura 1. Distribución geográfica mundial de los productores de KPC.....	16
Figura 2. Distribución geográfica mundial de los productores de NDM.....	19
Figura 3. Distribución geográfica mundial de los productores de OXA.....	22
Figura 4. Test de Hodge modificado. Detección de carbapenemasas.....	26
Figura 5. Interpretación del resultado mCIM.....	30
Figura 6. Prueba OXA-48 K-SeTw.....	36
Figura 7. Descripción de la técnica MALDI-TOF.....	38
Figura 8. LPA carbapenemasas.	40
Figura 9. Fases de la PCR en tiempo real.	45
Figura 10. Procedimiento de montaje de la prueba Xpert® Carba-R	46
Figura 11. Procedimiento de montaje de la prueba FILMARRAY® BCID.....	49
Figura 12. Procedimiento de montaje Microarreglo.	51
Figura 13. Análisis de resultados DiversiLab	54

Resumen del Trabajo

Los Bacilos Gram Negativos (BGN) de importancia clínica como las *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) y *Acinetobacter baumannii* actualmente presentan un incremento en la resistencia a antibióticos. Entre los antibióticos a los cuales estas bacterias son resistentes están los carbapenémicos, antibióticos de última generación utilizados como una de las últimas alternativas para el tratamiento en infecciones complicadas. Estas bacterias están distribuidas a nivel mundial y generan una preocupación en la salud pública (1). Múltiples mecanismos de resistencia contribuyen a la aparición de resistencia a carbapenémicos, sin embargo, la modificación enzimática por carbapenemasas es el mecanismo más relevante y el de mayor impacto clínico (2). La emergencia de bacterias portadoras de carbapenemasas representan un desafío para la atención de pacientes infectados, debido a su capacidad de diseminación, la multiresistencia que generalmente deja pocas alternativas terapéuticas y finalmente por las limitaciones diagnósticas. Existen diferentes tipos de carbapenemasas, las cuales, dependiendo del microorganismo portador, genera diferentes perfiles fenotípicos. Estos fenotipos no son suficientes para asegurar la presencia de la enzima. Estudios recientes han identificado que un paciente portador de una carbapenemasa tiene 14 veces mayor posibilidad de morir que uno no portador. En Colombia, las estrategias diagnósticas actuales están basadas en la capacidad hidrolítica de la enzima, generando tiempos de reporte en promedio de 24 horas. Esta información ha generado la necesidad de buscar estrategias diagnósticas con las cuales se pueda generar una disminución en los tiempos de respuesta frente a los métodos convencionales (3). Las herramientas moleculares han demostrado un impacto positivo a nivel clínico ya que han permitido no solo la implementación de una terapia adecuada; sino, una disminución en los costos en la atención en las instituciones de salud, al estar asociado con un programa de uso racional de antibióticos que tiene como pilar el diagnóstico oportuno del microorganismo.

Palabras claves: Carbapenemasas, diagnóstico, terapia

Introducción

La resistencia bacteriana es un problema que va en aumento a nivel mundial de acuerdo con el último informe entregado por la Organización Mundial de la Salud (OMS); puede afectar a cualquier persona sin importar la edad o el país de origen, y prolonga la duración de las enfermedades aumentando el riesgo de muerte (1).

La evolución de la resistencia a través de los años nos muestra que el tiempo entre la introducción de los antibióticos y la aparición de la resistencia, no es muy extenso. En 1937 aparece el primer agente antimicrobiano efectivo, la sulfonamida y dos años después se reportó resistencia a sulfonamidas (4); en 1940 se produjo a gran escala la penicilina, en esa época se había hecho evidente la capacidad de algunas cepas de bacterias para desarrollar resistencia a la penicilina (5). En 1972 se introdujo la vancomicina y en 1988 apareció la resistencia a vancomicina en *Enterococos*. En 1985 fueron introducidos los antibióticos imipenem y ceftazidima, dos años después se reportó la resistencia a ceftazidime en *Enterobacteriaceae* y en 1998 la resistencia imipenem (4).

Múltiples mecanismos contribuyen a la aparición de resistencia a carbapenémicos, entre los que se encuentran las bombas de expulsión (6); cambio en la permeabilidad de la membrana externa (7); alteraciones del sitio blanco (8); y la modificación enzimática del antibiótico producido por enzimas denominadas carbapenemasas. Dentro de estos, sin lugar a duda la modificación enzimática por carbapenemasas es el mecanismo más prevalente y el de mayor impacto clínico; ya que existen pocas alternativas de tratamiento frente a microorganismos productores de las mismas (2).

Las herramientas diagnósticas utilizadas para la detección de las carbapenemasas en las bacterias portadoras varían desde los métodos fenotípicos, hasta las pruebas moleculares; sin embargo en el medio hospitalario, la utilización de las herramientas moleculares es muy limitada. Esta limitación se genera en su mayor parte por el desconocimiento de las mismas, seguido por la

incapacidad de implementación, la cual, debe estar contextualizada dentro de un programa de uso racional de antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue identificar la situación actual de las herramientas biotecnológicas para el diagnóstico de las carbapenemasas y su aplicación a nivel clínico dentro de un programa de uso racional de antibióticos.

En este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed, Science direct y Scopus. Las palabras claves utilizadas para esta búsqueda fueron: Resistencia bacteriana a carbapenémicos, carbapenemasas, diagnóstico de carbapenemasas y técnicas moleculares para el diagnóstico de carbapenemasas.

Planteamiento de la de investigación

La resistencia bacteriana es un problema que afecta a toda la población prolongando la duración de las enfermedades y aumentando el riesgo de muerte, causando adicionalmente pérdidas económicas en los sistemas de salud. En la Unión Europea (UE), del 5 al 12% de los pacientes hospitalizados adquieren una infección durante su estancia (1). En las Américas, hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas, dos clases importantes y muy utilizadas de fármacos antibacterianos. Por otro lado, la resistencia de *K. pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada. En algunos entornos, hasta un 90% de las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina, lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no funciona (1).

Las bacterias resistentes a los carbapenémicos están en aumento especialmente las *Enterobacteriaceae* (CRE, por carbapenem resistance *Enterobacteriaceae*); *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Generalmente, esta resistencia viene acompañada con co-resistencia a todos o casi todos los antibióticos que tenemos disponibles actualmente, razón por la cual se denominan multirresistentes (MDR por su descripción en inglés como Multi-drug resistance) (9). Un ejemplo de ello se presenta en los pacientes con Infecciones del Torrente

Sanguíneo (ITS) en Estados Unidos, por bacterias CRE, los cuales el 6.5% de los 9300 pacientes reportados al año mueren durante el proceso infeccioso (10).

Para el manejo de los pacientes infectados con estas bacterias se requiere un proceso coordinado que promueva el uso apropiado de antimicrobianos, esto se refiere a la selección del régimen óptimo, en la dosis correcta y en el tiempo correcto, permitiendo lograr resultados clínicos favorables para el paciente. Esta estrategia está basada en el diagnóstico correcto, que en el modelo convencional actual, puede tardar entre 48 - 72 horas. Durante este tiempo, la decisión clínica de inicio de tratamiento o empírica puede ser errónea y generar fallas terapéuticas. Por el contrario, los métodos moleculares están relacionados con el ahorro del tiempo. Con las herramientas moleculares los resultados pueden obtenerse entre 6 a 8 horas, lo cual podría reducir significativamente el tiempo en la implementación de la terapia apropiada(11). Las herramientas moleculares han sido utilizadas ampliamente en el diagnóstico virológico desde hace más de una década; sin embargo, para el estudio de la resistencia bacteriana, especialmente, la resistencia a carbapenémicos, solo hasta ahora se están desarrollando estrategias a nivel de diagnóstico.

Por otra parte aunque existen múltiples publicaciones sobre las metodologías que pondrían utilizarse para el diagnóstico, la mayoría de esta información está disgregada en artículos científicos que no son consultados por el personal de los laboratorios clínicos quienes son los implicados directamente en el proceso; esto se debe a que la mayoría de la información está en inglés.

Basados en lo anterior, se realizó una recopilación de la información sobre el aporte actual de la biotecnología en el diagnóstico de las carbapenemasas. Esta información podrá llegar a los laboratorios clínicos para que a su vez puedan aportar a la definición correcta de las metodologías que podrían usarse en el diagnóstico de las bacterias portadoras de carbapenemasas, no solo para una mejor definición de terapia antimicrobiana; sino, para contribuir con el control de la diseminación de estas bacterias.

Objetivos

Objetivo general

Identificar la situación actual del uso de herramientas de diagnóstico molecular y su aplicación actual a nivel clínico en la detección y control de la diseminación de la resistencia bacteriana a carbapenémicos.

Objetivos específicos

1. Describir el avance de la resistencia bacteriana a carbapenémicos.
2. Describir las herramientas diagnósticas disponibles para detectar la resistencia a carbapenémicos.
3. Identificar la utilidad de las herramientas de diagnóstico molecular dentro de un programa de uso racional de antibióticos.
4. Determinar el impacto económico en los sistemas de salud de la utilización de las herramientas de diagnóstico molecular para el diagnóstico de las bacterias portadoras de carbapenemasas.

Marco teórico y estado del arte

Las enfermedades causadas por infecciones bacterianas son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial a pesar del éxito de los antibióticos, sin embargo su uso generalizado e indiscriminado ha puesto una presión selectiva sobre las bacterias favoreciendo las menos susceptibles (5).

Más del 70% de las bacterias patógenas son resistentes al menos un antibiótico (4) y es de gran preocupación la aparición y propagación de bacterias multirresistentes, en especial para los patógenos nosocomiales aislados en los hospitales donde estas superbacterias pueden comprometer el tratamiento eficaz de pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos (12). Se estima que cada año se presentan 25.000 muertes en la Unión Europea y más de 23.000 muertes en Estados Unidos por bacterias multirresistentes (1).

En febrero del 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana y para las cuales se necesita el desarrollo de nuevos antibióticos. Entre ellas se encuentran las bacterias resistentes a carbapenémicos que fueron clasificadas como de prioridad crítica, que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y pacientes con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Dentro de este grupo están incluidos el *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (13).

Avance de la resistencia bacteriana a carbapenémicos

Uno de los mecanismos de resistencia más importante en los BGN es la modificación enzimática del antibiótico, mecanismo por el cual las bacterias expresan enzimas que hidrolizan los antibióticos, causando cambios en su estructura (14). Dentro de estos sistemas enzimáticos se encuentran: las enzimas modificadoras del aminoglucósido y las enzimas tipo β -lactamasas las cuales sin lugar a dudas son las más importantes, ya que afectan la familia de antibióticos más utilizada en el manejo de infecciones intrahospitalarias; los antibióticos β -lactámicos, destruyendo el enlace amida del anillo β -lactámico, haciendo ineficaz el antimicrobiano (14). Dentro de las β -lactamasas las carbapenemasas son las de mayor impacto a nivel clínico, ya que afectan los carbapenémicos, antibióticos de última generación, utilizados para el manejo de bacterias MDR.

Existen dos clasificaciones principales descritas para las β -lactamasas. La clasificación de Ambler es la más usada y se basa en la homología de secuencia de aminoácidos y separa las β -

lactamasas en 4 grupos (A, B, C y D) (Tabla 1). Por otro lado, la clasificación de Bush-Jacoby divide las β -lactamasas en grupos del 1 al 4 (cada una con varios subgrupos) según su función bioquímica, principalmente basada en la especificidad del sustrato y el inhibidor (15,16).

Los genes que codifican para β -lactamasas se denominan generalmente *bla*, seguido por el nombre de la enzima específica (por ejemplo, *bla_{VIM}*) y se han encontrado en el cromosoma o en elementos genéticos y su expresión puede ser constitutiva o inducida (17).

Tabla 1. Clasificación molecular de las carbapenemasas. Tomado de Viau 2016 (16).

Clasificación molecular	β -lactamasas representativas	Características	Inhibidor	Enzimas encontradas en áreas endémicas	Áreas endémicas
A	KPC, GES, SMC	Serina β -lactamasa, plásmido codificado	Derivados de ácido borónico	KPC GES-5	América del Norte, Grecia, Italia, Polonia, Colombia, Argentina, Israel, China. Brasil
B	NDM, VIM, IMP, GIM-1, SPM	Metallo- β -lactamasa, requiere zinc, plásmido codificado / cromosómico	EDTA, ácido dipicolínico	NDM VIM IMP	Subcontinente indio, Kenia, China Subcontinente indio, Grecia, Italia, sur de Francia, Japón, Líbano, Brasil, Portugal, Irlanda, Reino Unido, Alemania, Polonia Subcontinente indio, Grecia, Japón, China
C	CMY-10	Serina β -lactamasa, cefalosporinasas, móvil o cromosómico, poco común	Cloxacilina, derivados ácido borónico	AmpC	En todo el mundo
D	OXA-48, OXA-181, OXA-204, OXA-162, OXA-23, OXA-24	Serina β -lactamasas, actividad débil de aquellos que son carbapenemasas, plásmido codificado	No hay inhibidores específicos disponible	OXA-48	Francia, Bélgica, Canadá, Sur África, Oriente Medio, Turquía, el norte de África, Suiza, Alemania, Líbano, Israel, Marruecos

Las Carbapenemasas son β -lactamasas específicas que hidrolizan los carbapenémicos y según la clasificación de Ambler las carbapenemasas adquiridas se encuentran distribuidas principalmente en tres de los 4 grupos conocidos, A (KPC), B (metaló β -lactamasas) y D (oxacilinasas) (3,18).

Las enzimas clínicamente significativas son principalmente las tipo VIM (*Verona-integrón Metaloenzima*), IMP (imipenem-hydrolyzing β - lactamase) y NDM-1 (*New Delhi metallo-beta-lactamase 1*) del grupo B presentes en *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; las KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) del grupo A presentes en *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, y *Pseudomonas spp.*; y las tipo OXA del grupo D aisladas de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. (Tabla 2) (18)(19). KPC es la carbapenemasa más común en todo el mundo (20).

Tabla 2. Especies clínicamente relevantes con carbapenemasas adquiridas. Adaptado de Miriagou (2010) (18)

Organismo	MBLs (Clase B)	Clase A (GES)	KPC	OXA (Clase D)
<i>Pseudomonas</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+		+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+ ^a			++
<i>Acinetobacter spp.</i>	+			+
Enterobacteriaceae				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ ^a	++		+
<i>Escherichia coli</i>	+	+		+
<i>Proteus mirabilis</i>	+			+
<i>Providencia spp.</i>	+			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+		
<i>Serratia marcescens</i>	+ ^a	+		
<i>Enterobacter spp.</i>	+ ^a	+		
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+		
<i>Morganella morganii</i>	+			
<i>Salmonella entérica</i>		+		
<i>Raoutella spp.</i>		+		

++ Combinación tipo de enzima – especies prevalentes

+ Combinación tipo de enzima – ocasionalmente reportadas

^a Endémica en ciertas regiones

Carbapenemasas Clase A

Las β -lactamasas de clase A son inhibidas por el ácido clavulánico y tienen un residuo de serina en el sitio catalítico. Las enzimas de clase A incluyen una amplia gama de proteínas con

actividades catalíticas muy diferentes, que abarcan desde penicilinasas que sólo hidrolizan penicilina hasta las carbapenemasas como KPC que pueden hidrolizar carbapenémicos así como cefalosporinas, penicilinas y aztreonam. Han sido identificadas principalmente en *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia marcescens*, *Raoultella* spp., *Kluyvera* y *Salmonella*, y en no *Enterobacteriaceae* tales como *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., y *Acinetobacter baumannii* (15–17).

Otras carbapenemasas poco frecuentes han sido reportadas en *Enterobacteriaceae* como el GES-5 y SME en *Serratia marcescens*. En *K. pneumoniae* GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14, GES-18, SFC-1, SHV-38, NMC-A, SME-1 y tipo IMI (21).

La enzima tipo KPC es la carbapenemasa clase A más frecuentemente reportada, la primera KPC descrita fue la KPC-2 en una *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos en 1996 en Carolina del Norte, dando origen a su nombre, *Klebsiella pneumoniae Carbapenemasa*. Desde entonces, 23 variantes han sido descubiertas, las carbapenemasas KPC-2 y KPC-3 son las variantes más frecuentes a nivel mundial (22). Los genes *bla_{KPC}* están codificados en el transposón Tn4401 que se encuentra en un plásmido conjugativo, se pueden transferir a diferentes especies (23)(24), El Tn4401 es de aproximadamente 10 kb, caracterizado por dos secuencias de repetición invertidas imperfectas de 39 pb y alberga secuencias de inserción ISKpn6 e ISKpn7 (24). En el 2003 fue aislado KPC-2 de *Salmonella enterica* y *K. oxytoca* en Estados Unidos, en el 2005 en *E. cloacae* y en el 2007 fue descrito en *P. aeruginosa* en Colombia (25). KPC-3 se detectó en el 2005 en *K. pneumoniae* en el noreste de los EE.UU. y en Israel (23).

Se han observado bacterias productoras de KPC diseminadas a nivel mundial en Estados Unidos, Canadá, México, América del, Puerto Rico, Cuba, Trinidad y Tobago, Europa, Asia, India y Australia (Figura 1)(19,21,25–27), también está muy extendida en la región del Medio Oriente (28). Se ha reportado una propagación endémica de estas bacterias en Estados Unidos, Colombia, Argentina, Brasil, Italia, Grecia, Israel, China y Taiwán (21,29)(Figura 1).

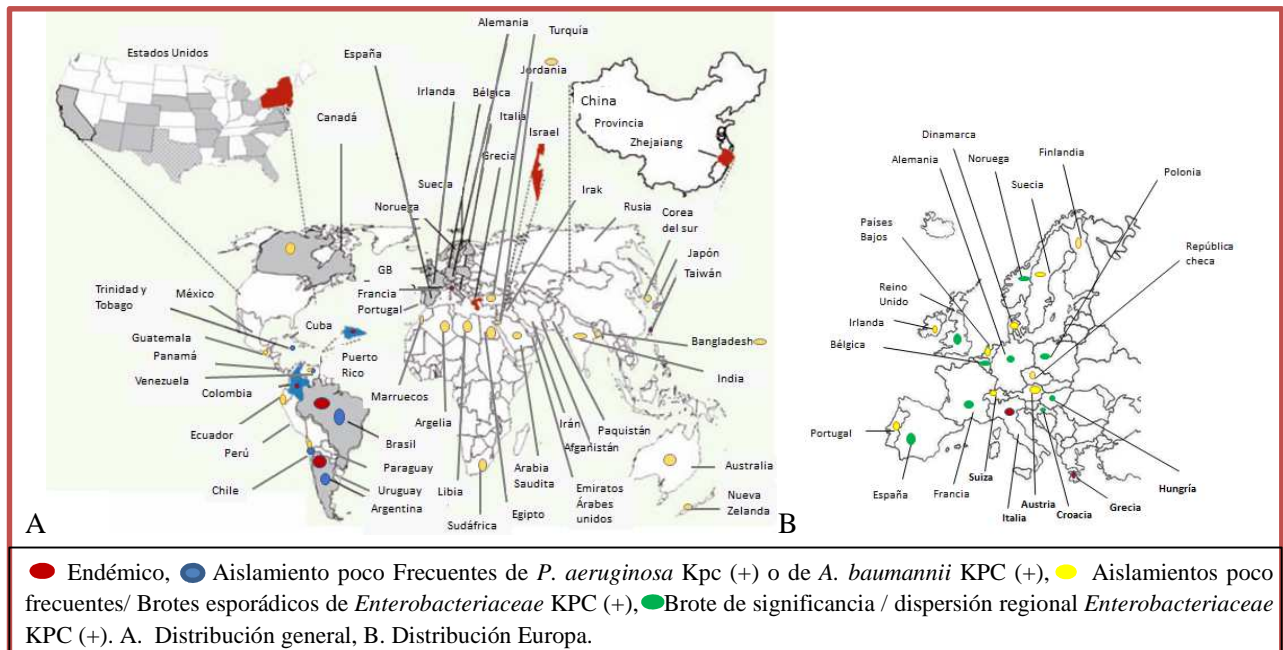


Figura 1. Distribución geográfica mundial de los productores de KPC. Adaptado de (19,21,25–29).

