



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	13	12	2021				

Datos del Alumno

Nombre : Ricardo Antonio Jaimes Aquino

Matrícula : 2143063443 Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica

Domicilio : Oroya 568, Churubusco Tepeyac, Gustavo A. Madero, C.P. 07730, Ciudad de México

Teléfono : Celular : 5586761149

Correo Electrónico : ricardo_aquino23@hotmail.com CURP : JAAR960123HOCMQC09

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Detección de carbapenemasas presentes en bacilos gramnegativos con el uso de la tecnología MALDI-TOF/MS

Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Microbiología Clínica

Dependencia : Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Entidad Federativa : Distrito Federal

Municipio : Ciudad de México Localidad : Tlalpan

Fecha de Inicio Día Mes Año Fecha de Término Día Mes Año

3 9 2018 3 3 2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público Tipo: 1.- Externo

Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición

FIRMAS

María Elisa Drago S.
Dra. María Elisa Drago Serrano
Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Miriam Bobadilla
Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Ricardo A.
Ricardo Antonio Jaimes Aquino
Alumno
Nombre, firma

Carlos Alberto Méndez Cuesta
Dr. Carlos Alberto Méndez Cuesta
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

2019, "Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Ciudad de México, a 11 de junio de 2019.

No. Oficio. DE/ PT /217/2019

A Quien Corresponda:

Hago constar que el **C. Ricardo Antonio Jaimes Aquino**, con número de matrícula **2143063443**, de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Metropolitana Unidad Xochimilco, concluyó su servicio social de seis meses en el Laboratorio de Microbiología Clínica. (03 de septiembre de 2018 al 03 de marzo de 2019).

Se extiende la presente a petición del interesado y para los fines que estime convenientes.

Atentamente,

Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño
Jefe, Laboratorio de Microbiología Clínica



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. SALVADOR ZUBIRÁN
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

Vo. Bo.

Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza

No. de páginas: 60

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Prácticas realizadas en:

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Contiene:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fotografías | <input checked="" type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input checked="" type="checkbox"/> Gráficas | <input type="checkbox"/> Mapas |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input type="checkbox"/> Diagramas |
| <input type="checkbox"/> Trípticos | |

Vo.Bo. Asesor: _____

Fecha liberación texto completo: 00000000

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Detección de carbapenemasas presentes en bacilos gramnegativos con el uso de la tecnología MALDI-TOF/MS

Asesores

Interno: Dra. María Elisa Drago Serrano

Externo: Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

María Elisa Drago S.
Judith Miriam Bobadilla del Valle

09 de diciembre de 2021

Sistemas Biológicos
Química Farmaceutica Biologica

Detección de carbapenemasas presentes en bacilos gramnegativos con el uso de la tecnología MALDI-TOF/MS

Monica Elisa Drago S.

Interno: Dra. María Elisa Drago Serrano

Externo: Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

Judith Miriam Bobadilla

09 de Diciembre de 2021

60

Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Evaluación de productos relacionados con la salud

X

X

X

00000000



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, D.F. a 10 de diciembre de 2021

Maestra María Elena Contreras Garfias

Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la salud

PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno RICARDO ANTONIO JAIMES AQUINO con matrícula 2143063443 concluyó satisfactoriamente el Servicio Social con una duración de 480 horas, con el proyecto titulado "DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN BACILOS GRAMNEGATIVOS CON EL USO DE LA TECNOLOGÍA MALDI-TOF/MS". Este trabajo se realizó de forma presencial en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán con fecha de inicio del 3 de Septiembre de 2018 y fecha de fin del 3 de Marzo de 2019 y del cual fungí como asesora interna.

Agradeciendo su atención a la presente, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Maria Elisa Drago S. Edición del texto aquí

Dra. Maria Elisa Drago Serrano

Asesora interna

c.c.p. Dr. J Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 10 de diciembre de 2021.

Maestra María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la salud
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que el alumno RICARDO ANTONIO JAIMES AQUINO con matrícula 2143063443 concluyó satisfactoriamente el Servicio Social con una duración de 480 horas, con el proyecto titulado **“DETECCIÓN DE CARBAPENEMASAS EN BACIOS GRAMNEGATIVOS CON EL USO DE LA TECNOLOGÍA MALDI-TOF/MS”**. Este trabajo se realizó de forma presencial en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, inició del 3 de septiembre de 2018 y terminó el 3 de marzo de 2019 y del cual fungí como asesora externa.

Agradeciendo su atención a la presente, reciba un cordial saludo,

Atentamente

Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Asesora Externa

c.c.p. Dr. J. Esteban Barranco Florido. Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos





Casa abierta al tiempo



INCMNSZ

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División:

Ciencias Biológicas y de la salud

Licenciatura:

Química Farmacéutica Biológica

Informe de Servicio Social

“Detección de carbapenemasas presentes en bacilos gramnegativos con el uso de la tecnología MALDI-TOF/MS”

Proyecto genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas:

Desarrollo de reactivos analíticos y de diagnóstico

Alumno:

Ricardo Antonio Jaimes Aquino

Matrícula:

2143063443

Asesor interno:

Dra. María Elisa Drago Serrano

Asesor externo:

Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle

Lugar de realización:

Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Periodo de realización:

03/septiembre/2018 al 03/marzo/2019

RESUMEN

Introducción: Las enterobacterias son una amenaza en salud pública debido a su capacidad para generar resistencia a antibióticos de amplio espectro. La resistencia a los carbapenémicos en enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPMs), es un peligro biológico debido a que tienen la capacidad de hidrolizar betalactámicos de amplio espectro. **Justificación:** La identificación de las cepas productoras de CPMs en el laboratorio, consume mucho tiempo debido a que se hace mediante pruebas fenotípicas y el informe de resultados es en 48 a 72 h. Las pruebas moleculares son más eficientes, sin embargo, se requiere de mayor infraestructura, personal capacitado y por ello más costosas. Recientemente, la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF es utilizada con éxito para detectar actividad de las CPMs producidas por las bacterias en un tiempo corto y de costo bajo. **Objetivo:** Estandarizar el método para la detección de CPMs en enterobacterias por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS. **Material y métodos:** Se estandarizaron los espectros de ertapenem con diferentes condiciones de concentración y tiempo de incubación con cepas de referencia (productoras y no productoras de CPMs). Posteriormente, se evaluaron 48 aislados clínicos de enterobacterias portadoras de CPMs, aisladas durante el período de 2013 a 2016. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. **Resultados:** Se estandarizó la concentración, estabilidad y espectros característicos de ertapenem antes y después de la incubación con las cepas control. Mediante el método de MALDI-TOF/MS, observamos que en 40/48 (83.3%) aislados se detectó CPMs y en 8/48 (16.6 %) no se detectó. Los resultados mostraron reproducibilidad del 100%. **Conclusión:** con la estandarización del método, se logró realizar la detección de CPMs en los aislados de enterobacterias probados con reproducibilidad del 100%. El método fue capaz de identificar correctamente las enterobacterias portadoras de CPMs tipo KPC y OXA-48 similares. El tiempo para informar los resultados se redujo con este método de 48 h a 2.5 h. **Perspectivas:** El presente trabajo experimental puede ser útil para futuros ensayos en los cuales se busque evaluar otros antibióticos en enterobacterias resistentes.

Palabras clave: Enterobacterias, Carbapenemasas, Ertapenem, MALDI-TOF/MS

ABSTRACT

Introduction: Enterobacteriaceae are a public health threat due to their ability to generate resistance to broad-spectrum antibiotics. Resistance to carbapenemics in carbapenemase-producing enterobacteria (CPMs) is a biological hazard due to their ability to hydrolyze broad-spectrum beta-lactams. **Justification:** Identification of CPMs-producing strains in the laboratory is time consuming because it is done by phenotypic testing and the report of results is in 48 to 72 h. Molecular tests are more efficient, however, they require more infrastructure, trained personnel and are therefore more expensive. Recently, MALDI-TOF mass spectrometry technology is successfully used to detect activity of CPMs produced by bacteria in a short time and at low cost. **Objective:** Standardize the method for detection of CPMs in enterobacteria by MALDI-TOF/MS technology. **Material and methods:** Spectra of ertapenem were standardized with different concentration conditions and incubation time with reference strains (CPM-producing and non-CPM-producing). Subsequently, 48 clinical isolates of enterobacteria carrying CPMs, isolated during the period from 2013 to 2016, were evaluated. All assays were performed in triplicate. **Results:** The concentration, stability and characteristic spectra of ertapenem before and after incubation with control strains were standardized. Using the MALDI-TOF/MS method, we observed that in 40/48 (83.3%) isolates CPMs were detected and in 8/48 (16.6%) they were not detected. The results showed 100% reproducibility. **Conclusion:** with the standardization of the method, the detection of CPMs in the tested enterobacterial isolates was achieved with 100% reproducibility. The method was able to correctly identify enterobacteria carrying similar KPC and OXA-48 like CPMs. The time to report results was reduced with this method from 48 h to 2.5 h. Perspectives: The present experimental work may be useful for future trials in which we seek to evaluate other antibiotics in enterobacteria resistant can be assessed.

Keywords: Enterobacteriaceae, Carbapenemases, Ertapenem, MALDI-TOF / MS

Introducción

La multirresistencia antibiótica, es un problema importante para el tratamiento de las infecciones bacterianas en todo el mundo, pone en riesgo la vida de los pacientes y además conlleva a otros problemas como mayor tiempo de estancia hospitalaria, lo cual implica un incremento del gasto en la atención médica.