Los productores de KPC han sido reportados con mayor frecuencia en aislamientos nosocomiales en *K. pneumoniae* y en una población mucho menor de *E. coli* y de otras *Enterobacteriaceae*. Se han reportado el 37% de pacientes en unidad de cuidados intensivos (UCI) con *bla*_{KPC}, según la Sociedad para la Epidemiología de la Salud de América (16,26).

En Colombia se reportó la enzima tipo KPC por primera vez en el 2006(25) y se presentó el primer brote suramericano de *K. pneumoniae* productor de enzimas tipo KPC-3 el cual inició con un paciente proveniente de Israel(30,31). Adicionalmente se reportó un aumento de <1% en el 2006 a 6% en el 2009 de la incidencia de infecciones por microorganismos productores de enzimas tipo KPC que se asoció con la diseminación clonal de KPC-3 y policlonal de KPC2 (30). El comportamiento clínico de los aislamientos productores de KPC-2 y KPC-3 son diferentes y las diferencias incluyen la resistencia a aminoglucósidos y la capacidad de formar biopelículas (16).

Carbapenemasas Clase B

Las enzimas de la clase B o metalo- β -lactamasas, se inhiben con EDTA y utilizan Zinc en su sitio activo. Usualmente son resistentes a penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos e inhibidores de β -lactamasas y no hidrolizan Aztreonam. Las carbapenemasas más frecuentes de este grupo son IMP, VIM y NDM y se han encontrado en *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (15,19). Entre las metalo- β -lactamasas, los VIM y los NDM son los más prevalentes en la mundo (27).

Las metalo- β -lactamasas son transferibles puesto que la mayoría se encuentran en casetes localizados principalmente en integrones tipo 1 como en el caso de la VIM y, en algunas ocasiones, se encuentran en plásmidos o transposones como en el caso de NDM. Estos integrones incluyen muchos otros genes de resistencia, que contribuyen a la multiresistencia de las cepas, incluso su panresistencia (15,27,32). La tasas de mortalidad asociadas con los productores de MBL oscilan entre 18% y 67% (26).

IMP

La enzima IMP se identificaron por primera vez en especies de *Enterobacteriaceae* (*Serratia* spp., *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp.) y *P. aeruginosa* a nivel hospitalario en Japón, asociado con un brote mediado por plásmidos en 7 hospitales japoneses y en la actualidad han sido reportados 52 variantes de genes IMP identificados en múltiples especies a nivel mundial (19,27,29). También se ha identificado en *A. baumannii*, *A. junni*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Providencia rettgeri* (27).

IMP han sido descritos a nivel Mundial encontrándose en Japón, Brasil, Puerto rico, Turquía, India, México, Costa rica, Colombia (*P. rettgeri*), Perú, Argentina, Venezuela, Estados unidos, Libano, Turquía, China, Taiwán, Tailandia, Australia, Singapore, Reino Unido, España, Grecia y Albania (27,29,33,34). En *Enterobacteriaceae* son endémicas en Japón, Taiwán y Grecia (29).

VIM

La primera VIM-1 en *P. aeruginosa* fue reportada en 1996 en Italia y VIM-2 en Marsella Francia en 1997 (19)(29). A finales de los años noventa y principios de los años 2000, hubo varios informes de MBLs tipo VIM en *Enterobacteriaceae* (29). En el 2015 se identificó la VIM-39 como un nuevo miembro de tipo bla_{VIM-1} que hidroliza meropenem, doripenem e imipenem más eficientemente que VIM-1 (35). Actualmente, VIM-2 es la variante más común a nivel mundial en *Enterobacteriaceae*. También se han reportado en *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fulva*, *K. pneumonia*, *Enterobacter* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *C. freundii*, *P. rettgeri*, *S. marcescens*, *A. baumannii* (27,29).

En *P. aeruginosa* VIM-1 y VIM-2 se reportaron como causantes de numerosas infecciones nosocomiales en Italia y Grecia. VIM-2 también se ha aislados en España, Alemania, Portugal, Polonia, Rusia, Irlanda, Turquía, Venezuela, Corea, Japón, Arabia Saudita, China, India, los EE.UU, Colombia, México, Argentina, Brasil y Canadá (33,34). Estas enzimas se extienden por todo Europa causando muchos brotes en Países mediterráneos como Grecia, Italia y Turquía (28).

En *Enterobacteriaceae* se han reportado en Estados Unidos, México, Venezuela, Colombia, Argentina, Argelia, Túnez, Turquía, Corea del Sur, Taiwán, India y Japón (29). En Colombia se han descritos VIM8- en *P. aeruginosa* y VIM-24 en *K. pneumoniae* (27).

NDM-1

La metalo- β -lactamasa NDM-1 fue identificada por primera vez en Suecia en dos cepas un paciente de Nueva Delhi a principios de 2007, una cepa *K. pneumoniae* y una *E. coli* NDM-1, ambas cepas fueron resistentes a múltiples antibióticos (19,36). El análisis genético mostró un plásmido con el gen de resistencia bla_{NDM-1} lo que le permite moverse fácilmente a otros microorganismos a través de transferencia horizontal de genes (3,19,36). Posteriormente, se identificaron en cepas de *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* y *Enterobacter cloacae*. La identificación en el 2009 de una cepa de *Acinetobacter baumannii* NDM-1 en la India indica el cruce de la barrera de especies de este gen (19). También se han

reportado en *P. aeruginosa*, *P. rettgeri*, *M. morgani*, *S. fonticola*, *Acinetobacter* (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. faecalis*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. junii*), *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *P. mirabilis*.

En los últimos años se identificaron 17 nuevas variantes de NDM, las variantes NDM-1 (variante principal), NDM-2, NDM-3, NDM-4 y NDM-5 (variantes menores), se han informado en todo el mundo(3,35).

Esta enzima ha sido reportada en New Delhi, en el Medio Oriente, en Europa, Italia y Balcanes, Suramérica, Norteamérica, Centroamérica, África, Asia, Oceanía, (27–29,36). Más de 90 casos se han detectado en los Estados Unidos (16); India, Reino Unido, (36). NDM-4 se ha reportado en el subcontinente Europeo en Italia, mientras que NDM-5 y NDM-7 son frecuentes en Dinamarca y Francia. También se informa que la NDM-5 se encontró en Argelia(3)(figura 2).

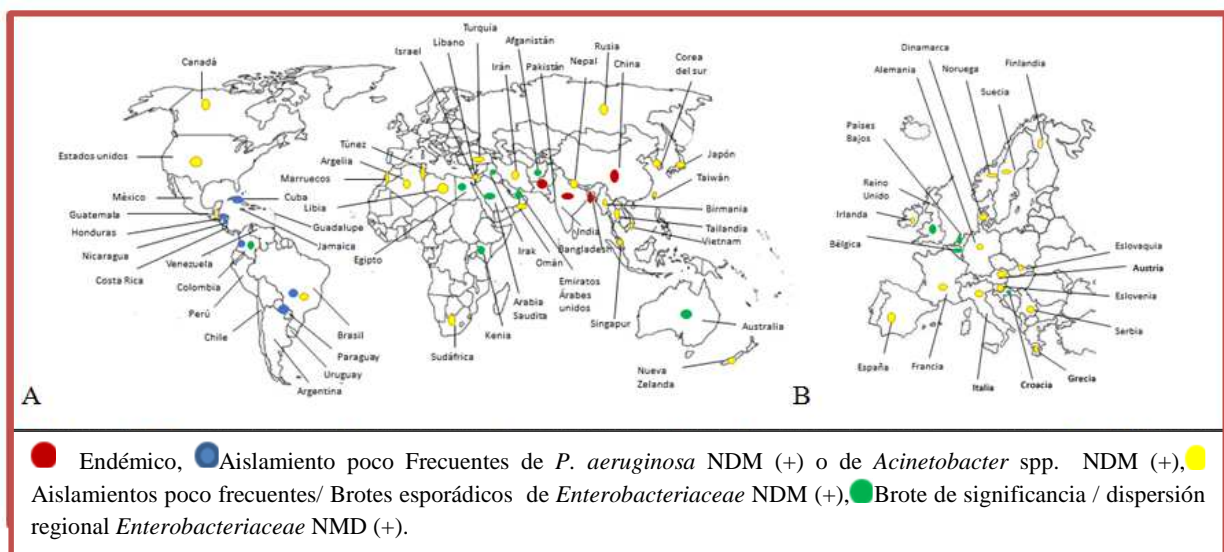


Figura 2. Distribución geográfica mundial de los productores de NDM. Adaptado de (27–29,36).

En el continente asiático se ha reportado el 58,15% de productores de NDM-1, en Europa el 16.8%, en el continente americano y África 10,8%, y en Australia el 1,6% (3).

En un estudio realizado acerca de la incidencia global de las carbapenemasas tipo MBL entre 2012 y 2014 en 38.266 aislados de *Enterobacteriaceae* recogidos en 40 países de cada continente habitado, se encontró que aunque la incidencia global de presencia de MBL es baja (0,5%, 163 / 38,266), la diseminación es alta (85%, 34/40 países) siendo *bla*_{NDM-1} el más común (36,8%, 60/163) (35).

Carbapenemasas Clase C

Las β -lactamasas de clase C no son inhibidas por el ácido clavulánico, confieren resistencia a todas las penicilinas y cefalosporina, incluida las cefamicinas. La enzima de clase C clínicamente más importan es AmpC, que puede ser cromosomal o plasmídica , por ejemplo *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Providencia* spp., *Morganella morganii* y *P. aeruginosa* tiene un AmpC cromosomal (17). La sobreexpresión de estas β -lactamasas en combinación con otros mecanismos de resistencia pueden causar resistencia a carbapenémicos (3,16).

CMY-10 se identificó en *Enterobacter aerogenes*, es mediada por plásmido, la cual es una cefalosporinasa con algunas propiedades de carbapenemasa (37). La β -lactamasa CMY-10 confiere resistencia a la cefoxitina y cefotetan, penicilinas, oximino-cefalosporinas e hidroliza imipenem a niveles similares a las carbapenemasas de la clase A, B y D por lo que se considera una carbapenemasa. Sin embargo, la ausencia de métodos de detección de las carbapenemasas de clase C dificultan el control de la infección hospitalaria (38).

Análisis estructurales demostraron que el espectro de sustrato de CMY-10 se extiende a oximino-cefalosporinas y carbapenémicos debido al ensanchamiento del sitio activo mediante la delección de tres aminoácidos en R2 (39). Se han encontrado en aislados de *Enterobacter aerogenes* y *K. pneumoniae* en Corea del Sur (37).

Carbapenemasas Clase D

Las β -lactamasas de clase D llamadas oxacilinasas hidrolizan oxacilina (15,17). La actividad de hidrólisis de estas enzimas para los carbapenémicos es menor que las metalo- β -lactamasas, hidrolizan débilmente imipenem y meropenem, no hidrolizan ni cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam, a excepción de OXA 27, y todas son predominantemente penicilinasas con gran poder hidrolítico frente a oxacilina. Además, son inhibidas por el ácido clavulánico, a excepción de OXA 23 que es resistente. La mayoría de los genes que codifican estas β -lactamasas son plasmídicos, garantizando así su difusión efectiva. La sobreexpresión de oxacilinasas naturales en *A. baumannii* (Tipo OXA-51) puede contribuir a la resistencia a carbapenémicos (19,32).

OXA-48 está contenido en un plásmido IncL conjugativo de 61,8 kb (previamente identificado como un plásmido de ≈ 70 kb) con integración del *bla*_{OXA-48} mediante la adquisición de un transposón compuesto Tn1999, lo que probablemente contribuye a su capacidad de propagación en *Enterobacteriaceae* (26,29).

El primer productor identificado de OXA-48 fue *K. pneumoniae* aislado en Turquía en 2001, conocida como la "amenaza fantasma", no fue aislada en otro país por los próximos 5 años y en 2008, OXA-48 se extendió fuera de Turquía (36). De las más de 100 β -lactamasas tipo OXA, 37 se consideran carbapenemasas, entre ellas OXA-23 a OXA-27, OXA-40, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-55 o OXA-58, se han identificado especialmente en *Acinetobacter* spp. Se han detectado en *Enterobacteriaceae* OXA-48 en *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Raoultella planticola* y *Salmonella entérica* (36,40). OXA-23 en *Proteus mirabilis*, en *P. aeruginosa* se han detectado enzimas cromosómicas tipo OXA-50-like sin trascendencia clínica. Algunas presentan especificidad de especie, como la familia de la OXA-60 presente en el genoma de *Ralstonia pickettii* (40).

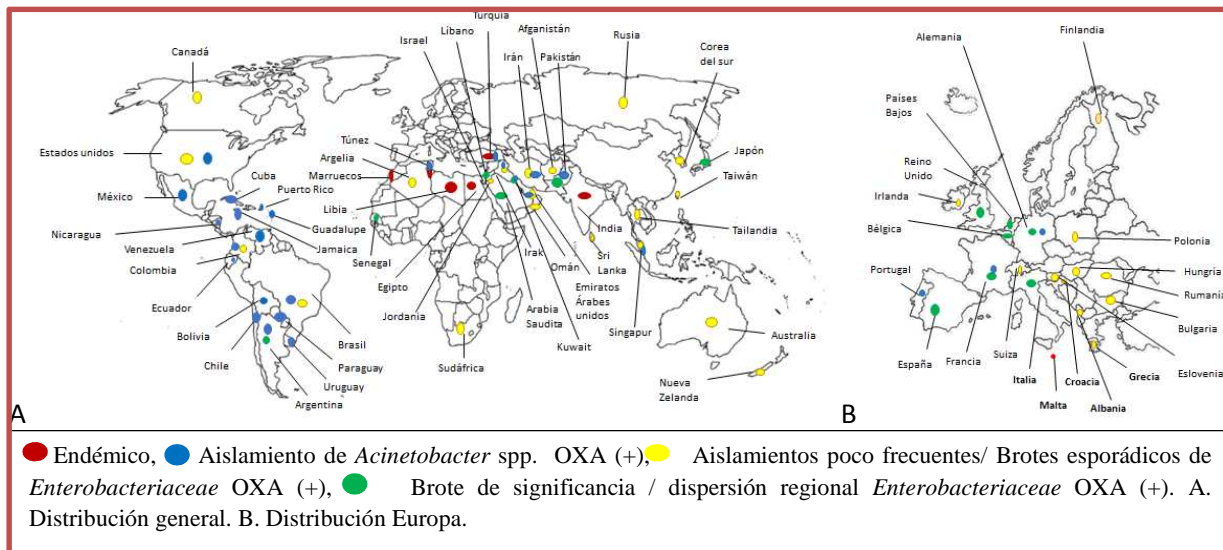


Figura 3. Distribución geográfica mundial de los productores de OXA. Adaptado de (26,28,29,34,36,41,42)

En su distribución mundial incluye ahora Países de Europa, en la parte meridional y oriental, Mar Mediterráneo, Medio oriente, África, Francia, Alemania, España, Países Bajos y el Reino Unido (26,28). Más recientemente, OXA-48 fue detectado en los Estados Unidos, Canadá y Sudáfrica (36). La OXA-25 y OXA-40 se han descrito en España (40). OXA-23 fue detectada en Argentina (63% de aislamientos resistentes a carbapenémicos), Brasil (42-100%) y Colombia (98%)(41). El gen OXA-58 en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia y Venezuela (34)(Figura 3).

Herramientas diagnósticas disponibles para detectar carbapenemasas.

Como se mencionó anteriormente, debido al aumento de la diseminación de las carbapenemasas, es necesario su detección oportuna para seleccionar el esquema terapéutico adecuado y para implementar medidas de control. Esta detección no sólo puede estar basada en la disminución de la susceptibilidad a los carbapenémicos sino que debe incluir técnicas confirmatorias ya sean fenotípicas (42), o pruebas moleculares, además de estudios de epidemiología molecular para su seguimiento. A continuación, se describirán las técnicas utilizadas para su diagnóstico y seguimiento.

Pruebas fenotípicas

Prueba de susceptibilidad:

Las pruebas de susceptibilidad nos permite identificar los aislamientos que presentan una susceptibilidad reducida a los antibióticos carbapenémicos (11). Este método requiere de 24 – 48 horas de incubación posterior a la identificación del microorganismo para la obtención de resultados (11).

Las pruebas de susceptibilidad pueden realizarse por tres metodologías diferentes:

1. Difusión en agar: el método convencional de difusión en disco es un método cualitativo que consiste en utilizar discos de papel filtro impregnados con el antibiótico a una concentración fija, los cuales posteriormente, se colocan en la superficie de un agar Müller Hinton, en el que previamente se colocó el microorganismo a estudiar a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland y finalmente incubado a 35-37°C. Una vez el disco se pone en contacto con el agar el antibiótico se difunde por el agar formándose un halo de inhibición. A través de la medición de este halo en mm que aparece después de 24 – 48 horas de incubación se categoriza el resultado como susceptible, intermedio o resistente frente a cada antimicrobiano (43,44).

1. Método de gradiente de antibiótico: Es un método cuantitativo que nos permite determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) utilizando una tira de plástico que tiene un gradiente predefinido del antibiótico con 15 diluciones. La tira se coloca en el agar en el que previamente se inculó el microorganismo a evaluar, el antibiótico que está en la tira se difunde desde el soporte hasta el agar creando un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico que están en la tira. Después de una incubación de 16 a 20 horas se observa una zona de inhibición elipsoidal, la CIM será indicada por el valor donde la elipse toca la tira y el resultado será categorizado como sensible, intermedio o resistente (44).

3. Microdilución en caldo: Es un método cuantitativo que consiste en exponer al microorganismo a evaluar a diferentes concentraciones del antibiótico en caldo y observar el crecimiento del microorganismo después de la incubación para definir la CIM. La mínima concentración del antibiótico donde no se observa crecimiento visible corresponde a la CIM y el resultado será categorizado como sensible, intermedio o resistente de acuerdo a los puntos de corte (44). Esta metodología puede realizarse manualmente o utilizando múltiples sistemas automatizados comerciales disponibles [Sistemas VITEK® de bioMérieux (Marcy L'Etoile, Francia), Phoenix™ de BD Diagnostics y MicroScan WalkAway de Siemens (Dade Behring, West Sacramento, CA)] (43,45).

Se puede sospechar que un aislamiento produce una carbapenemasa cuando hay un aumento de la CMI en los carbapenémicos o una disminución en el diámetro de la zona de inhibición, de acuerdo a la metodología utilizada. En algunos casos, estos resultados pueden variar de acuerdo al tipo de carbapenemasa presente en el microorganismo. En el caso de las *Enterobacteriaceae*, Ertapenem se ha descrito como un buen candidato para detectar la mayoría de los productores de carbapenemasa porque los valores de MIC de este antibiótico son generalmente más altos que los CIMs de otros carbapenémicos. Sin embargo los productores de carbapenemasa en *Enterobacteriaceae* muestran una amplia gama de valores de CIMs que a veces pueden estar dentro del rango de susceptibilidad, especialmente en las enzimas tipo OXA-48 / OXA-181(42).

El nivel de resistencia a carbapenémicos de los productores de enzimas tipo KPC, MBL y NDM pueden variar notablemente (Tabla 3). Las CIMs de las enzimas tipo KPC pueden variar de moderadamente aumentado (2 a 4 ug/ml) a resistente (≥ 32 ug/ml) (Tabla 3). Debido a que son resistentes a múltiples fármacos además de los carbapenémicos, como, cefalosporinas de espectro extendido y aztreonam, las opciones terapéuticas son limitadas y la tasa de mortalidad asociada a las infecciones con aislamientos productores de KPC es mayor al 50% (26). Muchos productores de NDM-1 siguen siendo susceptibles sólo a tigeciclina, colistina y en una menor medida a la fosfomicina (26).

Tabla 3. Variabilidad de la resistencia a carbapenémicos en Gram negativos productores de carbapenemasas (19,26).

	CIM (mg/l)		
	<u>Imipenem</u>	<u>Meropenem</u>	<u>Ertapenem</u>
<u>Enterobacteriaceae KPC</u>	<u>0,5; >64</u>	<u>1; 64</u>	<u>0,5; >64</u>
<u>Enterobacteriaceae MBL</u>	<u>0,5; >64</u>	<u>0,25; >64</u>	<u>0,5; >32</u>
<u>Enterobacteriaceae OXA-48</u>	<u>1; >64</u>	<u>0,5; >64</u>	<u>0,25; >64</u>
<u>P. aeruginosa MBL</u>	<u>2; >64</u>	<u>2; >64</u>	-
<u>P. aeruginosa KPC</u>	<u>>64</u>	<u>>64</u>	-
<u>A.baumannii MBL</u>	<u>2; >64</u>	<u>2; >64</u>	-
<u>A.baumannii OXA</u>	<u>1; >64</u>	<u>1; >64</u>	-
<u>A.baumannii KPC</u>	<u>≥32</u>	<u>≥32</u>	-

La enzima tipo OXA-48 en *Enterobacteriaceae* hidrolizan débilmente carbapenémicos como imipenem y meropenem y cefalosporinas de amplio espectro, como la ceftazidima, y aztreonam por lo que son los productores de carbapenemasa más difíciles de identificar (Tabla 3)(26). Su actividad es inhibida por el ácido clavulánico, una propiedad poco común de oxacilinasas, excepto OXA-23, que es resistente al ácido clavulánico. OXA-24 y OXA-27 hidrolizan bencilpenicilina y cefaloridina, mientras que la hidrólisis de oxacilina y la cloxacilina no es detectable (46).

Una vez detectada una susceptibilidad reducida del microorganismo a los antibióticos probados se puede utilizar pruebas adicionales para confirmar fenotipos de interés como las carbapenemasas (11). Entre los métodos más usado y recomendados por las guías de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, por su sigla en inglés) para la detección de la producción de carbapenemasa están el test de hodge modificado, carba NP y el método de Inactivación de Carbapenémicos Modificado (47).

Test de Hodge Modificado (THM)

El test de Hodge fue desarrollado inicialmente por Hodge y col en 1978 para detectar la enzima tipo penicilinasa en *Neisseria gonorrhoeae* y otras especies de bacterias y se realizaba con una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a la penicilina sembrada masivamente en el agar, un disco de penicilina (10 U) colocado en la mitad del agar y el microorganismo a evaluar que se raya del borde del disco al extremo de la caja; las cepas productoras de penicilinasa distorsionaron la zona de inhibición (48). La prueba de Hodge fue modificada por Lee y col en el 2001, se modificó reemplazando la cepa de *Staphylococcus aureus* por la *Escherichia coli* ATCC 25922 y el disco de penicilina por el disco de imipenem de 10µg; la presencia de una zona de inhibición distorsionada después la incubación durante la noche se interpretó como una prueba de test de Hodge modificado positivo (49,50).

Esta prueba se basa en la inactivación del carbapenémicos por la carbapenemasa producida por una bacteria, lo que permite a una cepa indicadora y sensible a las carbapenemasas extender su crecimiento cerca del disco del carbapenémicos y a lo largo de la estría de la cepa productora de la carbapenemasa (Figura 4).

CLSI recomienda utilizar el test con discos de Ertapenem o Meropenem porque cuando se utiliza Imipenem como sustrato no funciona adecuadamente. Otra recomendación es realizar este método para *Enterobacteriaceae* que son no susceptibles a uno o más carbapenémicos o tienen el CIM de imipenem o meropenem 2 – 4 µg/ml o ertapenem de 2 µg/ml (11,16,47,51). Si el THM es positivo, no es necesario cambiar la interpretación de los carbapenémicos a resistente (47).

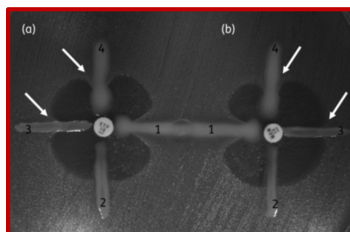


Figura 4. Test de Hodge modificado. Detección de carbapenemasas. Discos de ertapenem (a) y meropenem (b). 1, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, resultado positivo; 2, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, resultado negativo; 3,

aislado clínico de *K. pneumoniae* que produce CTX-M; 4, aislamiento clínico de *K. pneumoniae* productor de KPC. Las flechas indican el tamaño de la zona de inhibición distorsionada cuando se probó el aislados 4 productor de carbapenemasa y el aislado 3 no productor de carbapenemasa. Tomado de Carvalhaes, 2009 (52).

El test de Hodge es un método económico ya que no se requiere medios o reactivos especiales (47,53). Se ha reportado que tiene una sensibilidad del 63% y especificidad del 60% para la detección de productores de KPC en BGN (54).

Limitaciones de la prueba:

- Resultados falsos-positivos pueden ocurrir en aislados que producen BLEE como enzimas tipo CTX-M (figura 6) o AmpC con pérdida de porinas. Falsos negativos son ocasionalmente notados (ejemplo, algunos aislados que producen NDM) (42,47,52).
- El *European Committee for Antimicrobial Suceptibility Testing* (EUCAST, por su sigla en inglés) no recomienda su utilización por su baja especificidad y por la dificultad en la interpretación de los resultados en bacterias que tienen mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos diferentes a las cabapenemasas (50,51).
- Se puede presentar un elevado número de errores en los resultados causados por la falta de experticia del personal del laboratorio en la interpretación de la técnica (55).
- Se requiere de 24 a 48 horas para el resultado después de tener el aislamiento (47).
- Un resultado positivo no puede distinguir que tipo de carbapenemasa tiene el microorganismo (11).
- La sensibilidad disminuye cuando se prueban aislamientos productores de enzimas tipo VIM, OXA.48 y NDM-1 (56).

Carba NP

Las pruebas colorimétricas se han utilizado para la detección en *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* de cepas productoras de β -lactamasas, basado en rojo de fenol, el cambio de color de rojo a amarillo indicaba la presencia de una β -lactamasa (11). La prueba carba NP fue

desarrollada en el 2012 Nordmann y col es una modificación de la prueba para la detección de β -lactamasa y se utiliza para la detección de carbapenemasas (clase A, B o D) (11,57). El cultivo bacteriano se mezcla con una solución de lisis, la bacteria lisada se mezcla con el rojo de fenol, sulfato de Zinc e imipenem (11,58).

El principio se basa en la detección colorimétrica de la hidrólisis del anillo β -lactámico de imipenem en la cepa ensayada, seguido por cambio de color rojo a amarillo/naranja de un indicador de pH, generalmente rojo fenol del rojo al amarillo / naranja; disminuye el tiempo de obtención de resultados a menos de 2 horas (42,47,51) (Tabla 4).

La prueba Carba-NP se utiliza en *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa* que son no susceptibles a uno o más Carbapenémicos o tienen el MIC de imipenem o meropenem 2 – 4 $\mu\text{g/mL}$ o ertapenem de 2 $\mu\text{g/mL}$ (42,47).

Tabla 4. Interpretación de resultado Carba NP. Adaptado de CLSI 2017 (48)

Resultados de pacientes y del tubo de control interno		
Tubo A (control interno)	Tubo B (paciente)	Interpretación
Rojo o rojo-naranja	Rojo o rojo-naranja	Negativo, no detección de carbapenemasa
Rojo o rojo-naranja	Naranja claro, amarillo o amarillo oscuro	Positivo, Productor de carbapenemasa
Rojo o rojo-naranja	Naranja	Invalido
Naranja, naranja claro, amarillo o amarillo oscuro	Cualquier color	Invalido

La recomendación de CLSI es si la prueba es positiva, se reporta con un pie de nota informando que el aislado es productor de carbapenemasa, si la prueba es negativa se reporta como carbapenemasa no detectada (47).

La especificidad y la sensibilidad de la prueba es del 100 y 94,4% respectivamente en *Pseudomonas* spp., mientras que la especificidad y la sensibilidad es del 100% en

Enterobacteriaceae (42). Es altamente sensible para la detección de enzimas tipo KPC y MBL (58) y es método producible si se utiliza un único método estandarizado en los laboratorios (59).

Carba NP ha sido probado para la detección de productores de carbapenemasa en hemocultivo, lo que disminuye el tiempo de detección en hemocultivos de 24 h a 3-5 h con una sensibilidad del 97.9% y especificidad del 100% (60). Está disponible una nueva versión comercial de la prueba CARBA NP (RAPIDEC® CARBA NP, bioMérieux), con una especificidad y sensibilidad de 96% (61,62).

Limitaciones de la prueba:

- Resultados falsos negativos en aislados mucoides y en ciertos tipos de carbapenemasas OXA, como tipo OXA-48 en *A. baumannii*, no son consistentemente detectadas por su baja sensibilidad para este tipo de enzimas (11,47,51,59).
- La prueba descrita por CLSI necesita reactivos especiales, algunos de los cuales necesitan prepararse en el laboratorio y tienen una corta vida media (47,51).
- Resultados inválidos pueden ocurrir con algunos aislados (47,51).
- Un resultado positivo no puede distinguir que tipo de carbapenemasa tiene el microorganismo.
- En el RAPIDEC® CARBA NP: Falsos positivos han sido reportados con *A. baumannii* con sobreproducción de sus AmpC y *P. vulgaris* con una enzima tipo CMY-2 (62).

Método de Inactivación de Carbapenémicos Modificado (mCIM)

El método de inactivación de carbapenémicos es una técnica que utiliza un disco de meropenem de 10 µg el cual es expuesto a una suspensión bacteriana de la cepa a evaluar; después de un tiempo de incubación el disco es colocado en una caja de agar el cual tiene sembrada previamente una cepa indicadora *E.coli* ATCC 25922; cuando se produce una carbapenemasa, el antibiótico es inactivado permitiendo el crecimiento sin inhibir de la cepa indicadora después de una incubación durante la noche. Se consideró que una zona de inhibición clara (≥ 19 mm) es indicativa de actividad no-carbapenemasa (47,63,64).

Este método es recomendado por CLSI 2017 para *Enterobacteriaceae* que son no susceptibles a uno o más Carbapenémicos. Detecta la hidrólisis de carbapenémicos (inactivación), lo que indica la presencia o ausencia de carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP u OXA-48, con una sensibilidad del 85.7% y especificidad del 95.7% (47,65).

Si las carbapenemasas están presentes, hidrolizan el meropenem dentro del disco. La no inhibición del crecimiento de *E. coli* indica que se produjo la hidrólisis de carbapenémico y el organismo de interés es productor de carbapenemasa (66).



Figura 5. Interpretación del resultado mCIM. Tomado de Van Der Zwaluw(65)

Si la prueba es positiva se reporta como productor de carbapenemasa y no es necesario cambiar la interpretación de la susceptibilidad de los carbapenémicos. Si la prueba es negativa se debe reportar como no carbapenemasa detectada (47).

El método de inactivación con carbapenémico es comparable en términos de costos al THM (66). Es un método económico y fácil de realizar debido a que no requiere equipos ni reactivos específicos (47,64,65) y varios aislamientos pueden ser probados en la misma caja de agar al tiempo (65).

Limitaciones:

- Requiere una incubación prolongada en la preparación de la prueba y se requiere de 18 - 24 horas de incubación para obtener el resultado (47).
- El protocolo no es práctico para el flujo de trabajo diario del laboratorio (65).
- Un resultado positivo no puede distinguir que tipo de carbapenemasa tiene el microorganismo.

Pruebas de doble disco combinado

Las pruebas de doble disco combinado son pruebas fenotípicas con inhibidores para la detección de carbapenemasas, las cuales utilizan el carbapenémico solo comparado con el carbapenémico combinado con un inhibidor de la carbapenemasa y se observa in vitro si se presenta un aumento del diámetro de la zona de inhibición del aislado en presencia del carbapenémico combinado con un inhibidor de la carbapenemasa (42).

La prueba de disco combinado para la detección en *Enterobacteriaceae* de la enzima clase A se hace utilizando compuestos de ácido borónico, generalmente el ácido 3 - aminofenilborónico (PBA, por su sigla en inglés) y un disco del antibiótico carbapenémico. La prueba requiere de 18 - 24 horas de incubación para obtener el resultado y se hace a partir del microorganismo aislado (67).

Un aumento en el diámetro de la zona de inhibición por 4-7 mm con un disco de meropenem con o sin 400 µg de PBA indica la producción de carbapenemasas clase A. Se recomienda utilizar imipenem o meropenem, si se utiliza ertapenem se producen resultados falsos positivos en cepas productoras de AmpC y algunas de las ESBL del tipo CTX-M que disminuyen la especificidad de la prueba (42).

Para la detección de cepas productoras de carbapenemasas de clase B tipo MBL en *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. se utilizan ensayos con imipenem 10 µg y el ácido etilendiaminotetraacético (750 µg EDTA, por su sigla en inglés), que es el inhibidor. Se requiere de 16 – 18 horas de incubación para obtener el resultado a partir del microorganismo aislado (68). Un aumento de 7 mm en el diámetro de la zona de inhibición en el discos con EDTA indica la producción de la carbapenemasa (42).

La prueba de EDTA no se recomienda para la detección de MBLs en *Enterobacteriaceae* con baja resistencia a imipenem (MIC \leq 4mg/L). En *A. baumannii*, algunos estudios han reportado fallo de las pruebas de inhibición de EDTA para detectar MBL, mientras que otros han informado la posibilidad de falsos resultados positivos en cepas que producen OXA-23 (42).

La presencia de mecanismos mixtos de resistencia como carbapenemasas, BLEE y/o AmpC más pérdida de porinas u otros dificultan las técnicas de confirmación fenotípica (69). Se encuentran frecuentemente aislados de cepas productoras de AmpC que presentan una reducción de la susceptibilidad a los carbapenémicos pero que no presentan genes codificadores de la carbapenemasa por lo que es también necesario realizar pruebas de resistencia a cefoxitin para la detección de cepas productoras de β -lactamsas AmpC (70,71). La prueba se realiza con un disco de cefoxitin (30 μ g) el cual se coloca en el agar previamente inoculado con la cepa a evaluar, un halo de inhibición de menos de 18 mm es tomado como un posible AmpC; también se puede demostrar por el método de doble disco la inducción de AmpC utilizando los discos de ceftazidime y cefoxitin, si hay una AmpC inducible se observa un bloqueo de la zona de inhibición del disco de ceftazidima por la cefoxitina (72).

Limitaciones de la prueba:

- Se requiere de 16 – 18 horas de incubación para obtener el resultado (68).
- EDTA en sí puede inhibir algunas bacterias debido a la permeabilidad aumentada de la membrana externa, dando lugar a falsos resultados positivos(42,73).
- Se ha reportado en cepas *K. pneumoniae* productoras de KPC y de VIM fallos en prueba de PBA para la detección de la KPC (42).
- PBA presenta baja especificidad por los falsos positivos que se producen en cepas productoras de AmpC más disminución de permeabilidad por pérdida de porinas (69).

Método gravimétrico

Para la detección de las metalo- β -lactamasa también se utiliza el método gravimétrico, comercialmente se encuentran el Etest® que utiliza una tira de plástico que tiene en un extremo un gradiente predefinido del antibiótico con las diluciones del carbapenémico y en el otro extremo un gradiente predefinido del antibiótico con las diluciones del carbapenémico combinados con EDTA para probar la actividad de la metalo- β -lactamasa (42,44). La tira se

coloca en el agar en el que previamente se inoculó el microorganismo a evaluar, el antibiótico que está en la tira se difunde desde el soporte hasta el agar creando un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico que están en la tira. Después de una incubación de 16 a 20 horas se observa una zona de inhibición elipsoidal (44,74).

Las tiras para detectar MBL son ETEST® MBL que utiliza imipenem / imipenem + EDTA (IP/IPI, bioMérieux) y ETEST® MBL que utiliza meropenem / meropenem + EDTA (MBL MP/MPI, bioMérieux), se compara la inhibición diferencial de las escalas de concentración inhibitoria (IC) de un solo carbapenémico relativa al mismo carbapenémico más EDTA en presencia de un MBL. ETEST® MBL IP / IPI, contienen un rango de siete diluciones de imipenem (4-256 mg / ml) en un extremo e imipenem (1-64 mg / ml) combinado con una concentración fija de EDTA en el otro extremo; se utiliza principalmente para detectar MBL en *Pseudomonas* spp. y la mayoría *Acinetobacter* spp. ETEST® MBL MP / MPI contienen concentraciones crecientes de meropenem (0.125-8 mg / mL) en un extremo y meropenem (0.032-2 mg / mL) con EDTA (concentración fija) en el otro; está diseñado para detectar MBL en *Enterobacteriaceae* (75,76).

La reducción de ≥ 3 diluciones dobles de la MIC de carbapenémico en la presencia del inhibidor o la presencia de una elipse deformada en el lado IPI o MPI de la tira se interpreta como positivo para MBL con una sensibilidades (82,0-94,0%) y especificidades (97,0-100%). El E-test® de MBL es eficiente en la detección de los productores de MBL que muestran resistencia de alto nivel (74,77,78). Es altamente sensible y específica para detectar *bla*_{IMP-1} y *bla*_{VIM-2} aislados de *Acinetobacter* spp. y especies de *Pseudomonas* spp. (45).

Limitaciones de la prueba:

- Tiene un tiempo de respuesta muy largo, ya que no se puede disponer del resultados hasta las 24 horas(79).
- Puede no detectar productores MBL de bajo nivel de resistencia al imipenem como aislamientos productores de NDM-1 (77,79,80).

Medios de cultivo cromogénicos

Se utilizan como métodos de vigilancia en las instituciones clínicas para la detección en muestras de pacientes de hisopado perianal o rectal de pacientes colonizados con cepas productoras de carbapenemasas, lo que permite implementar medidas de control de la infección rápidamente(42)(45). Varios medios cromogénicos comerciales están disponibles para la detección de aislamientos productores de carbapenemasa; los medios contienen moléculas cromogénicas que permiten observar diferentes colores después de 24 h de incubación que contribuyen a la detección rápida de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémico (42,81).

El medio CHROMagarTM KPC (CHROMagar, París, Francia) permite la recuperación de *Enterobacteriaceae* productoras de KPC, IMP o VIM, es un medio fuerte para la detección de carbapenemasas en cepas con CIM >16 µg/ml a carbapenémicos (42,45).