Las enterobacterias son una amenaza en salud pública debido a su capacidad para generar resistencia a antibióticos de amplio espectro. Hasta hace algunos años la resistencia a los carbapenémicos era poco común entre este grupo de bacterias, sin embargo, con el tiempo aparecieron enterobacterias productoras de carbapenemasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar betalactámicos de amplio espectro, por ello, las organizaciones e institutos de salud alrededor de todo el mundo se vieron obligados a evaluar y monitorear este fenómeno. La presencia de este tipo de betalactamasas entre bacilos gramnegativos, requiere la detección oportuna de las mismas en los laboratorios de microbiología, y a su vez, un control de infecciones en los pacientes portadores de ellas, por ello, es necesario que los laboratorios de diagnóstico introduzcan metodologías rápidas y sensibles para su detección, ya que la identificación errónea de la resistencia a los carbapenémicos puede conducir a un tratamiento antibiótico inadecuado y a la propagación de cepas multirresistentes.

El objetivo principal de este proyecto fue estandarizar un método para la detección de carbapenemasas en bacilos gramnegativos por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS, que determine de forma rápida y confiable a las cepas productoras en enterobacterias con sospecha de ser portadoras de este tipo de enzimas dentro de nuestro laboratorio, como ya ha sido reportado en diversos estudios previos realizados alrededor de todo el mundo. Esto se realizó mediante la utilización de la molécula de ertapenem y la obtención y estandarización de su espectro, para después revisar los cambios observados en el espectro del carbapenémico posterior a su exposición con una cepa portadora o no portadora de carbapenemasa(s). En este estudio se analizaron 48 cepas previamente caracterizadas por métodos moleculares, las cuales fueron portadoras de carbapenemasas de los grupos A (KPC y GES) y D (similares a OXA-48) de Ambler.

Finalmente, se logró concluir que la estandarización de dicho método resultó confiable para la detección de cepas portadoras de carbapenemasas con un tiempo de respuesta mucho menor que el obtenido con las pruebas convencionales, lo cual podría llegar a tener un gran impacto en las decisiones de tratamiento del paciente, sin embargo, dicho método no resultó confiable para detección de cepas portadoras de carbapenemasas de tipo GES.

Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos en bacilos gramnegativos se está incrementando en todas las partes del mundo. Están surgiendo y extendiéndose nuevos mecanismos de resistencia, los cuales amenazan la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes (WHO ,2020,Vogne et al., 2014), y a su vez, complican significativamente el desarrollo de la medicina, especialmente la cirugía, hematología y los cuidados intensivos, por ello, actualmente la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud pública mundial (Jaroslav Hrabák et al., 2011).

El mecanismo de resistencia clínicamente más importante en las bacterias gramnegativas ocurre a través de la producción de enzimas carbapenemasas, dichas enzimas hidrolizan la mayoría de los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, los cuales son a menudo la última línea de terapia efectiva disponible para el tratamiento de infecciones causadas por dichas bacterias (Bou et al., 2014).

La presencia de carbapenemasas entre bacilos gramnegativos, requiere un control de infecciones, y a su vez, la detección de bacterias portadoras de estas enzimas en los laboratorios de microbiología clínica son un paso crítico para el manejo adecuado de los pacientes, así como para la prevención y control de brotes, por ello, resulta de suma importancia detectar este tipo de microorganismos de forma expedita (Bou et al., 2014). En consecuencia, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros de Control de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos, han priorizado la necesidad urgente de que los laboratorios de diagnóstico introduzcan metodologías rápidas y sensibles para la detección de organismos productores de carbapenemasas, ya que la identificación errónea de la resistencia a los carbapenémicos puede conducir a un tratamiento antibiótico inadecuado y al desarrollo de la multiresistencia (Yang et al., 1990, J. Hrabák et al., 2014).

Justificación

La multirresistencia antibiótica, es un problema importante para el tratamiento de las infecciones bacterianas en todo el mundo, pone en riesgo la vida de los pacientes y además conlleva a otros problemas como mayor tiempo de estancia hospitalaria, lo cual implica un incremento del gasto en la atención médica (García Apac, 2018). Ante tal problemática la OMS en 2017 publicó una lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen a las bacterias gramnegativas productoras de carbapenemasas como prioridad crítica. La identificación de las cepas productoras de carbapenemasas en el laboratorio consume mucho tiempo, debido a que se hace mediante pruebas fenotípicas y es posible en la mayoría de los casos, el informe de resultados en 48 a 72 h. Las pruebas moleculares son más eficientes en cuanto a tiempo, sin embargo, se requiere de mayor infraestructura, personal capacitado y por ello son más costosas. Recientemente, la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF se ha utilizado con éxito para detectar la actividad de las carbapenemasas en bacterias en un tiempo corto y con costo limitado por prueba, por ello la implementación de este método dentro de los laboratorios de diagnóstico clínico permitirá informar al clínico de forma expedita el resultado, así como establecer medidas de prevención y control de brotes ocasionados por este tipo de microorganismos (WHO, 2015).

Objetivos

Objetivo General:

Estandarizar el método para la detección de carbapenemasas en enterobacterias por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS.

Objetivos Específicos:

- 1.- Probar el carbapenémico ertapenem como molécula de estudio para la detección de carbapenemasas en enterobacterias por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS.
- 2.- Caracterizar los picos de ertapenem puro en el espectro emitido por MALDI-TOF/MS.
- 3.- Caracterizar los picos producidos por la degradación de ertapenem, debido a la actividad de carbapenemasas en el espectro emitido por MALDI-TOF/MS.
- 4.- Determinar el tiempo de incubación como una condición del método para observar la actividad hidrolítica completa del ertapenem.
- 5.- Establecer la asociación matemática entre los picos producidos por el ertapenem puro y los picos de antibiótico hidrolizado para determinar la actividad de las carbapenemasas en los espectros obtenidos.
- 6.- Determinar la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad del método estandarizado.

Marco Teórico

Resistencia antimicrobiana en bacilos gramnegativos

Recientemente, la OMS, la Unión Europea, el Gobierno de los E.U.A. y CDC, identificaron la propagación de resistencia a los antimicrobianos (RAM) como una de las amenazas más importantes para la salud humana (Seale AC *et al*, 2017), por ello, la OMS en 2017 publicó una lista de «patógenos prioritarios» en la cual se destacó a los bacilos gramnegativos (BGN) resistentes a betalactámicos (BLs) de amplio espectro como una amenaza de importancia crítica (WHO, 2017).

Los antibióticos, específicamente betalactámicos (BLs), son esenciales para las prácticas médicas en la actualidad, ya que casi dos tercios de las prescripciones hospitalarias recientes incluyen a estos agentes (Bush & Bradford, 2016). Los BLs más comunes pertenecen a cuatro clases químicas principales: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (**Fig. 1**).

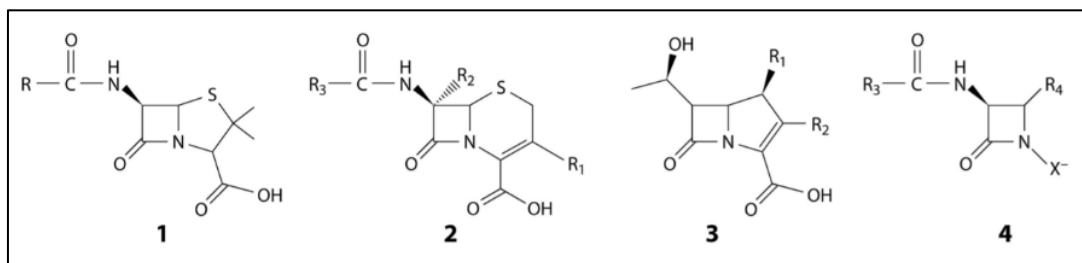


Fig. 1. Estructura genérica de los BLs más importantes en medicina clínica. Las estructuras incluyen: penicilinas (1), cefalosporinas (2), carbapenémicos (3) y monobactámicos (4).

Estos antimicrobianos son muy importantes puesto que en los últimos años la prevalencia de BGN resistentes a BLs se ha incrementado en todo el mundo, además, se han asociado con alta morbilidad y mortalidad (Bush & Bradford, 2016), ya que generalmente están implicados en infecciones graves, en donde las opciones de antibioticoterapia son limitadas y la administración adecuada de estas ocurre de forma tardía. Por otro lado, debido a que frecuentemente en este tipo de bacterias coexisten determinantes adicionales de resistencia contra otros antibióticos que terminan produciendo perfiles de multiresistencia (MDR), resistencia extendida (XDR) o panresistencia (PDR), las infecciones que estos organismos ocasionan son más difíciles de tratar que las ocasionadas por organismos susceptibles (Jiménez Pearson *et al.*, 2019).

Históricamente los BGN han afectado a pacientes en entornos hospitalarios, donde la exposición a antibióticos, el tiempo de hospitalización, el uso de dispositivos médicos y los factores del huésped son factores de riesgo de infección y se ha observado que el principal mecanismo de transmisión es a través de las manos del personal sanitario (WHO, 2020).

En los países en vías de desarrollo se acumulan factores agravantes puesto que una vez que aparecen las bacterias resistentes, estas se multiplican y se diseminan en la comunidad y al faltar tratamientos apropiados se vuelven endémicas. Aunque afecta también a los países desarrollados, las manifestaciones son más variables según los hábitos de prescripción, utilización de antibióticos y prácticas de higiene (Siegel, Jane D. et al., 2007).