Otro medio para la detección de *Enterobacteriaceae* productora de carbapenemasa es chromID[®] Carba (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, Francia). Este medio inhibe crecimiento de organismos Gram positivos y bacterias sensibles al carbapenémico, y produce colores específicos de colonias que permiten la diferenciación de aislamientos no sensibles a los carbapenémicos en *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y *Citrobacter* spp. (42,45). El agar chromID[®] OXA-48 (bioMérieux) se introdujo para resolver el problema de detección de OXA-48 que tiene el chromID[®] Carba, este medio tiene una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *Enterobacteriaceae* productoras de OXA-48 (45).

El medio BrillianceTM CRE inhibe el crecimiento de los aislamientos susceptibles a carbapenémicos y permite el crecimiento de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas tipo OXA-48, VIM, KPC, NDM y GIM resistentes a carbapenémicos incluso con bajos límites de detección(45).

Un medio de agar selectivo y cromogénico, CHROMagarTM *Acinetobacter* (CHROMagar, París, Francia), se ha desarrollado para la identificación rápida de *A. baumannii* resistente a múltiples

fármacos. Contiene agentes que inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos, levaduras y bacilos Gram negativos sensibles a carbapenémico(42).

Diferentes medios cromogénicos han sido comercializado y evaluados en los últimos años: ChromID[®] CARBA, ChromID[®] CARBA SMART, ChromID[®] OXA - 48 (bioMérieux), Brilliance[™] CRE (Oxoid), Colorex[™] KPC (Biomed Diagnostics), CHROMagar[™] KPC (CHROMagar Company), Remel Spectra[™] CRE (Remel), RambaCHROM KPC (Gibson Bioscience), HardyCHROM[™] CRE (Hardy Diagnostics). En la evaluación de los agares en múltiples estudios se ha encontrado una especificidad aceptable pero una sensibilidad entre el 53– 100% (Tabla 5) (76).

Tabla 5. Comparación medios cromogénicos. Tomado de Aguirre 2017 (77).

Medio cromogénico	Compañía	Sensibilidad	Especificidad
ChromID[®] CARBA	bioMérieux	33.3 - 100	54.1 – 98.9
ChromID[®] OXA-48 CARBA	bioMérieux	70.1 – 75.8	99.3 - 100
Brilliance[™] CRE	Oxoid	54.0 – 80.0	23.0 – 94.7
Colorex[™] KPC	Biomed Diagnostics	64.1 - 100	59 - 92.1
CHROMagar[™] KPC	CHROMagar	40.3 - 100	67.8 – 98.4
Remel Spectra[™] CRE	Remel	97.8	86.4 – 99.1
RambaCHROM KPC	Gibson Bioscience	95.0	77.1
HardyCHROM[™] CRE	Hardy Diagnostics	No definido	No definido

Limitaciones de la prueba:

- El CHROMagar[™] KPC tiene una sensibilidad limitada para aislados con CIMs menores de 4 µg / ml (42,45).
- Un rendimiento subóptimo de CHROMagar[™] KPC se informó en la detección de *E. coli* productora de KPC, y en *K. pneumoniae* KPC-negativo que eran resistentes al ertapenem debido a la pérdida de porinas combinada con la producción de ESBL (42).
- El medio cromID[®] CARBA tiene limitaciones en el detección de cepas productoras de OXA-48 (16,45).

- El medio Brilliance™ CRE tiene dificultades para la detección de OXA-48, debido al crecimiento de AmpC y/o ESBL en el medio la especificidad del agar disminuye (16,45).

Inmunocromatografía

Los ensayos de inmunocromatografía que se basan en reacción antígeno-anticuerpo se están utilizando para la detección rápida de carbapenemasas.

Los ensayos OXA-48 K-SeT® y KPC-K-SeT® (Coris BioConcept) para la detección de carbapenemasas tipo OXA-48 y KPC dependen de la captura inmunológica de dos epítomos específicos de las enzimas OXA-48 y KPC, utilizando nano partículas de oro coloidal y una membrana de nitrocelulosa dentro de un dispositivo de flujo lateral (casete) (82) (figura 6). La prueba se realiza directamente del cultivo bacteriano re suspendido en un buffer de lisis, se colocan tres gotas en el casete y el resultado se obtiene en 15 minutos, el tiempo de procesamiento es corto, no requiere equipos especiales (82–84).

La prueba OXA-48 K-SeT® detecta OXA-48, OXA-162, OXA - 181, OXA - 204, OXA - 232 y OXA - 244, mientras que variantes de OXA - 48 sin actividad carbapenemasa (OXA - 163 y OXA - 405) no se detectan. En la prueba KPC-K-SeT® detecta KPC-2, KPC-3, KPC-4 y KPC-9 en *Enterobacteriaceae* e incluso puede detectar casos de coproducción de KPC y NDM-1 (76,82).

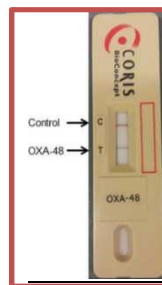


Figura 6. Prueba OXA-48 K-SeTw (85)

Limitaciones:

- En instituciones donde las carbapenemasas son endémicas se debe complementar con otras pruebas que detecten otro tipo de carbapenemasas, lo que aumentaría el costo para la institución de la detección de carbapenemasas(83).

Pruebas moleculares

Las pruebas descritas anteriormente tienen en algunos casos dificultades para su lectura e interpretación como se mencionó anteriormente, por lo que es muy importante uso de técnicas moleculares que nos permitan una detección rápida y sin dificultades de interpretación (85). Algunas técnicas moleculares también permite hacer un análisis molecular de la relación clonal de los microorganismos productores de carbapenemasas para controlar su diseminación (42,86).

Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización de desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) es una técnica que se basa en análisis de perfiles proteicos y que se ha usado durante muchos años en química. En 1975 Anhalt y Fenselau propusieron por primera vez que esta técnica podía ser usada para la caracterización bacteriana, la tecnología fue avanzando hasta que en 1996 Holland y col informaron que podían obtenerse a partir de la colonia bacteriana sin pretratamiento los espectros de las proteínas que permitían la identificación bacteriana (87). La tecnología ha seguido evolucionando hasta permitir no sólo la identificación del microorganismo sino también la actividad hidrolítica de algunas enzimas como las carbapenemasas (88).

El procedimiento consiste en mezclar la muestra con la matriz la cual se cristaliza, luego se introduce en el espectrómetro de masas donde la muestra se ioniza por medio de un láser para pasar a una fase gaseosa. Las moléculas ionizadas se aceleran a través de un campo electrostático y se expulsan a través de un tubo de vuelo metálico sometido a vacío hasta que los iones alcanzan un detector, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes, el analizador de masas separa los iones según su relación masa/carga (m/z) de acuerdo a su tiempo

de vuelo (TOF) creando el espectro de masas que está compuesto por picos de relación de masa a carga (m/z) con intensidades variables (87)(Figura 7).

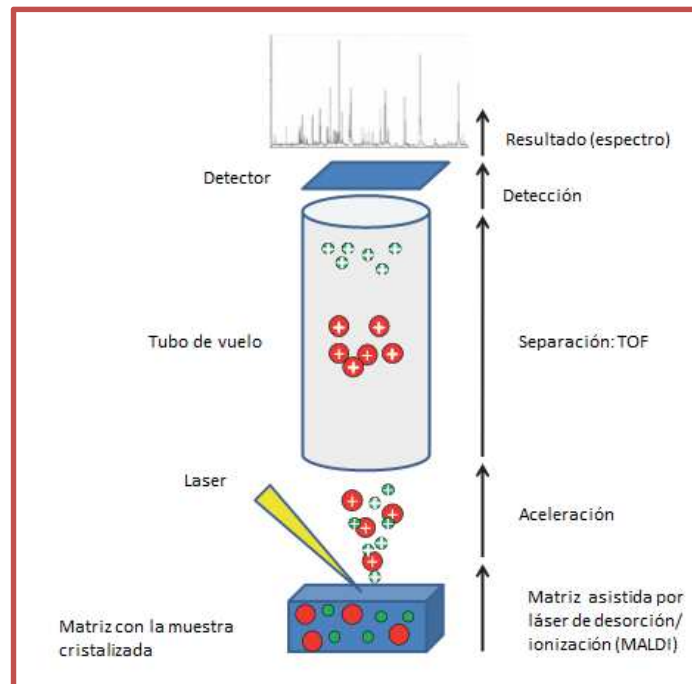


Figura 7. Descripción de la técnica MALDI-TOF. Adaptado de Croxatto (2012)(88)

Desde el 2011, se han publicado métodos para la detección de la actividad de las carbapenemasas de clase A, B y D, que utilizan MALDI-TOF MS. Para ello, el cultivo bacteriano fresco es colocado en suspensión en un buffer (e.j. NaCl, Tris-HCl), se mezcla con el carbapenémico (imipenem, meropenem o ertapenem), después de un tiempo de incubación y un proceso de sedimentación el sobrenadante es mezclado con la matriz (e.j. ácido α - ciano - 4 - hidroxicinámico, ácido sulfúrico saturado CHCA) y se mide en el MALDI-TOF MS, este procedimiento puede durar entre 2 a 4 horas dependiendo del protocolo a utilizar; por último se observa la hidrólisis del carbapenémico que se refleja en los espectros generados, si hay una disminución en la intensidad del pico del carbapenémico $\geq 80\%$ comparado con el control negativo indica la presencia de la carbapenemasas (11,88–90). Los resultados se pueden analizar manualmente o está disponible un software Compass para el análisis automatizada de los espectro generados para la hidrólisis con ertapenem que también ha funcionado adecuadamente con imipenem(45,90).

Este método permite detectar hidrólisis, con una alta especificidad (100%) y una sensibilidad entre el 97.4% para *A. baumannii* hasta el 100% para las diferentes *Enterobacteriaceae* y aislados de *P. aeruginosa* para detectar la carbapenemasa tipo OXA KPC, VIM, IMP, GIM y NDM a partir de colonias bacterianas (11,91,92). Debido al reporte de falsos negativos en la detección de OXA-48 se demostró que la adición de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) al buffer en el procedimiento aumenta la sensibilidad de la prueba del 75% al 98% para la detección de las enzimas tipo OXA-48 y se ha utilizado para detectar carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. con un 100% de sensibilidad y especificidad (66). La especificidad para la detección de la hidrólisis de los carbapenémicos aumenta al 100% cuando se utiliza ertapenem con respecto a la especificidad del 96,6% del imipenem, la sensibilidad fue del 94.7% para ertapenem y 98.9% para imipenem en *Enterobacteriaceae* resistente a los carbapenémicos (90).

También se ha reportado el uso de MALDI-TOF MS para detectar carbapenemasas directamente a partir de hemocultivos positivos (91). Para esta detección se utiliza como muestra una botella de hemocultivo positiva de la cual se toma una cantidad que es mezclada con un buffer y posteriormente sometida a un proceso de centrifugación o de filtración y de lavados según el método utilizado; posteriormente se agrega la matriz y se mide en el MALDI-TOF MS. El resultado se puede obtener en 3 horas después de que el hemocultivo sea señalado como positivo con un 63,2% de sensibilidad en *A. baumannii* y un 96% en *Pseudomonas* spp. y *Enterobacteriaceae*; no se observó ninguna interferencia con los residuos del hemocultivo (92–94).

La espectrometría de masas da resultados superiores para la detección de carbapenemasa de tipo OXA en *Acinetobacter baumannii* y puede convertirse en un método fiable para la confirmación de la actividad de la carbapenemasa en laboratorios tanto rutinarios como de referencia (11).

Limitaciones:

- Se pueden presentar falsos negativos en cepas productoras de carbapenemasas tipo de OXA-48 (66,88).

- La presencia y la intensidad de los picos puede cambiar debido al cambio de sustrato o buffer utilizados por lo que es necesario para el laboratorio establecer con controles negativos los picos que se utilizaran utilizar para la técnica (89).
- Se debe evaluar la estabilidad de los carbapenémicos usados para garantizar que no se degraden y puedan causar resultados erróneos (95).

Prueba con Sonda en línea (LPA, por su sigla en inglés)

La LPA es una prueba molecular que utiliza tiras reactivas de nitrocelulosas que tienen sondas específicas de los genes de interés. Es un método de hibridación inversa, utilizado a partir del cultivos bacteriano, para la prueba se extrae el ADN (se puede usar diferentes método de extracción) seguido de una amplifica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores específicos para los genes blanco y posteriormente se realiza la hibridación inversa de los amplicones del PCR utilizando las sondas específicas que se encuentran en la tira (96)(97).

La prueba LPA para carbapenemasas diseñado por Autoimmun Diagnostika (AID) GmbH (Alemania) es una técnica reciente que detecta los más frecuentes tipos de carbapenemasas. Contiene sondas para 13 genes de carbapenemasa, es decir *bla*_{AIM}, *bla*_{BIC}, *bla*_{DIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{IMI}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{NMC - A}, *bla*_{OXA - 48}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} y genes *bla*_{VIM} (96). De acuerdo a donde aparezca la línea será definido el tipo de carbapenemasa. El procedimiento dura aproximadamente 7.5 horas, este tiempo puede variar de acuerdo al protocolo de extracción utilizado (96,97).(Figura 8).

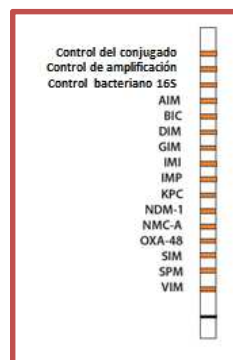


Figura 8. LPA carbapenemasas. Adaptado de Bloemberg (2017) (97)

En el estudio de sensibilidad y especificidad de la prueba de Bloemberg y col. en 2017 donde se evaluaron 151 cepas BGN previamente caracterizadas para la producción de carbapenemasa, se obtuvo un 100% de sensibilidad y especificidad con las muestras de BGN productoras de carbapenemasas y no se observó ningún resultado falso negativo o falso positivo para ninguno de los las sondas de carbapenemasas (96).

La detección genética por LPA no requiere equipos sofisticados en microbiología, facilitando así su aplicación, puede implementarse fácilmente en un laboratorio que tenga un termociclador y un baño maría para hibridación inversa. Es una herramienta rápida para la detección precisa de la carbapenemasa más comúnmente presente en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Se puede utilizar como herramienta de confirmación en el caso de resultados de pruebas fenotípicas no concluyentes (96).

Limitaciones:

- Es necesario otros estudios con un mayor número de carbapenemasas como tipo AIM, GIM, IMP y SPM (96).

Método de amplificación isotérmico mediado por bucle (LAMP, por su sigla en inglés)

La prueba LAMP es una técnica isotérmica de amplificación de ácidos nucleicos, la cual se hace a una temperatura constante de 60-65°C durante 45 minutos a 1 hora (21), utiliza 4 cebadores previamente diseñados que reconocen seis secuencias distintas del ADN de interés y una Taq ADN polimerasa (98).

El método convencional de LAMP para la detección de carbapenemasas utiliza cebadores que reconozcan los genes *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-23} y que se unan a un sitio único en la secuencia blanco lo que asegura una amplificación específica (21,98–100). El procedimiento consiste en una extracción de la muestra mediante calentamiento de la cepa o un kit de extracción (100), se prepara la mezcla con los reactivos necesarios para la amplificación (como cebadores, Taq polimerasa y muestra) (98,100) y se puede utilizar para la amplificación

un baño maría, un bloque térmico o un termociclador, posteriormente se realiza la evaluación de la reacción y para esto se puede utilizar un indicador de color verde (SYBR Green, por su nombre en Inglés) el cual al cambiar de verde a amarillo indica que la muestra es positiva (98,101), también se puede utilizar el azul hidroxinaftol, el positivo se observa de color azul cielo (100).

La prueba para detección de carbapenemasas diseñada por Amplex Diagnostics GmbH, Munich, Eazyplex® SuperBug CRE, combina LAMP y el tiempo real para la detección sencilla y rápida de los genes de las carbapenemasas permitiendo la amplificación y detección de aislamientos productores de KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23, OXA-40, y OXA-58 en *A. baumannii* (10,102). La cepa es colocada en un buffer de lisis y se incuba en una solución térmica, posteriormente la muestra lisada se agrega al tubo de muestra que contiene la mezcla de reacción lista para usar con los reactivos y cebadores necesarios para la reacción permitiendo la amplificación específica de siete genes de resistencia diferentes simultáneamente en cada corrida más un control interno y se coloca en el equipo Genie II. Durante 30 minutos se incuba a 66°C en el equipo y se detecta la señal de fluorescencia que forma una curva de amplificación (102,103).

Limitaciones:

- Se puede observar falsos positivos en KPC, OXA-58 y OXA-40 (102).
- Cuando se utiliza una carga alta de bacterias se puede presentar inhibición en la reacción de amplificación o aumentaron la amplificación inespecífica (102).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary Mullis, es una técnica que permite la replicación enzimática de DNA de manera exponencial a partir de una pequeña cantidad de molécula. Esta técnica actualmente se utiliza para diversas aplicaciones en la parte clínica como el diagnóstico de enfermedades infecciosas, identificación de microorganismos entre otros aumentando la precisión y sensibilidad del diagnóstico (104,105).

La PCR requiere de varios componentes básicos para la realización de la prueba como son el ADN de la muestra a amplificar, dos cebadores que deben estar diseñados apropiadamente para obtener el resultado esperado del PCR, una Taq DNA polimerasa, nucleótidos para la nueva cadena de ADN(dNTPs), buffer, $MgCl_2$, y un termociclador (104,106). El proceso de PCR utiliza una serie de ciclos, estos ciclos constan de tres pasos los cuales al repetirse duplican el número de copias en cada ciclo (107):

- El primer paso es la desnaturalización donde se separa la doble cadena de DNA (dsDNA) y se activa la Taq DNA polimerasa. (104,107).
- El segundo paso es el de alineamiento, en este ciclo el cebador se acopla a la secuencia complementaria del molde de DNA (104,107).
- El tercer paso es el de extensión de la cadena, donde se genera la cadena complementaria (104,107).

La técnica de PCR puede modificarse para utilizar enzimas transcriptasa reversa (RT, por su sigla en inglés), la técnica se llama RT-PCR y convierte el ARNm en ADN complementario (ADNc), esta técnica se utiliza cuando se quiere estudiar si el gen detectado se está expresando o si hay cambios en la expresión genética en diferentes condiciones (107).

En la PCR convencional el producto de PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa donde se determina el tamaño del producto de PCR mediante la comparación de una escala de DNA conocido colocado dentro del gel (61,104), esta es una detección de punto final que puede ser cualitativa o semicuantitativa (105,107).

La técnica de PCR en tiempo real es una innovación de la PCR convencional que surgió por la necesidad de un método más sensible, preciso y simple para cuantificar los ácidos nucleico porque permite monitorear el proceso de cuantificación exacta del DNA o RNA en cada ciclo en tiempo real, disminuye el riesgo de contaminación, resultado rápidos y un mejor control de calidad del proceso, esto se hizo posible gracias al desarrollo de compuestos químicos fluorescentes e instrumentos que permitieron la detección y cuantificación de los ácidos nucleicos capturando la fluorescencia que emite el compuesto fluorescente que se le adiciona a la reacción como SYBR® Green o TaqMan®, la fluorescencia es proporcional a la cantidad de

ADN de doble cadena presente en la muestra y un software que permita el análisis de la reacción (105,107).

Entre los compuestos fluorescentes se utilizan para las pruebas de PCR en tiempo real basados en fluorescencia se encuentran el SYBER Green, Sondas de ligadura de ADN de ranura menor (MGB), Sondas de hibridación, sondas TaqMan, Molecular beacons, Sunrise primers y Sondas Scorpion® (105,107). Entre los más usados están SYBER Green, Sondas de hibridación y sondas TaqMan.

El SYBER Green detecta la fluorescencia después de la unión al dsDNA permitiendo la cuantificación de los productos de PCR. La desventaja de este colorante es que se une a cualquier dsDNA como dímeros de cebadores o amplificados no específicos lo que afectan a la eficiencia de la amplificación del productos (105,107).

La Sondas de hibridación son sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoróforos para la detección de secuencias específicas que se agregan a la reacción, la sonda tiene un fluoróforo (e.j. FAM, Cy, ROX) y un reportero, estas sondas junto con los dos cebadores específicos para los genes de interés proporcionan una especificidad más alta. Durante la fase de alineación, las sondas son hibridadas adyacentemente a la cadena monocatenaria de ADN (ssDNA, por su sigla en inglés) y la energía de excitación se transfiere desde el donante al aceptor (105).

La Sonda TaqMan es un oligonucleótido corto (ADN) que contiene un fluoróforo reportero unido covalentemente al extremo 5' y un inactivador de la fluorescencia en el extremo 3'. Las sondas se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para romper una sonda marcada. Una vez la sonda se rompa a medida que se sintetiza la nueva cadena de DNA se detecta la fluorescencia porque se separa el fluoróforo del inactivador de la fluorescencia (105,107).

La visualización de los productos de PCR en tiempo real donde se utilizan sondas permiten observar el proceso de reacción que se divide en 4 fases, una fase lineal base donde la fluorescencia no se detecta, una fase exponencial donde el producto se amplifica y se emite la fluorescencia, fase lineal donde los componentes de la mezcla y de la muestra se consumen y una fase de meseta donde no se sintetiza más producto (Figura 9).

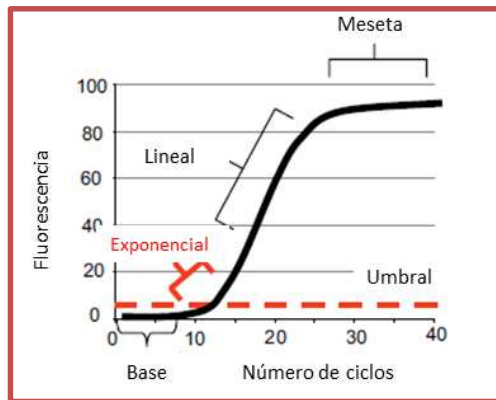


Figura 9. Fases de la PCR en tiempo real. Adaptado de Ishmael, 2008(108)

La cuantificación se realiza teniendo en cuenta el número de ciclos (CT) en el cual la fase exponencial supera el umbral y se comienza a detectar la fluorescencia, entre más DNA se encuentre en la muestra más rápido aumenta la señal de fluorescencia (107)(Figura9).

Debido a la necesidad de tiempo y dinero se crearon los ensayos de PCR múltiple (PCR Multiplex, por su nombre en Inglés) que permite amplificar simultáneamente múltiples secuencias en una sola reacción bajo las mismas condiciones utilizando un conjunto de múltiples cebadores altamente específicos que conduzcan a la amplificación de regiones únicas de ADN (108). La PCR múltiple es una prueba de detección rápida utilizada para la identificación de una variedad de genes de resistencia en una sola reacción con un tiempo de respuesta más corto como los carbapenemasas (NDM, KPC, GES, IMP, VIM y OXA-48) con 100% sensibilidad y especificidad en *Enterobacteriaceae*, *Ac. baumannii* y *Ps. aeruginosa* (61).

Comercialmente existen en el mercado pruebas de PCR en tiempo real para la detección de carbapenemasas como el sistema Xpert® Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA), Check-Direct CPE (CDCPE, Check-Points, Wageningen, Países Bajos), PCR-ELISA hyplex®-MBL ID Multiplex (AmplexDiagnostics, Gars, Alemania) y el Sistema FilmArray® (bioMérieux) entre otros de los cuales se hablara a continuación.

Xpert® Carba-R

La prueba utiliza cartuchos para detectar las carbapenemasas *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-48} para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Acinetobacter* spp. a partir de muestras de hisopado rectal y cultivo bacteriano en 48 minutos (61,109). La prueba tiene una sensibilidad del 100% para la detección de enzimas tipo NDM, VIM, OXA-48 e IMP y una especificidad del 100% para KPC y OXA, 99.7% para NDM y VIM y 99.8% para IMP a partir de cultivo bacteriano. La sensibilidad a partir del hisopado rectal disminuyó para las enzimas tipo VIM a un 94.5%, OXA-48 98.2%, IMP 94.9%, KPC y NDM continuaron con el 100%; también se observó una disminución en la especificidad la cual fue del 99.4% para KPC, OXA, 99.1%, para NDM 99.7%, VIM 99.3% e IMP 99.1%. El procedimiento de montaje de la muestra consta de tres pasos para hisopado rectal, primero se agrega la muestra al reactivo, se transfiere al cartucho y por último se coloca en el equipo. (Figura 11) (109). Para el cultivo bacteriano se debe tomar una alícuota de una suspensión de 0,5 de McFarland la cual se diluye en PBS y se mezcla con el reactivo de la prueba por último se agrega el reactivo con la muestra al cartucho para correrlo en el equipo (110)(Figura 10).



Figura 10. Procedimiento de montaje de la prueba Xpert® Carba-R

El estudio de McMullen y col en el 2016 nos permiten evidenciar las ventajas de la técnica de PCR para la detección de las carbapenemasa comparada con pruebas fenotípicas. En el estudio se evaluaron las características de rendimiento de la prueba Xpert® Carba-R para la detección de

los genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, y *bla*_{KPC} para 189 cepas resistentes a carbapenémicos incluyendo *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* complex, comparándolo con el método de inactivación del carbapenémico y los agares cromogénicos (HardyCHROM™ CRE y ChromID® CARBA). Los resultados obtenidos demostraron que la prueba Xpert® Carba-R fue fácil y rápido de realizar comparado con las pruebas fenotípicas, detecto todos los aislamientos previamente caracterizados como como productores carbapenemasa, con un valor predictivo positivo y negativo del 100% para los genes presentes en la prueba mientras que los medios fenotípicos mostraron una baja especificidad para la detección de aislamiento productores de carbapenemasas con un valor predictivo positivo del 99.3% y un valor predictivo negativo del 86% para el método de inactivación de carbapenemasas, el 0% para HardyCHROM™ CRE y el 25% para el ChromID® CARBA (111).

Check-Direct CPE (CDCPE)

Otro método comercial es el RT-PCR multiplex Check-Direct para detectar carbapenemasas que utiliza simultáneamente sondas marcadas con cuatro fluoróforos (FAM, VIC, Texas Red o Cy5) para la detección de KPC, OXA-48, VIM, NDM y un control interno a partir de hisopos rectales o cultivos aislados (112). El tiempo de la prueba CDCPE es considerablemente más corto en comparación con el cultivo (3.5h vs > 24h) con una sensibilidad y un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (113) y un límite de detección de 5 copias por reacción, detecta un inóculo bacteriano de 10^3 a 10^5 UFC/ ml, con menor sensibilidad para KPC(15,45,61,113). Una desventaja de la prueba es que no se puede distinguir entre las carbapenemasas tipo VIM y NDM ya que son detectados por el mismo fluoróforo (113).

Lau y col evaluaron el rendimiento clínico de Check-Direct CPE para la detección de carbapenemasa directamente de 301 hisopados peri rectal. Las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción, luego se coloca la muestra con la mezcla de reacción y posteriormente colocados en un instrumento de PCR en tiempo real para obtener el resultado, un resultado positivo se definió cuando el calor del ciclo que supere el umbral fue de ≤ 40 . Los resultados

obtenidos mostraron un VPN del 100%, una sensibilidad del 100%, especificidad del 88% y un valor predictivo positivo (VPP) del 21%. Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios donde reportaron una la sensibilidad 100%, la especificidad 94%, VPP 45% y VPN del 100%. Los resultados obtenidos del 100% del VPN sugiere que la técnica Check-Direct CPE puede detectar de manera rápida los pacientes que no estén colonizados (114).

hyplex®-MBL ID

El método de PCR-ELISA hyplex®-MBL ID Multiplex, combina el PCR multiplex para la amplificación del ADN de IMP y VIM con la hibridación inversa de los productos de PCR a oligonucleótidos que se han inmovilizado en placas del micropocillo de la placa de ELISA. Los complejos de hibridación se visualizan posteriormente mediante anticuerpos conjugados con peroxidasa que produce un cambio de color. Este método mostró 98% de sensibilidad y 98,6% de especificidad en la detección de VIM, en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *Enterobacteriaceae* (42,113). Se ha reportado una alta especificidad (98,6%) y sensibilidad (98,0%), para MBL (*bla_{VIM}* y *bla_{NDM}*) y se ha detectado el gen *bla_{VIM}* de muestras de orina, sangre, esputo y pus (45). El tiempo de respuesta de la prueba es de 3 horas a partir de muestras clínicas después de realizar la extracción de ADN. Una desventaja es el riesgo de contaminación de la prueba por amplicones debido a los múltiples pasos que hay que realizar en el protocolo de la técnica (113).

Estudios como el de Avlami y col evalúan la prueba hyplex®-MBL como herramienta de diagnóstico, para este estudio se utilizaron 326 muestras clínicas en tres hospitales de Grecia con prevalencia de VIM. Las muestras de orina, pus, hemocultivo positivo y esputo fueron sometidos a un procedimiento de extracción, luego la muestra extraída se colocó en la mezcla de reacción y posteriormente se amplificó en un termociclador, los productos amplificados son usados en el último paso de hibridación inversa (115). El método mostró alta sensibilidad (98.0%) y especificidad (98.6%) y se mostró confiable en la detección de genes *bla_{VIM}* en muestras de sangre, orina, pus y esputo (115).

FILMARRAY® Panel de identificación del cultivo de sangre (BCID, por su sigla en inglés)

El sistema FilmArray® BCID (bioMérieux) utiliza PCR multiplex para detectar rápida y simultáneamente 24 patógenos (bacterias y levaduras) y 3 genes de resistencia bacteriana entre los que se encuentra KPC a partir de hemocultivo positivo, KPC sólo se informa cuando son detectados *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa* que tienen el gen KPC (2,116).

Para el procedimiento de la prueba se toma una alícuota del hemocultivo positivo la cual se agrega al buffer de muestra, luego es tomada una cantidad de muestra del búfer y es inyectada a la bolsa pre-hidratada del panel de BCID y se carga en el equipo para su análisis automatizado (Figura 11). Para el análisis de los resultados se tiene en cuenta el desempeño de los dos controles internos que tiene el panel, si los controles fallan el resultado será inválido (116).



Figura 11. Procedimiento de montaje de la prueba FILMARRAY® BCID

El panel de BCID identifica aproximadamente el 90-95% de los Gram negativos y Gram positivos más comunes. El sistema realiza extracción y purificación, PCR anidada y detección usando datos de la curva de fusión de punto final en aproximadamente 1 hora con una especificidad y sensibilidad reportada en varios estudios del 100% (113). La ventaja de la

prueba es el tiempo de respuesta y la facilidad del montaje pero debido a que sólo identifica la KPC su alto costo puede ser un inconveniente para la detección de las carbapenemasas (113).

El estudio de Fiori y col, 2016, en un Hospital de Roma de muestras de hemocultivos positivos muestra una sensibilidad y especificidad del 100% del panel de BCID para la detección de las cepas productoras de carbapenemasas KPC (116).

En general las pruebas de PCR en tiempo real son apropiadas para la detección oportuna de las carbapenemasas por su rapidez y su alta sensibilidad sin embargo los elevados costos de las pruebas podría ser un obstáculo para su implementación en el laboratorio.

Limitaciones:

- Las pruebas de PCR Podrían presentar falsos resultados positivos para OXA-48 debido a la amplificación de enzimas cromosómicamente codificadas similares en especies tales como *A. baumannii* (16).
- Una desventaja de los ensayos de PCR es que sólo detecta el gen pero las especies y el fenotipo permanece desconocido por lo que se debe combinar con el cultivo para la vigilancia de rutina (113).
- Por su alta sensibilidad se pueden reportar falsos positivos por infecciones pasadas y que han sido tratadas por antibióticos (113).
- Requiere costosos instrumentos como termociclador y reactivos que no todos los laboratorios pueden adquirir (104).
- Requiere personal capacitado, experimentado y en algunos casos áreas de trabajo exclusivas (85,104).
- Alcance limitado para el diagnóstico de enfermedades (104).
- Los falsos positivos y falsos negativos pueden disminuir especificidad y sensibilidad (104).
- La PCR es más susceptible contaminación por ADN externo a la prueba (105,107).

Microarreglos

Los microarreglos permiten detectar en una sola reacción numerosos genes que no son posibles detectar con PCR multiplex, además permite la rápida identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Consisten en oligonucleótidos unidos a una superficie sólida y el gen diana del patógeno se marca e hibrida a la sonda inmovilizada, la reacción se mide con un escáner (16,45). Como primer paso se deben diseñar las sondas y los cebadores de los genes de las carbapenemasa que se quieren detectar como *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, y *bla*_{KPC}, una vez diseñados las sondas y cebadores son impresos en un superficie sólida que puede ser plástico, gel entre otros fabricando el microarreglo. Una vez se tenga el microarreglo la muestra es extraída, luego el DNA blanco es amplificado y marcado (ej. biotina), después se realiza un proceso de hibridación de DNA donde el DNA se hibrida específicamente en condiciones rigurosas a la sonda correspondiente que se encuentra en el microarreglo; posteriormente se hace la detección y el análisis utilizando un software donde la presencia de un punto oscuro indica una hibridación exitosa (117,118)(Figura 12).

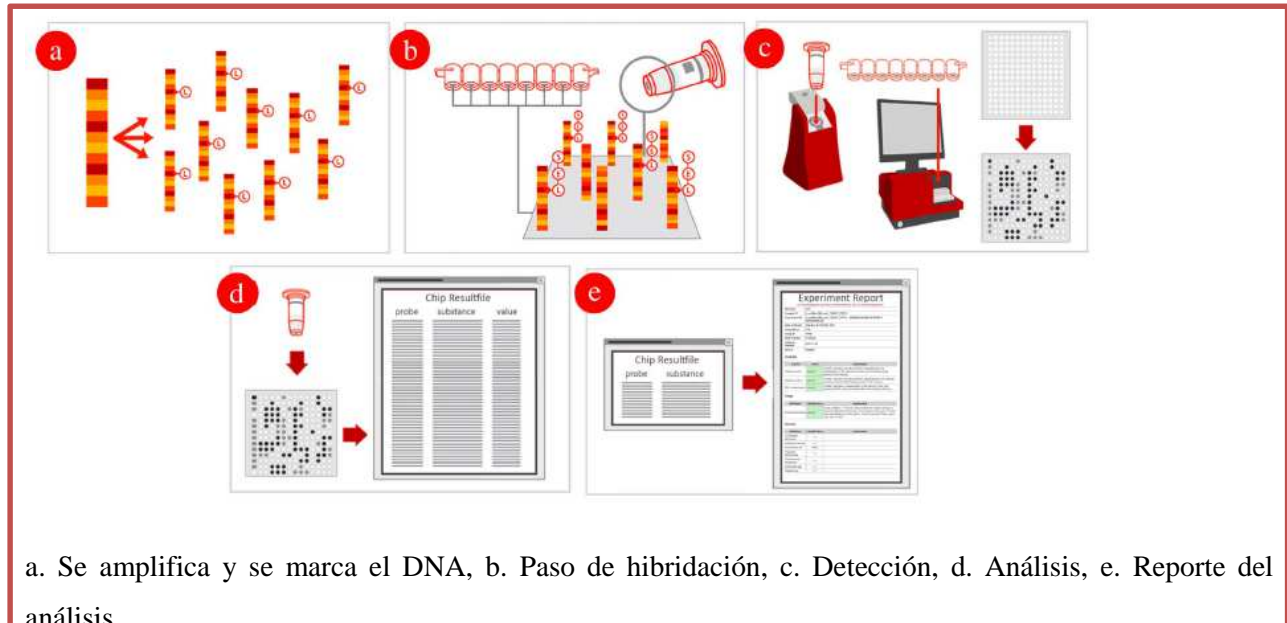


Figura 12. Procedimiento de montaje Microarreglo. Adaptado de Braun 2014 (117)

Comercialmente podemos encontrar pruebas de DNA de microarreglos como Check-MDR CT103 XL (Check-Points, Wageningen, Países Bajos) que permite la detección de varios

carbapenemasas *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{SPM} y *bla*_{GIM} que se encuentran comúnmente en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con un 100% de especificidades y sensibilidades para todas las carbapenemasas. (119).

El microarreglo Check-MDR CT102 de ADN (Check-PointsHealth B.V.) permite la detección de familias de genes ESBL (SHV, TEMy CTX-M) y las carbapenemasas (IMP, KPC, VIM, NDM y OXA - 48) con el 100% de sensibilidad y especificidad a partir de cultivos bacterianos de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. y bacterias no fermentadoras (45).

Otra prueba de detección de bacilos Gram negativos es la BC-GN de Verigene® a partir de hemocultivos positivos detecta *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. marcescens*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp y seis determinantes de resistencia, entre ellas una β-lactamasa (CTX-M) y genes de carbapenemasas (KPC, NDM, OXA, VIM e IMP), sin la necesidad de una PCR previa de amplificación (16). Los resultados de la prueba se obtienen en aproximadamente 2 horas y se realiza automáticamente la extracción de ácido nucleico, purificación, hibridación y amplificación de señal. En general la prueba muestra una buena sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la prueba (120). Se aconseja combinar la prueba con las pruebas convencionales de susceptibilidad.

Limitaciones:

- Se han reportado algunos problemas de interpretación en el software en IMP que deben ser mejorado (119).
- La prueba BC-GN de Verigene® a partir de hemocultivos puede presentar falsos negativos, ej. los cultivos que contenían más de un organismo (120).
- El costo elevado de la prueba puede ser una limitante para ser implementado (121).

Epidemiología Molecular

Es necesario para los programas de vigilancia epidemiológica de las instituciones identificar clones de alto riesgo de cepas productoras de carbapenemasas que se puedan diseminar en la

institución. Las técnicas como Electroforesis de campos pulsados (PFGE, por su sigla en inglés) o DiversiLab® (bioMérieux) nos permiten hacer un análisis molecular de la relación clonal entre los aislamientos productores de carbapenemasas que ayuda a controlar la diseminación de los microorganismos (42).

Electroforesis de campos pulsados

El método PFGE permite establecer la clonalidad de varias cepas mediante el corte por enzimas de restricción de los genomas bacterianos incrustados en una matriz de gel de agarosa, el genoma se separa usando dos campo eléctrico alternativos resultando fragmentos grandes de ADN entre diferentes direcciones, las moléculas de ADN más grandes se encontrarán cerca del origen del gel, mientras que las más pequeñas migraran más lejos en el gel (42,122). La variación en el campo eléctrico permite analizar los fragmentos muy grandes (> 600 kb) asociados, por ejemplo, en el análisis de KPC-productores de *K. pneumoniae* (42,45).