Adquisición y propagación de resistencia en BGN

Los antibióticos ejercen presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, lo que genera esencialmente el resultado de la selección natural. Las variantes genéticas en las poblaciones bacterianas pueden aportar mutaciones que resultan ventajosas para su supervivencia en presencia de agentes antimicrobianos.

La resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca o innata, la primera por las características estructurales o funcionales inherentes de cada especie y la segunda por la adquisición de mecanismos de resistencia, por mutaciones en genes blanco o por la adquisición de plásmidos o transposones con casetes de resistencia a los antibióticos. A diferencia de la resistencia intrínseca, los rasgos asociados con la resistencia adquirida se encuentran solo en algunas cepas o subpoblaciones de cada especie bacteriana en particular.

Las mutaciones en el ADN bacteriano pueden hacer que los antibióticos sean ineficaces, transmitiendo una ventaja de supervivencia en la cepa bacteriana mutada. Las mutaciones en los genes cromosómicos pueden inducir un aumento en la expresión de mecanismos de resistencia intrínsecos como enzimas que inactivan los antibióticos o bombas de eflujo. Los rasgos de dicha resistencia se transmiten verticalmente a las células hijas, creando posteriormente una población resistente que puede propagarse y ser fuente adicional de genes de resistencia para otras cepas (Ruppé et al., 2015). Simultáneamente, los genes de resistencia pueden adquirirse por medio de mecanismos de transferencia horizontal como son: conjugación, transformación y/o transducción, y en algunos casos, incorporarse adicionalmente en el cromosoma receptor por recombinación (Blázquez, 2003). Los vectores que portan uno o más genes de resistencia pueden ser plásmidos, transposones o integrones. La resistencia bacteriana mediada por estos mecanismos representa los de mayor importancia, debido a la velocidad y eficiencia con la que estos elementos móviles pueden propagarse entre distintos tipos de bacterias.

Enterobacterias resistentes a carbapenémicos

Las enterobacterias son el grupo más grande y heterogéneo de BGN, tienen amplia distribución: agua, suelo, plantas y la microbiota intestinal de muchos animales incluyendo el hombre. Se pueden propagar fácilmente entre los humanos (transporte manual, alimentos y agua contaminada) siendo una fuente común de infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en el medio hospitalario.

Las enterobacterias son una amenaza en salud pública por su capacidad para generar resistencia a BLs de amplio espectro, como las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y también por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Patrice Nordmann et al., 2011). Los carbapenémicos por presentar mayor potencia son antimicrobianos empleados como último recurso ante la ineficacia de la primera línea para tratar infecciones nosocomiales relacionadas con organismos MDR (Suay-García & Pérez-Gracia, 2019).

Hasta hace algunos años la resistencia a los carbapenémicos era poco común entre las enterobacterias, sin embargo, este nuevo tratamiento para bacterias MDR tuvo un resultado inesperado, la aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE por sus siglas en inglés) (P. Nordmann, 2014).

Factores de riesgo asociados a la adquisición de resistencia a carbapenémicos

Los principales factores de riesgo para la adquisición de CRE, incluyen el uso previo de antibióticos, atención médica previa y exposición a cuidados de largo plazo (pacientes que han sido hospitalizados en zonas con alta endemicidad de CRE en los últimos 6 meses), afecciones crónicas comórbidas y la presencia de catéteres y drenajes invasivos. (Dhar et al., 2016; Hussein et al., 2009; Safdar & Maki, 2002). En entornos sanitarios, los CRE se transmiten de persona a persona, a menudo a través de las manos del personal sanitario o mediante equipos médicos contaminados. Además, los desagües y los inodoros se reconocen cada vez más como un reservorio ambiental y una fuente de transmisión (CDC, 2019).

Para los pacientes colonizados del tracto digestivo, la infección depende de factores como la cantidad de inóculo ingerido, las características específicas de la bacteria, así como las características propias de cada paciente (niveles de acidez gástrica y composición de microbiota intestinal) (McConville et al., 2017). Además, la ingesta de antibióticos puede aumentar la cantidad de bacterias CRE en el microbioma, con la posibilidad que estas migren desde el tracto digestivo a otros sitios, y la probabilidad de desarrollar alguna infección o facilitar su propagación en otros pacientes. La proporción de portadores donde esto ocurre está determinada por factores que incluyen su estado inmunitario, la presencia de dispositivos invasivos o la exposición a procedimientos invasivos (Borer et al., 2012; Schechner et al., 2013).

Prevención y control de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos

Uno de los desafíos clave para controlar la propagación de CRE es el hecho de que los pacientes infectados con estas bacterias sean identificados por cultivos clínicos (vigilancia pasiva). Cuando se identifica un paciente hospitalizado con CRE, se ha establecido que la medida de control inmediata es la implementación de

precauciones de contacto para el paciente, las cuales consisten en el uso de guantes y batas. Si se piensa que un aislado CRE fue adquirida dentro de las instalaciones, los protocolos generalmente recomiendan estrategias de "búsqueda y contención" mediante el uso de vigilancia activa entre pacientes que están epidemiológicamente vinculados al caso-paciente. Los cultivos de vigilancia activa para CRE se pueden hacer mediante el uso de hisopos rectales para identificar pacientes colonizados con estos organismos, determinar si existe transmisión continua de paciente a paciente con estas bacterias en la instalación (Arjun Srinivasan, 2010).

La reducción de la propagación de CRE se basa en medidas observadas en múltiples estudios que incluyen el uso de cohortes de pacientes y personal médico exclusivo; aislamiento; baño diario del paciente con clorhexidina; educación y capacitación del personal; uso limitado de dispositivos invasivos; acortar la duración de la ventilación mecánica; mejora en las tasas de higiene de manos e implementación de planes de manejo de antimicrobianos; mejoramiento de la limpieza ambiental y el cumplimiento de las prácticas de higiene del lavabo e inodoro (Falagas et al., 2007; Temkin et al., 2014).

Mecanismos moleculares de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias

La resistencia a los carbapenémicos en enterobacterias generalmente implica tres mecanismos diferentes: (I) Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mediadas por la disminución de la expresión y la posterior pérdida de proteínas de la membrana externa; (II) Desregulación de bombas de eflujo de membrana que son capaces de eliminar antibióticos del espacio periplásmico al ambiente externo; (III) Producción de enzimas, como las CRE, que se unen e inactivan diferentes BLs, mediante hidrólisis dando como resultado compuestos inactivos (Haidar et al., 2017).

La producción de BLEE, sigue siendo un factor importante que contribuye a la resistencia a carbapenémicos, este grupo de enzimas difieren entre sí por su acción ante el sustrato (diferentes tipos de BLs), perfiles de inhibidores (tipos de compuestos que las inactivan) y la homología de su secuencia (composición de aminoácidos de estas enzimas). Para observar las diferencias de estas características se han creado dos sistemas, la clasificación de Ambler (clases A, B, C y D, que está basada en la homología de secuencia de aminoácidos), y la de los grupos de Bush-Jacoby-Medeiros (grupos 1, 2, 3 y 4, según los perfiles de sustrato e inhibidor).

Clasificación de las carbapenemasas en enterobacterias

En general, las CRE se dividen en dos subgrupos principales: CRE productoras de carbapenemasas (CPE, por sus siglas en inglés) y CRE no productoras de carbapenemasas (no CPE).

Existen cuatro clases de betalactamasas definidas por el sistema de clasificación de Ambler, las carbapenemasas (CPMs) que confieren resistencia a carbapenémicos en enterobacterias: clase A, clase B y clase D. Las CPMs de clase A y D tienen un mecanismo hidrolítico basado en serina, mientras que las enzimas de clase B son metalo- β -lactamasas (MBLs) que contienen Zinc en el sitio activo (Bush, 2018).

Carbapenemasas clase molecular A

La clase A se caracteriza por tener una serina en su grupo activo. Estas BIs se han detectado en aislados individuales o en pequeños brotes de *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella* spp. (P. Nordmann et al., 1993). Estas bacterias se caracterizan por presentar susceptibilidad reducida al imipenem. En algunas ocasiones, ciertas BIs de esta clase, pueden pasar desapercibidas en los resultados de susceptibilidad (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

Enzimas codificadas cromosómicamente: SME, NMC e IMI

Las serino-CPMs tipo SME ("*Serratia marcescens* enzyme") son producidas por *S. marcescens* en el gen *bla_{SME}*, el cual es relativamente raro (Bush et al., 2013). Una característica de identificación de los aislados que expresan SME es que son resistentes a los carbapenémicos pero susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido como la ceftazidima (Yang et al., 1990). Hasta la fecha, se han informado cuatro variantes de la enzima SME-1 (T. Naas et al., 1994).

Otras serino-CPMs cromosómicas, incluyen las de las familias IMI ("imipenem-hydrolyzing β -lactamase) y NMC (no metalloenzyme carbapenemase), identificadas hasta la fecha solo en aislados del complejo *E. cloacae*. Los aislados de *E. cloacae* resistentes a imipenem de dos pacientes de California en 1984, fueron las fuentes originales de la enzima cromosómica IMI-1 (Rasmussen et al., 1996). Al igual que las SME, la β -lactamasa IMI confiere resistencia a los carbapenémicos, pero no a las cefalosporinas de espectro extendido (Rasmussen et al., 1996). La serino-CPM NMC-A se identificó por primera vez en un aislado de *E. cloacae* en Francia en 1990 (Tarumoto et al., 2018) y comparte una identidad de secuencia del 97% con IMI-1.

Enzimas codificadas por plásmidos: KPC y GES

A fines de la década de los 90s, la familia de β -lactamasas KPC ("*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase") comenzó a surgir en la costa este de los Estados Unidos, en un aislado clínico de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte, hasta el momento se ha convertido en la CPM más común detectada a nivel mundial (Woodford et al., 2004; H. Yigit et al., 2001; Hesna Yigit et al., 2003).

Dos características separan a estas CPMs de las enzimas de clase A. Primero, las enzimas KPC se encuentran en plásmidos transferibles; segundo, su espectro de hidrólisis de sustrato incluye cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos

dando a la familia KPC un amplio espectro de hidrólisis que incluye la mayoría de los antibióticos BLs.

Las enzimas KPC presentan al menos 40 variantes que difieren en la mayoría de los casos en menos de cinco aminoácidos de las enzimas originales KPC-2 y KPC-3, y se encuentran entre otros géneros diferentes de enterobacterias y *P. aeruginosa* (Hu et al., 2015; Kazmierczak, Biedenbach, et al., 2016).

KPC tiene el mayor potencial de propagación debido a su ubicación en plásmidos, especialmente porque se encuentra con mayor frecuencia en *K. pneumoniae*, un organismo conocido por su capacidad para acumular y transferir determinantes de resistencia. Además, la propagación clonal observada en varios brotes apunta a dificultades con el control de infecciones para este organismo (Bratu et al., 2005).

Los aislamientos que producen enzimas de tipo KPC no solo son resistentes a la mayoría de los BLs, sino que a menudo son resistentes a múltiples fármacos, ya que presentan elementos móviles que codifican para varios determinantes de resistencia, lo que los hace prácticamente panresistentes a las opciones terapéuticas de primera línea disponibles actualmente (Munoz-Price et al., 2013; Walther-Rasmussen & Høiby, 2007). Las KPC no son inhibidas por el clavulanato o tazobactam; sin embargo, los nuevos inhibidores de β -lactamasas los inhiben bien, como avibactam, relebactam y vaborbactam (Drawz et al., 2014; Tooke et al., 2019). Sin embargo, las cepas que albergan mutantes de *bla*_{KPC} pueden volverse resistentes a ceftazidima/avibactam con mayor actividad catalítica para la ceftazidima.

La familia de β -lactamasas GES/IBC es una familia poco frecuente que se describió por primera vez en el año 2000 con informes de IBC-1 (“integron-borne cephalosporinase”) de un aislado de *E. cloacae* en Grecia (Giakkoupi et al., 2000) y GES-1 (para “Guiana extended spectrum”) en un aislado de *K. pneumoniae* de la Guayana Francesa (Laurent Poirel, Le Thomas, et al., 2000).

Los genes que codifican la familia de enzimas GES se ubican en integrones transportados en plásmidos. Debido a que las enzimas tienen un amplio espectro de hidrólisis que incluye penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido, inicialmente se clasificaron como BLEE (Giakkoupi et al., 2000). Su espectro de hidrólisis se expandió en 2001 para incluir imipenem, con el informe de GES-2 en un aislado clínico de *P. aeruginosa* (L. Poirel et al., 2001).

La nomenclatura de la familia GES/IBC ha sufrido varias revisiones (Wachino, 2005). Se ha alcanzado una nomenclatura de consenso mediante la cual los nombres de IBC se han convertido en nomenclatura GES. Se han descrito al menos nueve variantes de GES, con GES-9 recientemente identificado en un aislado de *P. aeruginosa* de Francia (L. Poirel et al., 2001). De estas enzimas estrechamente relacionadas, GES-2, GES-4, GES-5 y GES-6 tienen sustituciones de asparagina o serina en la posición 170, asociadas con la hidrólisis de imipenem.

Carbapenemasas clase molecular B

Esta clase de β -lactamasas se caracterizan por su capacidad para hidrolizar carbapenémicos y por su resistencia a los inhibidores de β -lactamasas disponibles en el mercado, aunque resultan ser susceptibles a la inhibición por agentes quelantes de iones metálicos. El espectro del sustrato es bastante amplio; Además de los carbapenémicos, la mayoría de estas enzimas hidrolizan cefalosporinas y penicilinas, pero carecen de la capacidad de hidrolizar el aztreonam. El mecanismo de hidrólisis depende de la interacción de los BLs con iones de Zinc en el sitio activo de la enzima, lo que resulta un rasgo distintivo de su inhibición por EDTA, un quelante de Zn^{2+} y otros cationes divalentes.

Enzimas codificadas cromosómicamente

Las primeras MBLs detectadas y estudiadas fueron enzimas cromosómicas presentes en bacterias ambientales y patógenas oportunistas como *Bacillus cereus* (Kuwabara & Abraham, 1967), *Aeromonas* spp., (Laconis & Sanders, 1990) y *Stenotrophomonas maltophilia*. Estas enzimas cromosómicas generalmente se encuentran en bacterias que también expresan al menos una serina- β -lactamasa, con ambas β -lactamasas inducibles después de la exposición a BLs. Afortunadamente, con la excepción de *S. maltophilia*, estas bacterias no se han asociado con frecuencia en infecciones nosocomiales graves, ya que generalmente son patógenos oportunistas, y los genes de las MBLs cromosómicas no se transfieren fácilmente.

Desde la identificación inicial de MBLs, la secuenciación ha demostrado una gran variabilidad en las secuencias primarias y en las estructuras moleculares. Las primeras MBLs para las cuales se determinó una secuencia de aminoácidos fue la metalo- β -lactamasa BCII de *Bacillus cereus* y la metalo- β -lactamasa prototípica. La caracterización molecular, incluidos los estudios bioquímicos y de cristalización, también se ha completado con la MBL cromosómica CcrA (CfiA) que aparece en un pequeño porcentaje de cepas de *Bacteroides fragilis* (Yang et al., 1992).

Enzimas codificadas por plásmidos: IMP, VIM, GIM, SIM y NDM

A diferencia de las MBL cromosómicas, cuya presencia se correlaciona directamente con la prevalencia de las especies productoras, ha habido un aumento dramático en la detección y propagación de las familias de MBLs adquiridas o transferibles. Las familias más comunes incluyen las enzimas VIM, IMP, GIM, SIM y NDM, que se encuentran dentro de una variedad de estructuras de integrones, donde se han incorporado como casetes de genes. Cuando estos integrones se asocian con plásmidos o transposones, la transferencia entre bacterias se realiza fácilmente.

Se identificaron por primera vez las dos nuevas MBLs VIM (“Verona integron-encoded metallo- β -lactamase”) en Italia y Francia en 1997 y 1996 respectivamente,

ambas de aislados clínicos de *P. aeruginosa* que contenían casetes de genes *bla_{VIM}* insertados en un integrón de clase 1 (Lauretti et al., 1999; Matsumura et al., 2017; Laurent Poirel, Naas, et al., 2000). Hoy en día, las MBL tipo VIM se encuentran principalmente en *K. pneumoniae* y el complejo *E. cloacae* (Kazmierczak, Rabine, et al., 2016; Matsumura et al., 2017). Aunque se identifican con más frecuencia que las MBLs tipo IMP, representan una minoría de todas las CPMs en patógenos resistentes a los carbapenémicos. Bioquímicamente, VIM-2 tiene un amplio perfil de hidrólisis de sustrato, que incluye penicilinas, carbapenémicos y la mayoría de las cefalosporinas, pero no el aztreonam (Laurent Poirel, Naas, et al., 2000).

GIM-1 (“German imipenemase”) se aisló en Alemania en 2002 (Castanheira et al., 2004). GIM tiene aproximadamente un 30% de homología con VIM y un 43% de homología con IMP. GIM-1 tiene características similares a otras MBLs adquiridas que se han encontrado en cinco aislados clonales de *P. aeruginosa* dentro de un integrón de clase 1 en un plásmido.

Otra familia de MBLs adquiridas proviene de Corea. La enzima SIM-1 (“Seoul imipenemase”) tiene la identidad de aminoácidos más cercana a la familia IMP (64 a 69%). SIM-1 fue descubierta en un estudio en donde probaron 1234 aislados de *Pseudomonas* spp., y *Acinetobacter* spp., resistentes a imipenem, de los cuales 211 (17%) fueron positivos para MBLs. En este estudio, se identificaron principalmente alelos VIM (74%) e IMP (22%); sin embargo, siete supuestos aislamientos de *A. baumannii* productores de metalo-β-lactamasa fueron negativos mediante pruebas de PCR.

La MBL NDM (“New Delhi metallo-β-lactamase”) se describió por primera vez en 2009 en un aislado de *K. pneumoniae* de un paciente en Suecia que había estado previamente en dos hospitales diferentes de la India (Yong et al., 2009). NDM-1 comparte muy poca homología con la secuencia nucleotídica de otras MBLs comúnmente encontradas en enterobacterias. Esta enzima inactiva todos los BLs excepto aztreonam, aunque la mayor parte de las cepas que albergan el gen *bla_{NDM-1}* producen conjuntamente otras BLEE, convirtiendo a estos patógenos resistentes a todos los BLs (Gil-Romero et al., 2013). Aunque la rápida diseminación de las enterobacterias productoras de NDM se asemeja a la de las enterobacterias productoras de KPC, la propagación de las MBL de tipo NDM no parece estar asociada con cepas clonales dominantes y está mediada por varios tipos diferentes de plásmidos. Se cree que la rápida y dramática propagación de las MBLs de NDM se ve facilitada por la recombinación de los elementos genéticos en las bacterias.