Los patrones observados pueden ser interpretado utilizando criterios de Tenover para establecer el grado de parentesco (42); según esos criterios, las cepas con hasta tres diferencias de banda se consideraron estrechamente relacionadas, las cepas con cuatro a seis diferencias de banda se consideraron posiblemente relacionadas, y las cepas con más de seis diferencias de banda se consideraron no relacionadas(123).

DiversiLab®

Comercialmente se encuentra para el análisis de relación clonal el sistema DiversiLab®, una herramienta de huellas digitales semiautomatizada basado en secuencias repetitivas de PCR (rep-PCR). Para le procedimiento se necesita primero una extracción del DNA, seguido de una amplificación rep-PCR por último se realiza la detección y análisis en el software. El resultado se obtiene en aproximadamente en 4 horas(124). Los resultado se analizan en el software DiversiLab® y se puede usar diferentes tipos de análisis como Correlación de Pearson, también se puede utilizar el método de Kullback-Leibler y las herramientas para crear el dendograma, la imagen del gel virtual y la matriz de similitud (Figura 13)(125). Los aislamientos con una

relación clonal >95% fueron considerados relacionados en varios estudios(125–127).(Figura 13).

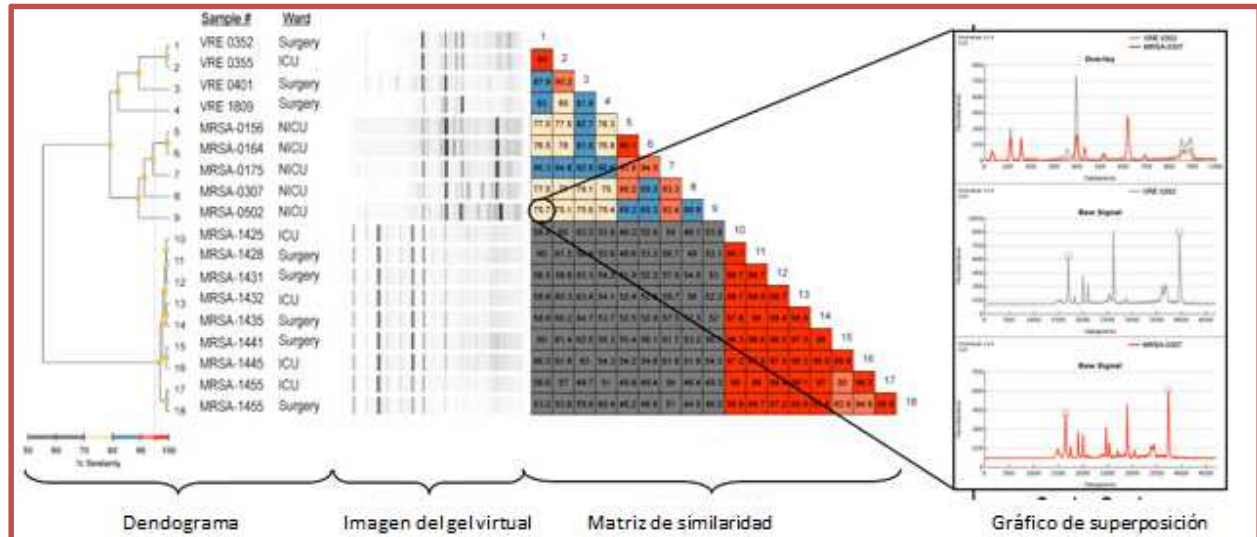


Figura 13. Análisis de resultados DiversiLab

Cieslinski y col analizaron la epidemiología molecular de las carbapenemasas tipo OXA-23 en *A. baumannii* con el sistema DiversiLab® en 8 hospitales de Brasil. El análisis permitió identificar un clon principal que representó 69.6% de los aislamientos, y 4 clones más pequeños. El clon principal que contenía cepas productoras de OXA-23 se diseminó en todos 8 hospitales estudiados (126).

Limitaciones:

- El tiempo para obtener el resultado de PFGE puede ser de 2 a 3 día(123)
- El elevado costo de las pruebas DiversiLab®.

Utilidad de las herramientas de diagnóstico molecular dentro de un programa de uso racional de antibióticos

Como se describió previamente, existen en el mercado múltiples herramientas diagnósticas utilizadas para la identificación de las carbapenemasas, las cuales tienen diferentes características

que se deben tener en cuenta para la selección de la metodología correcta y que contribuya al programa de uso racional de antibióticos (45).

Tabla 6. Características de las herramientas de detección de carbapenemasas. Adaptado de Bialvaei 2016(46)

Parámetros de la prueba	Test de Hodge modificado (THM)	Método de Cultivo	Prueba Carba NP	MALDI ToF	Reacción en cadena de polimerasa (PCR) + secuenciación	Microarreglos
Sensibilidad	100	96.5 - 43	100	100	100	98.9
Especificidad	<90	57-68	100	100	100	100
PPV	85	60.4	100	100	100	100
NPV	100	100	100	100	100	99.7
Rapidez (horas)	24-48	24-48	2>	<4	1-48	8-24
Costo^a	\$	\$	\$\$	\$\$	\$\$\$	\$\$\$\$
necesidades de experiencia^b	+	+	+	++	++	++
Identificación genética completa^c	-	-	-	-	+	+/-

PVP: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo. ^a El número de \$ se correlaciona con el precio (relativo) efectivo de la prueba. ^b El número de + se correlaciona con la experiencia y la formación necesarias para realizar e interpretar la prueba. ^c + significa que la técnica es capaz de dar una identificación genética completa, - significa que la técnica no es capaz de dar una identificación genética completa y ± significa que la técnica es capaz de dar una identificación genética parcial.

El programa de uso racional de antibióticos busca mejorar el uso adecuado de los antimicrobianos mediante la selección del antimicrobiano óptimo que garantice una terapia efectiva, este programa incluye la utilización de pruebas diagnósticas que permitan identificar más rápidamente los patógenos ya que un buen tratamiento comienza con un buen diagnóstico, adicionalmente, esto ayuda a evitar la dispersión de los microorganismos en la institución (128,129). Herramientas de diagnóstico como el MALDI TOF, PCR y microarreglos han sido asociadas al programa de uso racional de antibióticos principalmente por su rapidez en la

detección de carbapenemasas debido a que el tiempo es crítico especialmente en pacientes con sospecha de sepsis (Tabla 6), a continuación se mostraran algunos datos.

Karaaslan y col en el 2015 destacaron la importancia de realizar medidas efectivas de control de infecciones para detener la diseminación de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos en un hospital pediátrico en Turquía. Una de esas medidas fue la implementación de una PCR convencional de muestras de hisopados rectales de pacientes de UCI y salas pediátrica como herramienta para la vigilancia de los microorganismos productores de carbapenemasas; esta decisión fue tomada por el comité de control de infecciones hospitalarias después de encontrar un caso de infección del torrente sanguíneo producida por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos en la UCI Adultos en el 2013 (130).

En los resultados del estudio se encontraron el 23% (176/762) de los pacientes colonizados por bacilos Gram negativos resistentes a Carbapenémicos incluyendo *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* y *Enterobacter* spp. Solo el 3.4% (6/172) de los pacientes desarrolló una infección por bacilos Gram negativos resistente a los carbapenémicos los cuales fueron tratados con una terapia antimicrobiana adecuada gracias a la detección temprana de estos microorganismos. El estudio también permitió identificar el primer aislamiento de carbapenemasas tipo NDM en *A. baumannii* en Turquía, adicionalmente se identificó que OXA-23 es la más frecuente carbapenemasa encontrada en *A. baumannii* (130).

O'Connor y col en 2017 buscaron reducir el tiempo de detección de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas y prevenir la transmisión cruzada nosocomial utilizando muestras de hisopado rectal. Para esto diseñaron un nuevo flujo de trabajo donde implementaron el uso de la prueba Check-Direct CPE. Se evaluaron muestras de 200 pacientes con resultado obtenidos en menos de 4 horas, lo que demuestra la eficiencia en tiempo de la prueba comparado con el tiempo promedio del diagnóstico de 48/72 horas del cultivo convencional. La implementación de la prueba permitió el diagnóstico en un mismos día, correr un gran volumen de muestras en un mismo montaje lo que es rentable para el laboratorio, disminuir el tiempo del uso empírico del antibiótico de amplio espectro, evitar la ansiedad innecesaria del paciente por prolongar por mucho tiempo los resultados y permite la implementación oportuna de medidas de control de infecciones (112).

Kim y col en el 2016 evaluaron el uso de la prueba Xpert® CARBA-R para determinar las tasas de colonización intestinal de los organismos productores de carbapenemasas (OPC) en 102 pacientes ingresados en la UCI de un hospital de atención terciaria en Corea. La prueba se comparó con el cultivo convencional. La identificación de los OPC se obtuvo con la prueba CARBA-R en una hora, mientras que el tiempo requerido para el cultivo convencional fue de más de tres días, lo que significó un ahorro de tiempo significativo. También encontramos que las prevalencias de colonización intestinal por microorganismos resistentes a carbapenémicos fue del 17.5% y *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémico del 7.5%. Debido a que la prueba es fácil de usar y disminuye el tiempo del diagnóstico se puede implementar en las estrategias de vigilancia de OPC(131).

En otro estudio Tato y col en el 2016 utilizaron la prueba Xpert® CARBA-R en la detección de los genes de carbapenemasas *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{IMP-1} en muestras de hisopado rectal de 383 pacientes de cuatro instituciones (2 en Estados Unidos, 1 en el Reino unido y 1 en España), adicionalmente se evaluaron 250 organismos previamente caracterizados como productores de carbapenemasas y controles negativos colocados en hisopados y lo compararon con el cultivo convencional. El 23.5% (149/633) de las muestras fueron positivas en un tiempo entre 32 – 48 minutos, encontrándose además en 4 muestras la detección de múltiples carbapenemasas. Comparando los resultados obtenidos con el cultivo tradicional, la sensibilidad fue del 96.6%, especificidad 98.6%, VPP 95.3% y VPN 99.0%. La prueba permite identificar rápidamente los pacientes colonizados con organismos productores de carbapenemasas y adicionalmente permite detectar múltiples genes lo que contribuye a disminuir la diseminación de estos organismos en la institución (132).

Hill y col en el 2014 evaluaron 54 muestras de hemocultivos positivos para la detección directa de bacilos Gram negativos y marcadores de resistencia a antibióticos utilizando para ello la prueba Verigene® BC-GN; para ellos utilizaron como comparador el cultivo convencional. La prueba identificó correctamente el 100% de los microorganismos y las carbapenemasas probadas. Se observó una reducción en el tiempo de respuesta de la identificación de 18 a 24 horas del cultivo convencional a 2 horas utilizando la prueba Verigene® BC-GN y permitió la

detección de las enzimas KPC, NDM, VIM, IMP y OXA, esto permitió el desescalamiento de antibióticos de amplio espectro en promedio 33 horas antes que el cultivo convencional, evitando un aumento de la mortalidad y permitiendo un tratamiento médico más eficaz y oportuno (133).

En el estudio retrospectivo de cohortes de Walker y col, se evaluó el impacto clínico de la identificación y detección de resistencia en Gram negativos en hemocultivos positivos. En el estudio se comparó dos grupos, en el primer grupo no se implementó el diagnóstico molecular en 98 pacientes hospitalizados y en el segundo grupo se implementó la prueba Verigene® BC-GN en 97 pacientes hospitalizados. Con el panel se pudo identificar el 87% de los cultivos de Gram negativos y mostró una correlación del 98% con el cultivo convencional, los microorganismos más comunes fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *P. aeruginosa*. En el primer grupo se encontraron 32 pacientes que no tenían una terapia efectiva y se cambiaron al tratamiento adecuado en más o menos 30.3 horas mientras que en el segundo grupo en que se implementó la prueba 33 pacientes se cambiaron a la terapia adecuada en más o menos 19.1 horas. Se observó una reducción en el tiempo de respuesta en promedio de 27 horas en la identificación de los microorganismos y detección de las carbapenemasas cuando se utilizó el Verigene® BC-GN, esto se asoció con una administración más rápida de la terapia antimicrobiana adecuada y permitió desescalar la terapia de amplio espectro; adicionalmente se observó una reducción significativa de la mortalidad a los 30 días y las muertes relacionados con los organismos multidrogo resistentes. Implementar la prueba de Verigene® BC-GN impacta en el cuidado del paciente significativamente (134).

En el estudio de cohorte de Bookstaver y col en el 2017 se evaluó el uso de pruebas diagnósticas rápidas para la identificación de Gram negativos, combinado con el programa de uso racional de antibióticos. Se evaluó la conveniencia de la terapia antimicrobiana empírica y el tiempo para desescalar el antibiótico de amplio espectro en infecciones por el torrente sanguíneo. Se evaluaron dos grupos, un grupo de pre-intervención en el que sólo se utilizó la prueba MALDI-TOF y un grupo post-intervención en el que se utilizaron la prueba diagnóstica MALDI-TOF en combinación con el panel FilmArray® BCID (135).

En los resultados del estudio se observó que la terapia combinada empírica se utilizó menos en el grupo post-intervención (27% versus 12%, $p < 0,001$), también se observó una reducción significativa en el tiempo de desescalación de la terapia combinada de 2.8 días a 1.5 días cuando se utilizó el programa de uso racional de antibióticos y las pruebas diagnósticas MALDI-TOF y FilmArray®. Se observó una reducción del tiempo de identificación de microorganismo de 1.7 a 0.8 días cuando se usó en conjunto MALDI-TOF y FilmArray® y no únicamente el MALDI-TOF (135).

En el 2017 Maurer y col analizaron el impacto de los avances de las técnicas en microbiología sobre los programas de uso racional de antibióticos. Identificaron que técnicas como MALDI-TOF se han utilizado con éxito para detectar la producción de carbapenemasas y han demostrado disminución en el tiempo del resultado y el impactó en el uso racional de los antimicrobianos de forma crítica. Otras metodologías basadas en ácidos nucleicos como los ensayos de PCR múltiplex permiten la identificación y detección de carbapenemasas en un corto tiempo lo que es un beneficio para el paciente, sin embargo es necesario una comunicación de los resultados al clínico de una manera oportuna que permita el ajuste de la terapia antimicrobiana(136).

Wong y col (2017) buscaron nuevas estrategias para el tratamiento de las *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (CRE), las nuevas estrategias incluían los programas de administración de antibióticos que reducen la resistencia al patógeno, optimizar la atención al paciente y reducir los costos de atención de la salud. La estrategia se complementó con la utilización de diagnósticos rápidos como la PCR y MALDI-TOF para la detección de CRE que reducen dramáticamente el tiempo identificación de la especie bacteriana y la detección de genes de resistencia. Los resultados mostraron que el tiempo de obtención de identificación se redujo de 48 a 72 horas con el método convencional a cuestión de horas con la herramienta del diagnóstico rápido. Sin embargo resaltan que estas estrategias deben ir acompañadas de una retroalimentación en tiempo real al personal médico, con lo cual puedan tomar decisiones frente a la terapia antimicrobiana y desescalar la terapia empírica de amplio espectro. Con la implementación de estas herramientas se observó una disminución de la duración de la hospitalización de 11,9 a 9,3 días (137).

En el estudio de Banerjee y col del 2015 se evaluaron los resultados de la detección rápida de los microorganismos y los genes de resistencia utilizando el Panel BCID de FilmArray® a partir de hemocultivos positivos de 617 pacientes. En él estudió se compararon dos grupos, un grupo donde se realizó la identificación y susceptibilidad por métodos convencionales (grupo control) y otro grupo donde se utilizó el panel de BCID y los resultados se entregaron con y sin comentarios asociados al programa de uso racional de antibióticos.

La identificación del microorganismo utilizando el BCID fue más rápida (1.3 horas) comparado con el grupo control (22 horas). En el grupo en el que se combinó el panel de BCID con recomendaciones del programa de uso racional de antibióticos donde se recomendaba desescalar o escalar antibióticos, optimizar la dosis o la duración del antibiótico se realizaron los cambios dentro de las 24 horas. Se realizó una comparación del tiempo de identificación del microorganismo, disponibilidad de los resultados fenotípicos de susceptibilidad antimicrobiana y la primera modificación apropiada de la terapia antimicrobiana para el subgrupo de sujetos del estudio con organismos disponibles en el panel. La prueba de PCR FilmArray® redujo el uso innecesario de antibióticos, se obtuvieron mejores resultados combinando el uso del panel BCID con un programa de uso racional de antibióticos (Figura 5.). La detección rápida de patógenos y susceptibilidad directamente de hemocultivos con comentarios o programas de administración antimicrobiana puede optimizar la prescripción de antibióticos para las infecciones del torrente sanguíneo ya que permite desescalar el antibiótico más rápido (138).

El estudio de Messacar y col en 2016 comparó los resultados de dos grupos de pacientes, un grupo de 100 niños que se analizaron después de la intervención y un grupo de 200 niños que se analizaron antes de la intervención en un hospital de Colorado. Los microorganismos del grupo de pre-intervención fueron identificados con técnicas convencionales, mientras que en el grupo post-intervención se identificaron los microorganismos con el panel de BCID y se incluyó recomendaciones del programa de uso racional de antibióticos. Se encontró que la implementación de una tecnología de identificación rápida del organismo combinada con un programa de administración antimicrobiana en tiempo real se asoció con un uso antimicrobiano mejorado en niños. El uso de antimicrobianos fue optimizado en 33.5 horas, las terapias antimicrobianas efectivas para infecciones del torrente sanguíneo se iniciaron 3.5 horas antes, la

preinscripción antimicrobiana para cultivos contaminantes disminuyó de 76% al 26% y los días de estadía disminuyeron 3.8 días comparado con el grupo de pre-intervención (139).

En otros estudios como los de Vali y col realizaron un estudio de la epidemiología molecular de 13 aislados de *P. aeruginosa* portadora de carbapenemasas en un hospital de Teherán. Para ello utilizaron PFGE. Los resultados mostraron que siete de ellos fueron estrechamente relacionados en el mismo hospital. De acuerdo a lo encontrado se recomendó separar a los pacientes (cohortizar) y diseñar políticas de control de infecciones (123).

Impacto económico de la utilización de las herramientas biotecnológicas en los sistemas de salud para el diagnóstico de las bacterias portadoras de carbapenemasas.

La resistencia bacteriana tiene enormes implicaciones económicas, estudios han reportado que las bacterias resistentes relacionadas a las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), en Bacilos Gram Negativos (BGN) tiene un costo de USD 40.406 en pacientes sensibles y de USD 79.323 en pacientes resistentes al tratamiento. El costo hospitalario medio de una hospitalización de 9 días en la cual se desarrolló una resistencia a antibióticos es de USD 29.379 (140). El impacto económico del fenotipo de *P. aeruginosa* MDR, fue de 54.081 dólares comparado con el costo de hospitalización de USD 22.116 para pacientes con infecciones susceptibles a *P. aeruginosa* (141). El costo de las medidas de control para erradicar los brotes adquiridos de organismos multirresistentes (MDRO) varió de €285 a €57 532 por paciente positivo ya que es necesario para su erradicación implementar medidas como interrumpir nuevas admisiones, pruebas de laboratorio, personal adicional y los costos de precaución de contacto de €166 a €10 438 por paciente positivo (142).

En cuanto al costo de hospitalización de los pacientes con bacterias MDR en Colombia, el estudio de Lemos y col en el 2013 determinó el impacto económico de una infección por *A. baumannii* en pacientes de UCI. El costo promedio total de hospitalización entre los pacientes con *A. baumannii*, resistentes a carbapenémicos fue significativamente mayor que entre los

pacientes con *A. baumannii*, susceptibles a carbapenémicos (costo ajustado: USD 11 359 versus USD 7049) (143).