Carbapenemasas clase molecular D

Las β-lactamasas tipo OXA (“oxacillin-hydrolyzing”), se reconocieron por primera vez en las décadas de 1960 y 1970, y representaban una de las familias de betalactamasas codificadas por plásmidos más prevalentes en todo el mundo (Pitout et al., 2020). Cuando las enzimas tipo OXA de la clase D se colocaron en una clase molecular separada de las otras serino-β-lactamasas, se identificaron

principalmente en enterobacterias y *P. aeruginosa* y funcionalmente se caracterizaron como penicilinasas capaces de hidrolizar oxacilina y cloxacilina (Evans & Amyes, 2014). Actualmente, se han reportado más de 750 tipos de β -lactamasas tipo OXA, pero solo una pequeña fracción tiene un papel funcional como CPM. Entre estas se encuentran OXA-23, OXA-40 y OXA-48; esta última es cada vez más frecuente, con sus variantes relacionadas OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162 y OXA-244, en ese orden, son las enzimas más comunes identificadas dentro de este grupo de CPMs similares a OXA-48. OXA-436, OXA-245, OXA-484 y OXA-519 son grupos con menos frecuencia reportados (Pitout et al., 2020).

Las CPMs tipo OXA generalmente tienen actividad hidrolítica contra las penicilinas y los carbapenémicos de amplio espectro, en contraste con otras β -lactamasas adquiridas por plásmidos, las cefalosporinas de espectro extendido no son hidrolizadas por estas CPMs o se hidrolizan muy pobremente (Evans & Amyes, 2014); son poco inhibidas por los inhibidores de β -lactamasa, con excepción de avibactam (T. D. Huang et al., 2014). Las variantes del grupo OXA-48 que fueron descritas por primera vez en 2001 entre aislados clínicos de *K. pneumoniae* en Turquía, donde tienen mayor relevancia médica debido a que hidrolizan un espectro más estrecho de BLs, con hidrólisis clínicamente relevante de penicilinas e imipenem y menor hidrólisis en meropenem (Tsakris et al., 2015).

La resistencia de alto nivel a los carbapenémicos generalmente se debe a un mecanismo secundario de resistencia no enzimática en estos aislamientos (Tsakris et al., 2015). Los bajos niveles de resistencia a carbapenémicos proporcionados por esta enzima pueden dificultar la detección de cepas que albergan este mecanismo de resistencia.

Detección de Carbapenemasas en enterobacterias

La selección adecuada de aislamientos sospechosos con susceptibilidad reducida a carbapenémicos es crucial para la identificación de CPMs. El laboratorio de microbiología clínica debe introducir métodos para su detección, el cual se basa en un flujo de dos pasos, el primero consiste en un proceso de tamizaje que utiliza a los agentes o marcadores de detección más apropiados para la visualización de aislados sospechosos, seguido de la realización de una prueba confirmatoria que puede ser de carácter fenotípico o genotípico con lo cual se puede constatar la presencia de estas enzimas.

La selección de una prueba de detección de CPMs depende de varios factores, incluida la prevalencia local de estas, la epidemiología molecular regional, las características de rendimiento del diagnóstico, la intensidad laboral, el costo y el tiempo de respuesta de la prueba (Tamma, Opene, et al., 2017). El tiempo de respuesta es importante tanto para la toma de decisiones terapéuticas como para el control de infecciones, con resultados ideales cuando estos son obtenidos el

mismo día. Otras consideraciones incluyen los organismos a analizar (es decir, enterobacterias y/o gramnegativos que no fermentan la glucosa), facilidad de uso, flujo de trabajo, estado regulatorio, equipo necesario y requisitos de preparación de reactivos. Desafortunadamente, ningún ensayo disponible actualmente tiene un perfil favorable para todos los criterios enumerados anteriormente. Sin embargo, hay varias opciones disponibles que permiten a los laboratorios elegir el método que mejor se adapte a sus necesidades.

Pruebas de tamizaje para la detección de CPE

En la actualidad, casi todos los pacientes infectados o colonizados con CPE se identifican mediante pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislados recuperados en cultivo. Dichas pruebas están asociadas con tiempo de 2 a 5 días entre la recolección de la muestra y la disponibilidad de resultados. El tamizaje de rutina para la colonización por CPE no se realiza comúnmente. Además, pocos laboratorios clínicos realizan pruebas complementarias de forma rutinaria para diferenciar los aislados de CPE de los aislados que no son CPE, ya que esto no es requerido por The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) o The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para la atención de rutina del paciente (Pitout et al., 2020).

Pruebas de susceptibilidad a carbapenémicos en enterobacterias

Dentro de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos los métodos de microdilución en caldo y difusión en disco son los estándares para la detección de aislados resistentes a carbapenémicos (Bou et al., 2014). La primera causa de sospecha de una bacteria resistente a carbapenémicos es el hallazgo en la disminución del halo de inhibición (prueba de Kirby-Bauer) o la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) elevada de un carbapenémico probado. La MIC, puede ser determinada por sistemas expertos en microdilución automatizada o por el método de microdilución en caldo. La MIC de los carbapenémicos en bacterias productoras de CPMs son muy variables. Ertapenem tiene excelente sensibilidad, pero poca especificidad, especialmente en géneros como *Enterobacter spp.*, debido a su relativa inestabilidad con BLEE y betalactamasas tipo *AmpC* en combinación con la pérdida de porinas. Imipenem no debe probarse para *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, y *Morganella spp.*, debido a que estas bacterias presentan perfiles de resistencia intrínseca hacia este antibiótico. Meropenem es más sensible y específico en términos de detección de CPE (EUCAST, 2017, CLSI, 2021). Sin embargo, hay bacterias productoras de CPMs que a menudo muestran aumentos ligeros en la MIC de carbapenémicos, como es el caso de OXA-48, lo que permite considerar a las bacterias no susceptibles a este tipo de BLs sea más problemática. Por ello, la disminución en los puntos de corte de los carbapenémicos hizo que la sensibilidad para la detección de las CPE sea mayor, pero disminuyó la especificidad, debido a que esto podía ocasionar confusión con la presencia de otros mecanismos moleculares de resistencia a

carbapenémicos (por ejemplo, la producción de enzimas tipo BLEE o *AmpC* combinada con la disminución de permeabilidad, mecanismo que también es responsable de la resistencia a los carbapenémicos). Por lo tanto, se han desarrollado otros criterios de detección con otros agentes antimicrobianos que a su vez logran presentar mayor sensibilidad para la detección de CPMs específicas. CLSI revisó en 2010 los puntos de corte de los carbapenémicos. Para fines de control epidemiológico o de infección, los aislados que no son susceptibles a uno o más carbapenémicos deben analizarse para detectar la presencia de CPMs y cada año se revisa este documento para observar si hay cambios en los puntos de corte. EUCAST utiliza diferentes puntos de corte de carbapenémicos para la detección de CPMs en aislados clínicos. Sin embargo, algunas bacterias productoras de estas enzimas pueden mostrar MIC menor para carbapenémicos que los puntos de corte clínicos propuestos por estos institutos. Los métodos de difusión de gradiente (p. Ej., E-test) no se consideran apropiados para su detección, debido al crecimiento heterogéneo que presentan las cepas probadas, lo cual dificulta la interpretación de la MIC (Tenover et al., 2006).

Medios de cultivo específicos para el aislamiento de CPE en muestras directas

Las muestras recomendadas para la detección de pacientes portadores de CPE son hisopos fecales o rectales, ya que los portadores gastrointestinales representan la fuente potencial más importante de transmisión cruzada en el entorno sanitario. Todos los pacientes en riesgo (por ejemplo, pacientes repatriados de un país extranjero o de un entorno de atención médica con una alta prevalencia de CPE, pacientes en terapia intensiva, pacientes con trasplante y pacientes inmunocomprometidos) deben ser examinados. Los pacientes deben mantenerse en aislamiento estricto hasta que se informe el resultado negativo (al menos 24-48 h) (J. Hrabák et al., 2014).

Se han diseñado distintos medios para la detección de organismos portadores de CPMs, estos han sido desarrollados con sensibilidad y especificidad variables pero lo suficientemente altas para obtener una respuesta confiable a la pregunta de si un paciente está o no colonizado por CPE lo antes posible. Un medio recientemente utilizado es el agar cromogénico que tiene la capacidad de detectar bacterias resistentes a carbapenémicos mediante el cambio de color de las colonias.

CHROMagar™ lanzó en 2007 el primer medio cromogénico para la detección de bacterias resistentes a carbapenémicos, enfocado particularmente en las enzimas-KPC en cultivos de muestras directas. Debido a que muchas otras carbapenemasas se fueron extendiendo por todo el mundo surgió la necesidad de abordar la difícil detección de estas, se han probado varios medios comerciales como: Brilliance CRE, Colorex KPC, CHROMID® CARBA en cepas productoras de carbapenemasas bien caracterizadas molecularmente y en muestras clínicas con baja actividad enzimática (Wilkinson et al., 2012).

Pruebas confirmatorias para la detección de CPE

Pruebas Fenotípicas

Los métodos fenotípicos para la detección de CPMs son generalmente fáciles de realizar, interpretar e introducir en el flujo de trabajo de un laboratorio clínico y a su vez, pueden identificar a la mayoría de estas, con excepción de algunas enzimas similares a OXA-48.

Los ensayos fenotípicos basados en la detección de productores de CPMs se realizan a partir de cultivos. Los ensayos utilizados actualmente en la práctica clínica consisten en los siguientes:

- (i) Ensayos basados en el crecimiento que miden la resistencia en presencia de un antibiótico y métodos de inactivación del carbapenémico.
- (ii) Ensayos de hidrólisis que detectan el producto de degradación catalizado por CPMs (p. ej., método de espectrometría de masas por desorción-ionización por láser acoplado a un tiempo de vuelo [MALDI-TOF MS]). Estas pruebas identifican la producción de CPMs, pero en sus formas tradicionales carecen de orientación sobre el tipo de específico que produce la bacteria.
- (iii) Inmunoensayos de flujo lateral que detectan CPMs mediante el uso de anticuerpos específicos.

Método modificado de inactivación de carbapenémico

El método de inactivación de los carbapenémicos (CIM, por su siglas en inglés) se describió en 2015, esta prueba se basa en que los microorganismos productores de carbapenemasas degradan el meropenem impregnado en un disco, producen su hidrólisis e inactivación, y al sacar ese disco y enfrentarlo con una cepa pansusceptible (*Escherichia coli* ATCC 25922) no ocurre la inhibición. En caso de que la carbapenemasa no esté presente el meropenem no será hidrolizado y podrá inhibir el crecimiento de la cepa de *E. coli* (Van Der Zwaluw et al., 2015). El CLSI publicó una modificación al CIM (mCIM), en esta prueba se utilizó caldo soya tripticaseína en lugar de agua y un tiempo de incubación de 4 h. La sensibilidad general aumentó del 82% al 93%. En un estudio multicéntrico en donde validaron la prueba, se confirmó sensibilidad del 97%, especificidad del 99% y alta reproducibilidad (Pierce et al., 2017). La interpretación de los resultados de mCIM son menos subjetivos que los emitidos por pruebas colorimétricas como Carba NP. El mCIM se agregó al documento CLSI M100 en la edición 2018 (CLSI, 2021) como un método adecuado para la de detección de carbapenemasas, sin embargo, esta prueba lleva mucho tiempo, ya que los mejores resultados se obtienen cuando las placas de agar se incuban durante 12 a 18 h (Van Der Zwaluw et al., 2015).

Pruebas de sinergia basadas en inhibidores

Las pruebas de sinergia basadas en inhibidores se basan en la capacidad de ciertos sustratos para inhibir la acción de las CPMs (Doi & Paterson, 2015). Este proceso implica la prueba de un carbapenémico con y sin la adición de distintos inhibidores con la capacidad de inhibir diferentes tipos de CPMs. Los métodos basados en inhibidores a menudo usan los principios de la prueba de susceptibilidad por disco (por ejemplo, la prueba de sinergia de doble disco [DDST] y la prueba de disco combinada [CDT]). La interpretación es subjetiva con el DDST, pero está estandarizada con el CDT (por ejemplo, la diferencia de diámetro de zona por mm es indicativa de una prueba positiva). La principal desventaja con estos métodos es el tiempo largo de respuesta, entre 18 y 24 h. Los inhibidores más utilizados incluyen derivados de ácido borónico para la inhibición de KPC y quelantes de metales como EDTA y ácido dipicolínico para la inhibición de MBLs (Doi & Paterson, 2015). A menudo se usan en combinación con inhibidores de AmpC, como la cloxacilina, para distinguir las CPMs de los aislados con mutaciones de porina que producen altos niveles de enzimas AmpC.

Las tiras de difusión de gradiente también pueden ser opciones confiables y fáciles de usar para identificar mecanismos de resistencia específicos y son enfoques basados en el crecimiento para la detección de carbapenemasas. Dependen de la combinación de un BL y un inhibidor de betalactamasa para detectar distintos tipos de carbapenemasas. Las tiras MIC de gradiente KPC tienen sensibilidad informada del 92% y especificidad del 100% (Girlich et al., 2013). Las tiras MIC de gradiente MBL tienen sensibilidad informada del 94% y especificidad del 95% (Walsh et al., 2002).

Los compuestos químicos con propiedades de inhibición específicas para enzimas similares a OXA-48 aún no están disponibles para uso clínico. Las enzimas similares a OXA-48 confieren resistencia de alto nivel a la temocilina (Hartl et al., 2013), sin embargo, la resistencia a temocilina no es específica para las carbapenemasas de tipo OXA-48, ya que otros mecanismos de resistencia, incluidas ciertas carbapenemasas no similares a OXA-48, BLEE y AmpC combinados con pérdida de porina, también pueden causar resistencia a la temocilina (Hartl et al., 2013; Van Dijk et al., 2014). Cuando se combina con resultados negativos obtenidos con pruebas basadas en inhibidores para carbapenemasas, la resistencia a temocilina tiene la capacidad de predecir la presencia de enzimas similares a OXA-48 (Hartl et al., 2013).

Prueba Carba NP

El método Carba NP fue informada inicialmente por investigadores franceses en 2012 (L. Dortet et al., 2014). La prueba Carba NP detecta CPMs midiendo la hidrólisis *in vitro* de imipenem en extractos bacterianos al producirse cambios de color en aproximadamente 2 h. La hidrólisis de imipenem da como resultado un derivado carboxílico, que a su vez disminuye el pH, produciendo un cambio de color del indicador rojo de fenol presente en el medio, de

rojo a amarillo (L. Dortet et al., 2014). Tiene sensibilidad del 73 al 100% para detectar la mayoría de las CPMs (Tijet et al., 2013; Vasoo et al., 2013). Sin embargo, la sensibilidad para CPMs similares a OXA-48 es significativamente menor y en otro estudio fue solo del 6% (Papagiannitsis et al., 2015). Además, la prueba Carba NP requiere la preparación de reactivos con una vida útil corta, y la interpretación de los resultados es muy subjetiva al momento de la lectura que depende del observador. Se han descrito muchas variantes de la prueba Carba NP con modificaciones en el inóculo, los reactivos de extracción, el pH inicial, los indicadores de pH y los tiempos de lectura, como la prueba Blue Carba, que utiliza el indicador de pH azul de bromotimol (Pires et al., 2013).

Desde 2015, el CLSI ha abogado por el uso de una versión modificada de esta metodología para la verificación rutinaria de CPMs en enterobacterias (CLSI, 2021). El procedimiento sustituyó la utilización de colonias directas en vez de un extracto bacteriano, las cuales se incorporan a un proceso de incubación dentro de una solución que contiene imipenem, sulfato de zinc y rojo de fenol, y la actividad de las carbapenemasas se muestra por un cambio de color rojo a naranja o amarillo debido a la presencia de ácidos, como productos de la descomposición del imipenem.

En una investigación que compara 191 aislados de enterobacterias, la prueba Carba NP modificada tuvo sensibilidad mayor del 99% (IC 95%, 95 a 100), con especificidad del 100% (IC 95%, 93 a 100%) (Tamma, Opene, et al., 2017). Otros estudios han obtenido resultados más modestos con la prueba de Carba NP modificada. Tijet y cols., demostraron que la sensibilidad de la prueba para detectar carbapenemasas similares a OXA-48 aumentó de 56% a 71% en la prueba Carba NP modificada con respecto a la prueba original y descubrieron que los aislados mucoides eran particularmente propensos a dar resultados falsos negativos (Tijet et al., 2013).

Ensayo colorimétrico

La prueba β -CARBA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) es una prueba cromogénica comercialmente rápida y fácil de usar (Compain et al., 2016). Esta prueba se basa en el cambio de color de un sustrato cromogénico no revelado en presencia de enzimas con efecto hidrolítico sobre carbapenémicos (Bernabeu et al., 2017). Una colonia se resuspende en 200 μ L de una mezcla de reacción y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min, un cambio de color de amarillo a rojo anaranjado o púrpura indica la presencia de actividad hidrolítica sobre el carbapenémico. El fabricante informa que es 89.4% sensible y 97.8% específica para la detección de las CPMs más comunes. Un estudio de validación encontró que la sensibilidad general y la especificidad de la prueba β -CARBA para la detección de CPE (por ejemplo, 85.1% y 92.7%, respectivamente) fueron menores que con la prueba Carba NP (Compain et al., 2016).

Estudios realizados con la prueba β -Carba han mostrado que este kit puede resultar ser una alternativa altamente confiable, rápida y rentable con respecto a otras pruebas cromogénicas previamente desarrolladas para la detección de CPE (Bernabeu et al., 2017; Hinić et al., 2018). Su principal ventaja es su tiempo práctico extremadamente corto de menos de 3 minutos en ausencia de cualquier requisito de extracción de proteínas o preparación de soluciones antibióticas.