Ho y col en el 2016 realizaron un estudio de vigilancia activa *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos (CRE) en unidades de cuidados intensivos (UCI) en un hospital de Hong Kong donde se examinó la relación costo-efectivo de la vigilancia activa utilizando para ello un protocolo de rastreo rectales para la búsqueda de pacientes portadores de CRE. Se tomaron dos grupos, uno de vigilancia activa de la CRE (rastreos rectales) y otro grupo control donde no había vigilancia activa; los pacientes que ingresaban a UCI se les realizaba una prueba de PCR convencional de hisopado rectal al momento del ingreso y cada tres días durante la estancia en UCI, si la prueba era positiva el paciente era aislado con precauciones de contacto. Para el análisis de los costos se tomó en cuenta el costo de la PCR, la estancia en UCI y del tratamiento; para el análisis costo efectivo se comparó el costo con la tasa de mortalidad, pérdida de año de vida ajustado a la calidad y tasa de infección por CRE (144). Los resultados obtenidos del estudio mostraron que aunque el grupo de vigilancia fue inicialmente más costoso que el grupo control (USD 1,260 vs USD 1,256), el grupo de vigilancia tuvo una tasa de infección menor de CRE (5.670% vs 5.902%), una disminución en la tasa de mortalidad (2.139% vs 2.45) y una disminución en pérdida de año de vida ajustado a la calidad (0.3335 vs 0.3827) comparado con el grupo control. Esta disminución en las tasas de infección, de mortalidad y de la pérdida de la calidad de vida mostraron en el análisis costo – efectivo que el grupo de vigilancia fue menos costoso que el grupo control en un 65.4% de la simulación con un ahorro entre USD 131- USD 141 por paciente en UCI (144).

Lapointe y col en el 2017 realizaron un análisis de costo efectividad del uso de las pruebas de detección para *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasa (CPE, por su sigla en Inglés) en pacientes hospitalizados en Estados Unidos, para esto compararon dos grupos uno al que se le realizó la prueba de detección CPE por PCR convencional tomando la muestra de hisopado rectal al momento del ingreso a la institución y otro grupo al que no se le realizó la prueba. Para el análisis de costos se tomó en cuenta el costo de la prueba de detección, el costo del aislamiento del paciente y el de una infección resistente a los antimicrobianos; para el análisis costo efectivo se comparó el costo, el número de pacientes colonizados y muertes clínicas relacionadas con

CPE, años de vida ajustados a la calidad esperados (QALYs, por su sigla en Inglés)(145). Los resultados obtenidos del estudio mostraron con la prueba PCR de detección prevenía seis casos de colonización de CPE por cada 1000 pacientes (1/1000 colonizado con la prueba de detección, 7/1000 sin la prueba), más de la mitad de todas las infecciones sintomáticas de CPE (2/10.000 sintomáticos con prueba de detección, 5/10.000 sintomáticos sin la prueba), y casi la mitad de todas las muertes relacionadas con CPE (8 / 100.000 muertes con la prueba de detección, 15/100.000 muertes sin la prueba). El tamizaje acumuló 0.0012 QALYs adicionales y un costo adicional de USD 79.60 por paciente, en comparación con la no realización de la prueba de detección. La implementación de la prueba de detección fue costo-efectivo (USD 68.164 por QALY ganado en comparación con la no realización de la prueba). Adicionalmente se observó que la prueba de detección significó un ahorro en casos de prevalencia de CPE por encima del 0.3% en comparación con la no realización de la prueba(145).

Pardo y col en el 2016 evaluaron el impacto clínico y económico del panel BCID de FilmArray® en hemocultivos positivos en un estudio retrospectivo en el Hospital de la Universidad de Florida comprando 84 pacientes adultos con 252 pacientes históricos como grupo control a los que se les había realizado identificación y susceptibilidad por métodos convencionales. El análisis de costo se realizó teniendo en cuenta las variables de los días de estancia, costos de UCI después de que el hemocultivo fue detectado como positivo, mortalidad y el costo en los que incurrió la institución después del cultivo positivo, también se tuvo en cuenta la diferencia de antibióticos entre los dos periodos de tiempo, el costo del panel de BCID fue calculado en USD129 por paciente. Los resultados obtenidos muestran una correlación del 100% con los organismos aislados comparado con el método estándar y estos estuvieron disponibles 24.7 horas antes de la identificación preliminar del organismo y 47 horas antes del reporte final de identificación y susceptibilidad del microorganismo comparado con el método convencional. El panel de BCID disminuyó los costos comparado con el grupo control; para el grupo de BCID los costos fueron de USD 1,645 y para el grupo control USD 3,370 lo que significó un ahorro de USD 1,725 por paciente, lo que compensaría los costos adicionales de laboratorio del panel de BCID (USD129), se podría ahorrar aproximadamente USD 30,000 por cada 100 pacientes. El uso del panel de BCID se asoció con la disminución de los costos totales, los costos de la UCI y la mortalidad y

con un mejor uso de los antibióticos lo que lo hace una herramienta rentable en el programa de uso racional de antibióticos (146).

Patel y col en el 2017 evaluaron el impacto económico del uso del MALDI-TOF en combinación con el programa de uso racional de antibióticos en pacientes con infecciones del torrente sanguíneo. Para esto se incluyeron 247 pacientes en el grupo de pre-intervención y 233 en el grupo de intervención. Para el análisis de costo se tuvo en cuenta la mortalidad, los días de estancia del paciente, el costo total del hospital y el costo de la implementación de la metodología utilizada el cual fue de USD 5,639 en la parte de pre-intervención y de USD 18,362 en la parte de intervención con el MALDI-TOF.

En los resultados obtenidos se observó que la mortalidad en 30 días se redujo significativamente en el grupo de intervención (12%) en comparación con el grupo de pre-intervención (21%). Adicionalmente se observó disminución en los días de estancia (13.0 +/- 16.5 días versus 14.2 +/- 16.7 días), el costo unitario de la atención por infecciones del torrente sanguíneo por paciente (USD 10,833 versus USD 13,727), el costo total de la hospitalización a pesar del costo adicional de la implementación del MALDI-TOF (USD 42,580 versus USD 45,019). Todos estos resultados demostraron que el costo total disminuyó en USD 2,439 para un ahorro anual aproximado de USD 2.34 millones. En conclusión, en este estudio demostró que la implementación de la tecnología MALDI-TOF en conjunto con la administración del medicamento en tiempo real disminuyó la mortalidad, la duración de la hospitalización en un día y los costos para la institución (147).

Sango y col en el 2013 evaluaron el impacto clínico y económico del uso del microarreglo Verigene® BC-GP en pacientes con hemocultivos positivos en 74 pacientes en el Hospital Jacksonville de Florida, 46 pacientes en el grupo de pre-intervención que utilizaron los métodos convencionales para identificación y susceptibilidad y 28 pacientes en el de intervención donde se implementó la tecnología. Para el análisis de costos se tuvo en cuenta la duración de la estancia hospitalaria, la mortalidad, los costos hospitalarios y el tiempo para la terapia antimicrobiana. En los resultados se observa que los días de estancia hospitalarias en el grupo de

intervención disminuyeron 21.7 días con respecto al grupo de pre-intervención, la tasa de mortalidad fue menor en la intervención (15.2% versus 39.3%), los gastos hospitalarios disminuyeron USD 60.729 (USD 103,075 y USD 42,346) comparado con el grupo de pre-intervención, El tiempo para la terapia también disminuyó 23.4 horas en la intervención. La correlación entre los resultados del BC-GP y los métodos convencionales fue del 100% y la disminución en el tiempo del resultado desde la positividad del hemocultivo hasta su reporte fue de 47.45 horas comparado con los métodos convencionales. Este estudio demostró que la implementación de la tecnología Verigene® BC-GP disminuyó la exposición prolongada al antimicrobiano, la duración de la hospitalización, los costos para la institución y el tiempo de respuesta de las pruebas de laboratorio comparado con los métodos convencionales.

Metodología Utilizada

Estrategia de búsqueda.

Se realizó la búsqueda bibliográfica del tema seleccionado en las bases de datos bibliográficas PubMed, Science direct y Scopus en donde se revisaron artículos primarios originales y artículos secundarios de diferentes revistas a nivel mundial. Se utilizaron palabras claves y sus combinaciones como: resistencia a carbapenémicos, CREs, *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp*, MDR, β -lactamasas, mecanismos de resistencia, *Enterobacteriaceae*, carbapenemasas, Gram negativos, impacto económico, diagnóstico, PCR, MALDI TOF, Microarreglos, costos, impacto clínico y modificación enzimática. No se aplicó ninguna restricción de idiomas. Se utilizó el programa Mendeley en el formato vancouver para el manejo de la bibliografía.

Criterios de inclusión y exclusión.

Se incluyeron artículos relacionados con la resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*. y *Acinetobacter spp*. relacionados con la producción de carbapenemasas, su clasificación, las pruebas diagnósticas para la detección de las carbapenemasa y la evaluación del impacto clínico y económico de los Gram negativos productores de carbapenemasas. Se

excluyeron artículos no relacionados con estudios clínicos como los estudios que incluyeran animales, las pruebas de diagnóstico que se emplearon para evaluar otros mecanismos diferentes a las carbapenemasas, mecanismos de resistencia a carbapenémicos diferentes a las carbapenemasa, no se tomaron en cuenta microorganismos diferentes a los establecidos en los criterios de inclusión.

Una vez hecha la búsqueda bibliográfica se evaluó su calidad metodológica y calidad científica mediante el programa CASPe, evaluando la calidad de los datos en 5 aspectos principales: ¿son válidos los resultados?, ¿cuáles son los resultados?, ¿son pertinentes o aplicables estos resultados en mi medio?, ¿Es válida la evaluación económica? y ¿Cómo se evalúan y comparan los costos? Comentarios y artículos relacionados proporcionaron información adicional que ayudo en el proceso de evaluación crítica. De acuerdo a la evaluación realizada se seleccionaron 147 documentos.

Análisis de la monografía

Las carbapenemasas actualmente son un problema de salud pública a nivel mundial causando gran preocupación en el ambiente hospitalario. Son de gran importancia las carbapenemasas de clase A (KPC), B (NDM) y D (OXA) las cuales se han diseminado por todos los continentes (América, África, Europa, Asia y Oceanía) superando las barreras intercontinentales. Las carbapenemasas tipo KPC, la carbapenemasa más común a nivel mundial, son endémicas en Estados Unidos, Grecia, Israel, Argentina, Brasil, Italia, China, Taiwán y Colombia. Las tipo NDM son endémicas en Pakistán, India, Bangladesh y China. Las tipo OXA son endémicas en Marruecos, Túnez, Libia, Egipto, Turquía, India y Malta, siendo India un país endémico para estos tres tipos de carbapenemasas. Un factor que favorece esta diseminación intercontinental son los viajes de pacientes portadores a otros países por lo que es importante conocer la prevalencia de las carbapenemasas en cada región.

La diseminación principalmente se da por medio de elementos genéticos móviles lo que permite que incluso superen las barreras entre especies. Este es el caso de la carbapenemasa tipo KPC

que inicialmente se encontró en *Enterobacteriaceae* y 11 años después se encontró en *Pseudomonas* spp.; otro ejemplo se dio con las tipo VIM inicialmente se aislaron en *P. aeruginosa* y 4 años después en *Enterobacteriaceae*; las NDM inicialmente se aislaron en *Enterobacteriaceae* y 2 años después en *A. baumannii*.

La evolución de las carbapenemasas ha llevado a la necesidad de implementar herramientas de diagnóstico rápidas que permitan detectarlas en el menor tiempo posible y así poder dar al paciente una terapia adecuada; este es el caso de, infecciones del torrente sanguíneo en las cuales el tiempo puede ser la diferencia entre la vida y la muerte del paciente.

También es importante identificar los pacientes colonizados para evitar la diseminación en las instituciones de los microorganismos productores de carbapenemasas, más aun en la era de la salud global, en la cual los pacientes están viajando constantemente no solo entre hospitales, sino inclusive entre países o continentes.

Desafortunadamente los métodos diagnósticos que se tienen actualmente en muchos de los laboratorios en Colombia son fenotípicos y no permiten entregar un diagnóstico en menos de 18 - 24 horas. Estos métodos no detectan efectivamente todas las carbapenemasas y no permiten alertar oportunamente al personal médico sobre un paciente infectado o colonizado con un microorganismo portador de carbapenemasa.

Las herramientas moleculares sin embargo han permitido reducir el tiempo de diagnóstico incluso a menos de una hora a partir del microorganismo aislado o de la muestra, con un porcentaje de sensibilidad y especificidad alto. Algunas de estas herramientas permiten la identificación directa de muestras como hemocultivos positivos o hisopados rectales como el MALDI-TOF, PCR en tiempo real y Microarreglos, lo que favorece una detección más rápida de microorganismos productores de carbapenemasas. Existe la argumentación sobre las limitaciones de las pruebas moleculares asociadas al costo de las pruebas y la necesidad de personal especializado en las técnicas y en algunos casos áreas especiales para el montaje de las pruebas por lo que hace que las metodologías moleculares sean pocas utilizadas. Sin embargo en

este momento, estas limitaciones pueden superarse, ya los estudios de impacto clínico y costo - efectividad demuestran que la utilización de pruebas moleculares disminuyen el tiempo y costo hospitalario lo que compensa el costo de la prueba. Por otro lado, al momento hay pruebas en el mercado disponibles que no necesitan áreas separadas, ni personal especializado para su utilización, haciendo aún más fácil la implementación de las mismas en cualquier laboratorio clínico.

Conclusiones

Como se pudo evidenciar en la revisión, las herramientas biotecnológicas se han venido utilizando para el desarrollo de herramientas diagnósticas a nivel mundial. En el caso del diagnóstico de carbapenemasas, aunque aún se requieren un mayor número estudios clínicos, los primeros resultados muestran de manera contundente como utilizando herramientas tipo MALDI-TOF, PCR en tiempo real o Microarreglos en la rutina de laboratorio clínico, combinado con una estrategia de uso racional de antibióticos, disminuye los tiempos de respuesta lo que impacta directamente en los costos ya que contribuyen a una selección adecuada del tratamiento del paciente y mejoran los índices de morbi-mortalidad. Estos estudios también muestran claramente como se ha logrado implementar medidas de prevención para evitar la diseminación de los microorganismos productores de carbapenemasas.

A pesar de tener varias técnicas disponibles a nivel mundial para el diagnóstico de carbapenemasas, pocas se han comercializado en Colombia, lo que hace que su implementación sea muy limitada.

Es importante lograr difundir la información acá presentada en las instituciones hospitalarias en Colombia sobre la importancia de implementar el diagnóstico molecular en la detección de bacterias portadoras de carbapenemasas ya que el diagnóstico rápido es la base del programa de uso racional de antibióticos.

Bibliografía

1. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO. World Health Organization; 2016;
2. Niaid. NIAID Antimicrobial Resistance Program: Current Status and Future Directions 2014. 2014 [cited 2017 May 13]; Available from:
<https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/arstrategicplan2014.pdf>
3. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. BMC Microbiol [Internet]. 2017 Dec 27 [cited 2017 Aug 5];17(1):101. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449650>
4. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):313–22.
5. Dale-Skinner J, Bonev B. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance: The Need for Novel Antimicrobial Therapies. Combat Bact Infect [Internet]. 2008 [cited 2016 Dec 2]; Available from:
[https://books.google.de/books?hl=en&lr=&id=Hrdzorisyp8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=9. Dale-Skinner+JW,+Bonev+BB+\(2008\)+Molecular+Mechanisms+of+Antibiotic+Resistance:+++++Infection:+1.&ots=Qg539VumII&sig=bgoV2GjJZyg0R46eCsZJ1umotGw](https://books.google.de/books?hl=en&lr=&id=Hrdzorisyp8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=9. Dale-Skinner+JW,+Bonev+BB+(2008)+Molecular+Mechanisms+of+Antibiotic+Resistance:+++++Infection:+1.&ots=Qg539VumII&sig=bgoV2GjJZyg0R46eCsZJ1umotGw)
6. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell [Internet]. 2007 Mar 23 [cited 2016 Dec 10];128(6):1037–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382878>
7. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics [Internet]. 2009 May [cited 2016 Dec 10];1794(5):808–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100346>
8. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. Mayo Clin Proc [Internet]. Mayo Foundation; 2012 Feb [cited 2016 Dec 10];87(2):198–208. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305032>

9. Livermore DM. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 Jan 15 [cited 2016 Dec 4];36(Supplement 1):S11–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516026>
10. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.
11. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 Aug 5];20(9):839–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24813781>
12. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Dec 5];45(6):568–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857949>
13. OMS | La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. WHO [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Mar 5]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
14. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Research; 2014 Dec 1 [cited 2016 Dec 10];13(1):42–51. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3380>
15. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2017 Aug 12];23(1):160–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065329>
16. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Aug 21];29(1):1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511484>
17. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. NIH Public Access; 2016 Apr [cited 2017 Jul 24];4(2). Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227291>
18. 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* [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 Aug 6];16(2):112–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085605>
 19. Nordmann P. Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *médecine/sciences* [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2017 Jul 22];26(11):950–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106177>
 20. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Aug 5];50(2):127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28647532>
 21. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*. 2016.
 22. Findlay J, Hopkins KL, Doumith M, Meunier D, Wiuff C, Hill R, et al. KPC enzymes in the UK: an analysis of the first 160 cases outside the North-West region. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. Oxford University Press; 2016 May [cited 2017 Oct 23];71(5):1199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846210>
 23. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2017 May 23];300(6):371–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537585>
 24. Swathi C, Chikala R, Ratnakar K, Sritharan V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *Indian J Med Res* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Sep 11];144(1):21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27834322>
 25. Villegas M V., Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2017 Oct 7];51(4):1553–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261621>

26. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 Oct [cited 2017 Aug 6];17(10):1791–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000347>
27. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2017 Mar 4 [cited 2017 Aug 6];15(3):277–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27915487>
28. Zahedi Bialvaei A, Samadi Kafil H, Ebrahimzadeh Leylabadlo H, Asgharzadeh M, Aghazadeh M. Dissemination of carbapenemases producing Gram negative bacteria in the Middle East. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2015 Oct [cited 2017 Sep 11];7(5):226–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26719779>
29. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis* [Internet]. 2017 Feb 15 [cited 2017 Aug 6];215(suppl_1):S28–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28375512>
30. Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Oct 15];17(1–2):24–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136876461400003X>
31. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Elsevier; 2011 Jan 1 [cited 2017 Oct 15];17(1):52–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219078>
32. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria.
33. Yordanov D, Strateva T. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2017 Jul 22];58(9):1133–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528173>
34. Labarca JA, Salles MJC, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin

- America. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2014 Aug 27 [cited 2017 Sep 11];42(2):1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159043>
35. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resistance Updates*. 2016.
 36. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Aug 4];32 Suppl 4:17–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X14701703>
 37. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Oct 8];2(5):501–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927473>
 38. Lee SH, Jeong SH, Cha S-S. Screening for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006 Nov [cited 2017 Oct 8];6(11):682–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067915>
 39. Song JS, Jang SJ, Lee JJ, Lee JH, Bae IK, Jeong BC, et al. Association of the bla_{CMY-10} gene with a novel complex class 1 integron carrying an ISCR1 element in clinical isolates from Korea. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2010 Jul [cited 2017 Oct 8];16(7):1013–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681956>
 40. Fresnadillo Martínez MJ, García García MI, García Sánchez E, García Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. Elsevier; 2010 Sep [cited 2017 May 21];28:53–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X10700318>
 41. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 Carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2017 Oct 16];51(6):2001–4. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00226-07>
 42. Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Karam Sarkis D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2014 Dec [cited 2016 Dec 10];107:106–18. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214002875>