Prueba indirecta de carbapenemasas

La prueba de CPM indirecta (ICT) recientemente lanzada por MAST es un dispositivo de prueba en papel (Mathers et al., 2013), que tiene tres discos como puntas; uno para el control negativo, otro para el organismo prueba y el disco medio que contiene el carbapenémico. En dicho método se inoculan de 3 a 5 asadas de 1 μ L del organismo problema en la punta de papel donde corresponde la muestra problema y una cepa de *E.coli* susceptible a carbapenémicos de manera similar en la punta del control negativo. El dispositivo se invierte y se coloca firmemente en una placa de agar Mueller Hinton que ha sido sembrada previamente con un césped de *E.coli* susceptible. La placa se incuba de 16 a 20 h y cualquier distorsión resultante de la zona del disco indicador se considera positiva para la producción de CPMs, las cuales degradan al carbapenémico que se difunde del disco al medio, dando la posibilidad de que exista crecimiento de *E.coli* dentro del halo de inhibición (Mathers et al., 2013). Esta prueba tiene sensibilidad del 100% para la detección de las CPMs más comunes, pero es más subjetiva de interpretar que la prueba mCIM, mostrando una especificidad del 70,3% (Creighton & Tibbs, 2017).

Ensayo electroquímico

La prueba BYG Carba es un método electroquímico nuevo para la confirmación rápida de CPE, ya que reconoce la hidrólisis de carbapenémicos mediante una reacción electroquímica en la que está implicado un cambio de pH (Bogaerts et al., 2016). La prueba BYG Carba detecta variaciones de conductividad de un electrodo recubierto con polianilina (un polímero electro sensible). La polianilina es altamente sensible a las modificaciones del pH y la actividad redox, que ocurren durante la reacción de hidrólisis enzimática del imipenem por acción de una CPM. Estas modificaciones, pueden medirse y controlarse en tiempo real mediante la prueba BYG Carba, la cual es indicativa para la presencia de enzimas con actividad hidrolítica sobre carbapenémicos, incluidas las cinco familias principales de CPMs (VIM, NDM, IMP, KPC, OXA-48). El principal inconveniente de este método es que en su formato original (BYG v1.0) se requería una suspensión bacteriana pesada (McFarland 4 correspondiente a $\pm 10^9$ UFC/mL) análoga a la empleada en los ensayos colorimétricos. Para una segunda versión de la prueba, se empleó un inóculo más pequeño (el cual corresponde solo de una a tres colonias, es decir, aproximadamente a 10^6 UFC/mL) depositado directamente en el electrodo (tiempo de práctica de aproximadamente un minuto). Esta carga bacteriana reducida permite el uso de la placa de cultivo primaria y evita la necesidad de un subcultivo

adicional. La prueba BYG Carba con este nuevo protocolo (v2.0) fue validada en un ensayo multicéntrico que se realizó en cuatro laboratorios con reconocida experiencia en la caracterización de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en Europa. Los resultados están disponibles dentro de 30 minutos, y la evaluación realizada por estos cuatro centros mostró sensibilidad y especificidad de hasta 99.7% y 100%, respectivamente, para la detección de CPE. Al considerar el rendimiento de la prueba para detectar familias individuales de CPMs, el BYG Carba v2.0 detectó las cinco familias principales de estas con una sensibilidad que oscila entre 86.7% para IMP y 100% para KPC. En particular, 122/127 (96.1%) organismos productores de tipo OXA-48 fueron detectados correctamente por BYG Carba v2.0 así como, CPMs menos comunes como SME, NMC-A, y GIM-1 (Bogaerts et al., 2017)

Ensayos espectrofotométricos

Se ha introducido el método bioquímico basado en el ensayo de espectrofotometría UV para la identificación de CPE ((Bernabeu et al., 2012)148). Este método se realiza en varios pasos, los cuales incluyen: un cultivo de 18 horas (en algunos casos puede reducirse a 8 horas), seguido de un paso para la extracción de proteínas y por último se mide la hidrólisis del carbapenémico posterior a su contacto con el extracto proteico usando un espectrofotómetro UV. La hidrólisis del carbapenémico en presencia o ausencia de inhibidores (p. Ej., EDTA o ácido dipicolínico para MBLs, tazobactam o ácido clavulánico para KPC, NaCl in vitro para la mayoría de las oxacilinasas), realizada con extractos de células crudas o enzimas parcialmente purificadas, podría proporcionar información adicional sobre el tipo de enzima.

La espectrofotometría UV mostró en un estudio sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de CPE. Sin embargo, esta metodología no está disponible para el diagnóstico clínico, ya que estas técnicas requieren mucho tiempo y a su vez requieren personal capacitado, por lo cual generalmente solo son aplicadas en investigación (Laurent Dortet et al., 2014).

MALDI-TOF/MS

La tecnología MALDI-TOF/MS ha sido establecida para la identificación microbiana tanto a nivel de género como de especie. Se han encontrado dos aplicaciones principales de la tecnología MALDI-TOF/MS para la identificación rápida CPE. El primero, está basado en un enfoque de la actividad hidrolítica de las CPMs, mediante la búsqueda de los productos de degradación del carbapenémico. El segundo enfoque se basa en la búsqueda específica de un pico del espectro emitido y asociado a un plásmido, portador de una CPM conocida.

Con respecto a la actividad hidrolítica, se han descrito varios protocolos; (Burckhardt & Zimmermann, 2011; Jaroslav Hrabák et al., 2011, 2012). Con la hidrólisis del BL con la tecnología MALDI-TOF/MS, la sensibilidad y

especificidad informadas varían del 77% al 100% y del 94% al 100%, respectivamente, con un tiempo de respuesta de 4 h. Sin embargo, la prueba MALDI-TOF/MS como la Carba NP tiene dificultades para detectar enzimas OXA-48, y por ello, las enterobacterias que tienen estas enzimas pueden dar resultados falsos negativos (J. Hrabák et al., 2014). Algunos estudios han corroborado que el imipenem es el mejor carbapenémico para la detección de bacterias portadoras de betalactamasas similares a OXA-48 (Oviaño et al., 2016), y la adición de bicarbonato de amonio al medio incrementa la capacidad de MALDI-TOF/MS para detectar las OXA-48 (Studentova et al., 2015). Investigaciones recientes, sugieren que la inclusión de temocilina, que sugiere actividad de OXA-48, puede detectar efectivamente este mecanismo de resistencia (Oviaño et al., 2016).

Recientemente, se exploró el papel de los inhibidores de CPMs, uno de ellos es el ácido fenilborónico, el cual inhibe a las de clase A, lo cual ocasiona que no se altere el espectro del carbapenémico posterior al proceso de incubación con alguna de estas enzimas, mientras que el espectro del carbapenémico estudiado se sigue viendo alterado en el caso de estar en contacto con productores de MBLs. Por el contrario, al agregar el ácido dipicolínico como agente quelante, los espectros emitidos de la forma hidrolizada de ertapenem permanecen en entornos con carbapenemasas de clase A, pero los picos asociados con dicha molécula no se ven alterados en el caso de los productores de MBLs (Oviaño et al., 2016).

Recientemente, Bruker Daltonics (BD) lanzó un módulo de software, llamado MBT STAR-BL, para el análisis automático de espectros de masas en hidrólisis de fármacos que se ha integrado en el software MBT Compass para la identificación de especies (Saleh et al., 2018). El software se acompaña de protocolos detallados para la preparación manual de reactivos. Posteriormente, se lanzó el kit MBT STAR-Carba IVD, es el primer ensayo de detección de resistencia con espectrometría de masa certificado y en combinación con el MBT STAR-BL, mostró sensibilidad del 100% y especificidad de 98,2% para la detección de CPE, incluidas cepas con variantes similares a OXA-48, dentro de un tiempo de respuesta de 55 min (Laurent Dortet et al., 2018).

Por otra parte, la observación del espectro asociado al plásmido funciona de manera completamente diferente. Los investigadores de los Institutos Nacionales de Salud evaluaron retrospectivamente los perfiles de proteínas del plásmido pKpQIL que porta el gen *bla_{KPC-3}* involucrado en un brote de *K. pneumoniae* en Estados Unidos. (Lau et al., 2014). Se identificó un pico dentro del espectro emitido de aproximadamente 11,109 Da, el cual corresponde a un producto génico del plásmido pKpQIL portador de *bla_{KPC-3}* común a todos los aislados de *K. pneumoniae* productoras de CPMs y ausente de un conjunto diverso de controles (Lau et al., 2014). La identificación de plásmidos usando este método por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS se logró en tan solo 10 minutos a partir de colonias aisladas. Un trabajo posterior de los mismos investigadores, incluyeron 140 aislados de enterobacterias, se mostró sensibilidad y especificidad superiores al 95% (Youn

et al., 2016). Los investigadores proponen que los picos característicos dentro de un espectro emitido pueden ser útiles para rastrear otros plásmidos que confieren resistencia a carbapenémicos.

Es importante destacar que el uso de la tecnología MALDI-TOF/MS para la detección de CPMs por el método de hidrólisis requiere configuración diferente del instrumento a las utilizadas tradicionalmente para la identificación microbiana aprobada por la FDA, además de validación interna. Actualmente, el enfoque de hidrólisis MALDI-TOF/MS para la detección de CPMs requiere la preparación de reactivos y un conocimiento avanzado de la configuración del instrumento MALDI-TOF/MS. Aunque el pico asociado con el plásmido es prometedor, solo se ha evaluado para un solo gen de CPM asociado con el plásmido.