43. E. BH. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: AUTOMATIZACIÓN Y ALGUNAS APLICACIONES EN IDENTIFICACIÓN MICROBIANA Y ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2015;26(6):753–63.
44. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. [cited 2017 Oct 9]; Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
45. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother* [Internet]. 2016 Jan 2 [cited 2017 Sep 11];28(1):1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256147>
46. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2002 Jun [cited 2017 Aug 22];8(6):321–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084099>
47. CLINICAL AND LABORATORY STANDAR INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 27th Ed [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 29]; Available from: https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf
48. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1978 Jan [cited 2017 Oct 9];7(1):102–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/415067>
49. 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* [Internet]. 2001 Feb [cited 2017 Oct 9];7(2):88–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298149>
50. Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-β-lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2008 Feb 4 [cited 2017 Oct 9];61(3):548–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18222954>
51. Cercenado E. [Laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*]. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Sep 11];28 Suppl 1:8–11. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365726>
52. Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2017 Oct 9];65(2):249–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996141>
 53. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Aug 5];37(2):303–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28457352>
 54. Azimi L, Talebi M, Owlia P, Pourshafie M-R, Najafi M, Lari ER, et al. Tracing of false negative results in phenotypic methods for identification of carbapenemase by Real-time PCR. *Gene* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2017 Oct 25];576(1 Pt 1):166–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111915012159>
 55. Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Euro Surveill* [Internet]. 2009 May 28 [cited 2017 Oct 9];14(21). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19480809>
 56. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut Pathog* [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 9];6(1):13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860620>
 57. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2017 Oct 10];50(11):3773–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972829>
 58. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Aug 21];53(12):3908–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424841>
 59. Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, et al. Multicenter Performance Assessment of Carba NP Test. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Aug 20];55(6):1954–60. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404676>
60. Dortet L, Bréchar L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Oct 9];20(4):340–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889766>
 61. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2015 Nov [cited 2017 Aug 21];119(5):1219–33. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26251303>
 62. Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2015 Sep 1 [cited 2017 Oct 9];53(9):3003–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085619>
 63. Aktaş E, Malkoçoğlu G, Otlu B, Çopur Çiçek A, Külah C, Cömert F, et al. Evaluation of the Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Comparison with the RAPIDEC CARBA NP. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 Aug 21];23(4):457–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27575912>
 64. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10(3).
 65. Aguirre-Quiñonero A, Cano ME, Gamal D, Calvo J, Martínez-Martínez L. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Jul [cited 2017 Oct 10];88(3):214–8. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889317300858>
 66. Gniadek TJ, Carroll KC, Simner PJ. Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Aug 21];54(7):1700–10. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912753>
67. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2016 Dec 10];65(7):1319–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395214>
 68. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2002 Oct [cited 2016 Dec 10];40(10):3798–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354884>
 69. Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno Jesús Oteo Iglesias Germán Bou Arevalo Fernando Chaves Sánchez Antonio Oliver Palomo Jesús Oteo Iglesias Editores Coordinador Autores E, Arevalo BG, Sánchez CF, Palomo OA. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. [cited 2017 Oct 10]; Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>
 70. Sundin D. Hidden Beta-Lactamases in the Enterobacteriaceae – Dropping the Extra Disks for Detection, Part II. *Clin Microbiol Newsl* [Internet]. Elsevier; 2009 Apr 1 [cited 2017 Oct 9];31(7):47–52. Available from: <http://nebulosa.icesi.edu.co:2057/science/article/pii/S0196439909000154>
 71. Elsherif R, Ismail D, Elawady S, Jastaniah S, Al-Masaudi S, Harakeh S, et al. Boronic acid disk diffusion for the phenotypic detection of polymerase chain reaction-confirmed, carbapenem-resistant, gram-negative bacilli isolates. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2017 Aug 21];16(1):135. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27368987>
 72. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Oct 10];41(2):772–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574281>
73. Shoja S, Moosavian M, Rostami S, Farahani A, Peymani A, Ahmadi K, et al. Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in patients with burn injuries. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 Sep 3];80(4):245–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28268175>
 74. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* [Internet]. Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo; 2010 [cited 2017 Oct 10];65(9):825–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049207>
 75. bioMérieux. ETEST® para la detección de Resistencia antimicrobiana (ARD) | bioMérieux Colombia [Internet]. [cited 2017 Sep 3]. Available from: [http://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/etestr-para-la-deteccion-de-resistencia-antimicrobiana-ard#Detección de Metallo β-Lactamase_0_4](http://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/etestr-para-la-deteccion-de-resistencia-antimicrobiana-ard#Detección%20de%20Metallo%20β-Lactamase_0_4)
 76. Aguirre-Quñonero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2017.
 77. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012 May [cited 2017 Aug 6];18(5):432–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507110>
 78. Qu T, Zhang J, Wang J, Tao J, Yu Y, Chen Y, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2009 Apr [cited 2017 Oct 10];47(4):1136–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213696>
 79. Wassef M, Abdelhaleim M, Ghaith D, El-Mahdy Y. Emerging New Delhi metallo-β-lactamase-1-type-producing Gram-negative bacteria isolated from Cairo University Pediatric Hospital, Cairo, Egypt. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2016 Dec [cited 2017 Aug 21];7:84–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27685673>
 80. Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF, Zhu W, Kitchel B, Watz N, et al. IMP-

- producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2011 Dec [cited 2017 Oct 10];49(12):4239–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998425>
81. Panagea T, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagarTM KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Aug 22];37(2):124–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177079>
 82. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016 May [cited 2017 Aug 21];71(5):1217–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825120>
 83. Fernández J, Fleites A, Rodcio MR, Vazquez F. Evaluation of OXA-48 K-Se T: an immunochromatographic assay for rapid detection of OXA-48–producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016 May [cited 2017 Oct 10];85(1):12–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889316000341>
 84. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MHFA. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K -SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Oct 11];54(2):471–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607983>
 85. Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain J-M. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Dec 10];37(6):544–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857911001038>
 86. Ding B, Shen Z, Hu F, Ye M, Xu X, Guo Q, et al. In vivo Acquisition of Carbapenemase Gene blaKPC-2 in Multiple Species of Enterobacteriaceae through Horizontal Transfer of Insertion Sequence or Plasmid. *Front Microbiol* [Internet]. Frontiers Media SA; 2016 [cited 2016 Dec 12];7:1651. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818649>
87. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2017 Oct 13];36(2):380–407. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
 88. Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, Boyd DA, Mulvey MR, Westmacott GR. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Oct 11];111:21–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25644285>
 89. Lee W, Chung H-S, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. 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* [Internet]. 2013 Nov [cited 2017 Oct 11];77(3):227–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993215>
 90. Kost K, Yi J, Rogers B, Jerris R. Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Pract Lab Med* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Oct 11];8:18–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28856222>
 91. Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EAM, Okamoto D, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2017 Aug 22];69(8):2132–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722840>
 92. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2016 Dec 2 [cited 2017 Aug 5];15(1):5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839024>
 93. Rand KH, Delano JP. Direct identification of bacteria in positive blood cultures: comparison of two rapid methods, FilmArray and mass spectrometry. *Diagn Microbiol*

- Infect Dis [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Aug 22];79(3):293–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24767683>
94. Sakarikou C, Ciotti M, Dolfra C, Angeletti S, Favalli C. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Microbiol [Internet]. BioMed Central; 2017 Mar 8 [cited 2017 Oct 11];17(1):54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28274205>
 95. Zboromyrska, Yuliya; Ferrer, Mario; Marco, Francese; Vila J. Detection of antibacterial resistance by MALDI-TOF mass spectrometry. Rev Esp Quim [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 11];27:87–9. Available from: <http://seq.es/seq/0214-3429/27/2/yuliya.pdf>
 96. Bloemberg G V., Braun-Kiewnick A, Tedrup J, Meijerink C, Durer E, Ritter C, et al. Evaluation of the AID carbapenemase line probe assay for rapid detection and identification of carbapenemase genes in Gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2017 Jul 11 [cited 2017 Aug 20];72(7):1948–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402500>
 97. Bloemberg G V., Polsfuss S, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the AID ESBL line probe assay for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and KPC carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother [Internet]. Oxford University Press; 2014 Jan 1 [cited 2017 Oct 11];69(1):85–90. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt345>
 98. Cheng C, Zheng F, Rui Y. Rapid Detection of *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{VIM} Carbapenemase Genes in Bacteria by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Microb Drug Resist [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Oct 11];20(6):533–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000338>
 99. Kim HJ, Kim HS, Lee JM, Yoon SS, Yong D. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Harboring *bla*(VIM-2), *bla*(IMP-1) and *bla*(OXA-23) genes by using loop-mediated isothermal amplification methods. Ann Lab Med [Internet]. Korean Society for Laboratory Medicine; 2016 Jan [cited 2017 Oct 11];36(1):15–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522754>
 100. Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla

- P, et al. Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla NDM, bla OXA-48, bla VIM, bla IMP-14 and bla KPC groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017 Jul 5 [cited 2017 Aug 6];33(7):130. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585170>
101. Solanki R, Vanjari L, Ede N, Gungi A, Soory A, Vemu L. Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of blaNDM-1 and blaKPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *J Med Microbiol* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2017 Oct 11];62(Pt_10):1540–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800599>
102. Vergara A, Zboromyrska Y, Mosqueda N, Morosini MI, Garcia-Fernandez S, Roca I, et al. Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Methodology To Detect Carbapenemase Carriage in Acinetobacter Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2017 Oct 11];58(12):7538–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224010>
103. Garcia-Fernandez S, Morosini M-I, Marco F, Gijon D, Vergara A, Vila J, et al. Evaluation of the eazyplex(R) SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2014 Nov 26 [cited 2017 Oct 11];70(4):1047–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428926>
104. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Mod Med Coll J* [Internet]. 2013 Feb 6 [cited 2017 Oct 11];4(1). Available from: <http://www.banglajol.info/index.php/AKMMCJ/article/view/13682>
105. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, de Souza PRE, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* [Internet]. Elsevier; 2009 Jan [cited 2017 Oct 11];40(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031310>
106. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and

- optimization strategies. *J Vis Exp* [Internet]. MyJoVE Corporation; 2012 May 22 [cited 2017 Oct 12];(63):e3998. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664923>
107. Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy, Asthma Immunol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2017 Oct 12];101(4):437–43. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18939735>
 108. Markoulatos P, Sifakakos N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2002 [cited 2017 Oct 12];16(1):47–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835531>
 109. Cepheid. Datasheet XPERT CARBA-R [Internet]. [cited 2017 Oct 12]. Available from: http://cepheid.com/administrator/components/com_productcatalog/library-files/93eee8a71f1ef27462a70a0ba22fd8f4-a592a437b2387d232128ea7dda751100-Xpert-Carba-R-Datasheet-US-0561-02.pdf
 110. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 May [cited 2017 Oct 12];70(5):1338–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25630646>
 111. McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, Shupe A, Burnham C-AD. Evaluation of Genotypic and Phenotypic Methods to Detect Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli. *Clin Chem* [Internet]. 2017 Mar [cited 2017 Oct 12];63(3):723–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28073895>
 112. O'Connor C, Kiernan MG, Finnegan C, O'Hara M, Power L, O'Connell NH, et al. An optimized work-flow to reduce time-to-detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) using direct testing from rectal swabs. *Bioengineered* [Internet]. 2017 May 4 [cited 2017 Oct 12];8(3):217–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27533488>
 113. Rood IG, Li Q. Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2017 Sep 11]; Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28865742>
114. Lau AF, Fahle GA, Kemp MA, Jassem AN, Dekker JP, Frank KM. Clinical Performance of Check-Direct CPE, a Multiplex PCR for Direct Detection of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and/or *bla*_{VIM}, and *bla*_{OXA-48} from Perirectal Swabs. Burnham C-AD, editor. J Clin Microbiol [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Oct 12];53(12):3729–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338860>
 115. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, et al. Detection of metallo-β-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. J Microbiol Methods [Internet]. 2010 Nov [cited 2017 Oct 12];83(2):185–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701210002800>
 116. Fiori B, D’Inzeo T, Giaquinto A, Menchinelli G, Liotti FM, de Maio F, et al. Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. Richter SS, editor. J Clin Microbiol [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Oct 12];54(3):576–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26677254>
 117. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, Ruppelt A, Makarewicz O, Pletz M, et al. Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. PLoS One. 2014;9(7).
 118. Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M. Microarray and its applications. J Pharm Bioallied Sci [Internet]. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2012 Aug [cited 2017 Oct 13];4(Suppl 2):S310-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066278>
 119. Bogaerts P, Cuzon G, Evrard S, Hoebeke M, Naas T, Glupczynski Y. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β-lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Aug 21];48(2):189–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27374747>
 120. Dodémont M, De Mendonça R, Nonhoff C, Roisin S, Denis O. Performance of the Verigene Gram-negative blood culture assay for rapid detection of bacteria and resistance

- determinants. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2014 Aug [cited 2017 Oct 13];52(8):3085–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899026>
121. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2017 Aug 22];67(8):1865–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22604450>
 122. Chang N, Jiang Q, Taylor DE. Construction of a Genomic Map of *H. pylori* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). In: *Helicobacter pylori Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 1997 [cited 2017 Oct 13]. p. 165–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351032>
 123. Vali P, Shahcheraghi F, Seyfipour M, Zamani MA, Allahyar MR, Feizabadi MM. Phenotypic and Genetic Characterization of Carbapenemase and ESBLs Producing Gram-negative Bacteria (GNB) Isolated from Patients with Cystic Fibrosis (CF) in Tehran Hospitals. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Oct 13];8(1):26–30. Available from: http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=1&page=26&issn=0973-709x&id=3916
 124. Pantel A, Marchandin H, Prère M-F, Boutet-Dubois A, Brieu-Roche N, Gaschet A, et al. Faecal carriage of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in hospital settings in southern France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2015 May 23 [cited 2017 Oct 13];34(5):899–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532506>
 125. Gottig S, Gruber TM, Stecher B, Wichelhaus TA, Kempf VAJ. In Vivo Horizontal Gene Transfer of the Carbapenemase OXA-48 During a Nosocomial Outbreak. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2017 Oct 13];60(12):1808–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759432>
 126. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RGS, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence–

- based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013 Dec [cited 2017 Oct 13];77(4):337–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074766>
127. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 Oct 13];63(3):427–37. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkn547>
128. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C, ESGAP (ESCMID Study Group for Antimicrobial stewardship). What is antimicrobial stewardship? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017 Sep 4 [cited 2017 Oct 5]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882725>
129. Morgan DJ, Malani P, Diekema DJ. Diagnostic Stewardship-Leveraging the Laboratory to Improve Antimicrobial Use. *JAMA* [Internet]. 2017 Aug 15 [cited 2017 Oct 5];318(7):607–8. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2017.8531>
130. Karaaslan A, Soysal A, Altinkanat Gelmez G, Kepenekli Kadayifci E, Söyletir G, Bakir M. Molecular characterization and risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacilli colonization in children: emergence of NDM-producing *Acinetobacter baumannii* in a newborn intensive care unit in Turkey. *J Hosp Infect* [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Oct 3];92(1):67–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601601>
131. Kim D-K, Kim HS, Pinto N, Jeon J, D'Souza R, Kim MS, et al. Xpert CARBA-R Assay for the Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Intensive Care Unit Patients of a Korean Tertiary Care Hospital. *Ann Lab Med* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Oct 12];36(2):162. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709264>
132. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, et al. Multisite Evaluation of Cepheid Xpert Carba-R Assay for Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Rectal Swabs. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Oct 14];54(7):1814–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27122379>
133. Hill JT, Tran K-DT, Barton KL, Labreche MJ, Sharp SE. Evaluation of the Nanosphere

- Verigene BC-GN Assay for Direct Identification of Gram-Negative Bacilli and Antibiotic Resistance Markers from Positive Blood Cultures and Potential Impact for More-Rapid Antibiotic Interventions. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2017 Oct 3];52(10):3805–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122857>
134. Walker T, Dumadag S, Lee CJ, Lee SH, Bender JM, Cupo Abbott J, et al. Clinical Impact of Laboratory Implementation of Verigene BC-GN Microarray-Based Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria in Positive Blood Cultures. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2017 Oct 5];54(7):1789–96. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00376-16>
135. Bookstaver PB, Nimmich EB, Smith TJ, Justo JA, Kohn J, Hammer KL, et al. Cumulative Effect of an Antimicrobial Stewardship and Rapid Diagnostic Testing Bundle on Early Streamlining of Antimicrobial Therapy in Gram-Negative Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Sep [cited 2017 Oct 3];61(9):e00189-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630187>
136. Maurer FP, Christner M, Hentschke M, Rohde H. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infect Dis Rep* [Internet]. 2017 Mar 30 [cited 2017 Oct 5];9(1):6839. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28458798>
137. Wong D, Spellberg B. Leveraging antimicrobial stewardship into improving rates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence* [Internet]. 2017 May 19 [cited 2017 Oct 3];8(4):383–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187821>
138. Banerjee R, Teng CB, Cunningham SA, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction–Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2017 Oct 5];61(7):1071–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197846>
139. Messacar K, Hurst AL, Child J, Campbell K, Palmer C, Hamilton S, et al. Clinical Impact and Provider Acceptability of Real-Time Antimicrobial Stewardship Decision Support for Rapid Diagnostics in Children With Positive Blood Culture Results. *J Pediatric Infect Dis Soc* [Internet]. 2016 Aug 19 [cited 2017 Oct 12];6(3):piw047. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543412>
140. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable Hospital Cost and Length of Stay Associated with Health Care-Associated Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2016 Dec 26];54(1):109–15. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01041-09>
 141. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* [Internet]. NIH Public Access; 2010 Aug [cited 2016 Dec 11];10(4):441–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20715920>
 142. Birgand G, Moore LSP, Bourigault C, Vella V, Lepelletier D, Holmes AH, et al. Measures to eradicate multidrug-resistant organism outbreaks: how much do they cost? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Elsevier; 2016 Feb 1 [cited 2016 Dec 18];22(2):162.e1-9. Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X15009003/fulltext>
 143. Lemos EV, de la Hoz FP, Alvis N, Einarson TR, Quevedo E, Castañeda C, et al. Impact of carbapenem resistance on clinical and economic outcomes among patients with *Acinetobacter baumannii* infection in Colombia. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(2):174–80.
 144. Ho K, Ng W, Ip M, You JHS. Active surveillance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units: Is it cost-effective in a nonendemic region? *Am J Infect Control* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2017 Oct 7];44(4):394–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655315011128>
 145. Lapointe-Shaw L, Voruganti T, Kohler P, Thein H-H, Sander B, McGeer A. Cost-effectiveness analysis of universal screening for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in hospital inpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Jun 11 [cited 2017 Oct 6];36(6):1047–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078557>
 146. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture

- identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2016 Feb 1 [cited 2017 Oct 12];84(2):159–64. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889315003946>
147. Patel TS, Kaakeh R, Nagel JL, Newton DW, Stevenson JG. Cost Analysis of Implementing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Plus Real-Time Antimicrobial Stewardship Intervention for Bloodstream Infections. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Jan [cited 2017 Oct 16];55(1):60–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27795335>