Inmunoensayos de flujo lateral

El ensayo de flujo lateral inmunocromatográfico se basa en una reacción antígeno-anticuerpo realizada en papel cromatográfico y es fácil de realizar con resultados rápidos, son métodos basados en anticuerpos para identificar el grupo específico de la CPM producida, inclusive cuando múltiples tipos de ellas están presentes simultáneamente (Boutal et al., 2017; Glupczynski et al., 2016; Saleh et al., 2018). Recientemente, se han desarrollado varios inmunoensayos de flujo lateral (LFIA), estos generalmente permiten la detección de una o algunas de las CPMs más importantes desde el punto de vista epidemiológico. Los LFIA se han desarrollado para la detección de CPE tipo: NDM, IMP, similares a OXA-48, KPC y similares a OXA-48, KPC y NDM (Tamma & Simner, 2018). Los datos disponibles sugieren que los LFIA producen resultados precisos de aislamientos cultivados en 15 minutos.

Recientemente, se evaluó un LFIA dirigida a las cinco familias principales de CPMs (es decir, KPC, NDM, VIM, IMP y similares a OXA-48) (Boutal et al., 2018). Tanto en los estudios retrospectivos como prospectivos, la sensibilidad del NG-Test Carba 5 fue del 100% (Boutal et al., 2018). La especificidad fue del 95% para la cohorte retrospectiva y del 100% para la cohorte prospectiva, con dos enzimas OXA no CPM (una OXA-405 y dos enzimas OXA-163) mal clasificadas como enzimas similares a OXA-48 (Boutal et al., 2018). Es importante destacar que Carba5 pudo detectar con precisión los aislamientos que producen dos CPMs (p. Ej., de tipo NDM y OXA-48), y no se observó reactividad cruzada con CPMs no dirigidas (p. Ej., GES, SME, etc.).

El NG-Test Carba 5 y/o LFIA similares pueden ofrecer enfoques precisos, rápidos rentables y fáciles de usar, por lo cual, es plausible que en el futuro los laboratorios de microbiología clínica puedan identificar la presencia de CPMs específicas con enfoques muy similares a los de base molecular.

Pruebas genotípicas

Las técnicas moleculares son altamente sensibles y específicas para la detección de genes de CPMs entre enterobacterias y por lo tanto son consideradas como gold standard para su identificación. La estrategia básica para la identificación de este tipo de enzimas se basa en tecnología de amplificación de los genes que confieren resistencia a carbapenémicos, y su secuenciación para confirmar el subtipo específico (Matsumura & Pitout, 2016). Además, las técnicas de hibridación se han usado comúnmente para la identificación de genes de CPMs en laboratorios de investigación y centros de referencia. Para fines de diagnóstico, la detección de genes es suficiente, mientras que la identificación de subtipos es más relevante para los programas de vigilancia epidemiológica.

Los ensayos moleculares se realizan principalmente en aislados de cultivos bacterianos, y algunos ensayos también ya se han validado para la identificación de genes de CPMs directamente de muestras clínicas. Varios métodos internos de amplificación de genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como: sistemas de PCR en tiempo real comerciales y microarreglos de ADN están disponibles para uso clínico de rutina y generalmente tienen como objetivo identificar diferentes CPMs de manera simultánea. Es importante tener en cuenta que algunos genes similares a CPMs tienen una variación significativa en las secuencias de nucleótidos, lo que lleva a resultados falsos negativos (Findlay et al., 2014), mientras que ciertos subtipos de betalactamasas sin actividad hidrolítica en carbapenémicos pueden producir resultados falsos positivos (Laurent Dortet et al., 2016).

Las ventajas de las pruebas moleculares basadas en ácidos nucleicos, en comparación con las pruebas fenotípicas convencionales basadas en cultivos, incluyen: tiempo de respuesta rápida; identificación definitiva de genes específicos de CPMs; y, en algunos casos, la capacidad de realizar pruebas directamente a partir de muestras clínicas sin la necesidad del cultivo. Las desventajas de los métodos moleculares incluyen los costos relativamente altos (en comparación con la mayoría de las pruebas fenotípicas), la capacidad de detectar solo genes de CPM específicas en el ensayo (en comparación con los ensayos de hidrólisis) y los tiempos de respuesta son relativamente más largos (en comparación con las pruebas fenotípicas rápidas como las tecnologías de flujo lateral, que tienen tiempos de respuesta de minutos vs horas).

PCR casera

Los ensayos de PCR multiplex internos pueden detectar simultáneamente a los genes de CPMs más comunes (por ejemplo, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP}) (Doyle et al., 2012). El ensayo multiplex más disponible tiene la capacidad de identificar 11 genes diferentes de CPE en tres reacciones separadas (Gans & Wolinsky, 2008).

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una metodología, rápida, rentable y fácil de realizar que requiere solo un baño de agua o un bloque de calentamiento para obtener una temperatura constante. Los resultados se pueden interpretar a simple vista o con luz ultravioleta. Srisrattakarn y col. publicó un ensayo LAMP para la detección de *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP-14} con un tiempo de reacción de 60 min (Srisrattakarn et al., 2017).

El ensayo Luminex xTAG es de bajo costo que puede detectar 46 betalactamasas en 5 h (Ceysens et al., 2016). El ensayo utiliza PCR de ligación de oligonucleótidos múltiples y detección basada en sonda compatible con xTAG utilizando el sistema MAGPIX Dx para interpretar los resultados.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real, es superior en términos de especificidad y rapidez, requiere menos mano de obra, pero es más costosa que una PCR convencional. Monteiro y col. desarrollaron un ensayo de solo una reacción para *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{GES} utilizando análisis de curva de fusión (Monteiro et al., 2012). También se han informado ensayos basados en sondas para la detección simultánea de *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM} (T. D. Lee et al., 2015), así como para *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} (Van der Zee et al., 2014).

Otros métodos Check-Direct CPE, EntericBio CPE, Amplidiag CarbaR+VRE assay y Amplidiag CarbaR+MCR (Pitout et al., 2020) incluyen reactivos de PCR y utilizan instrumentos de PCR multiplex en tiempo real por ejemplo, el instrumento LightCycler 480 y el sistema de tiempo real Applied Biosystems 7500. El ensayo de sonda de línea de CPMs AID puede detectar 13 genes de CPMs en una sola reacción (Bloemberg et al., 2017). Un ensayo molecular rápido usando LAMP ha estado disponible como Eazyplex superbug CRE (García-Fernández et al., 2014). Este ensayo proporciona resultados en 15 minutos para la amplificación de 7 genes de resistencia, así como un control interno.

Las ventajas de los ensayos comerciales incluyen la aprobación como pruebas de diagnóstico clínico. Estos ensayos están validados principalmente para la detección directa de genes de CPMs en muestras clínicas. Las desventajas incluyen un alto costo y un rendimiento de detección incierto para los subtipos *bla*_{OXA-48} debido a la falta de disponibilidad de secuencias de oligonucleótidos específicos.

Microarreglos

Las técnicas de hibridación de ADN en formato de microarreglos permiten la detección simultánea de muchas secuencias. En 2010, Ulyashova et al. (Ulyashova et al., 2010) desarrolló un microarreglo capaz de identificar CPMs de tipo KPC, OXA, IMP, SPM, VIM, SIM y GIM. Este método proporciona excelente sensibilidad y especificidad. Las CPMs y otras betalactamasas también pueden ser detectadas directamente de hemocultivos. Sin embargo, la sensibilidad puede verse

influenciada por el método utilizado para la extracción de ADN. Con excepción de los hemocultivos, los microarreglos para la detección de betalactamasas aún no se han validado para otras muestras clínicas. La ventaja de los ensayos basados en microarreglos es la capacidad de detectar simultáneamente una gran cantidad de genes. Las principales limitaciones son el alto costo, el tiempo de respuesta y la mano de obra asociada con el procedimiento. El kit Check-MDR CT103 XL puede detectar simultáneamente 11 genes diferentes de CPMs (Cunningham et al., 2016).

Sistemas automatizados de PCR

El uso de sistemas de PCR comerciales totalmente automatizados reduce la carga de trabajo y el tiempo de respuesta. Estos incluyen el sistema GeneXpert que es un sistema basado en cartuchos de uso fácil que solo requiere la carga de muestras (Smith et al., 2016). El sistema BD MAX, es un kit comercial listo para usar, permite protocolos desarrollados por el usuario, y se han informado varios ensayos internos (Hofko et al., 2014) y comerciales (Antonelli et al., 2016).

Algunos otros métodos muy recientes incluyen los siguientes: La prueba de identificación de cultivo de sangre ePlex (BCID) GenMark. El panel de neumonía BioFire FilmArray y el panel Unyvero LRT. El ensayo GenePOC Carba se lanzó recientemente como una prueba de punto de atención para detectar los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}* y *bla_{IMP}* (De Jonge et al., 2016).

Secuenciación

La secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) se basa en tecnología de secuenciación de próxima generación, puede reconstruir genomas bacterianos, permitiendo la detección de todas las CPMs conocidas y sus variantes. El método es más rentable y menos lento que las técnicas de secuenciación estándar. La WGS se está convirtiendo en el pilar de los estudios epidemiológicos moleculares debido a su precisión y capacidad de análisis exhaustivo, incluida la relación clonal, los plásmidos, los genes de virulencia, los elementos genéticos móviles y los tipos de fagos (Hughes et al., 2016; Rimoldi et al., 2016; Roberts et al., 2020).

Las bases de datos de genes de resistencia, como ResFinder, ARG-ANNOT y CARD, se utilizan con frecuencia para la detección integral de genes implicados en la resistencia bacteriana. ResFinder ha sido utilizado comúnmente por investigadores y laboratorios clínicos debido a la disponibilidad de una interfaz web fácil de usar (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Sin embargo, para la identificación definitiva de las variantes de *bla_{OXA-48}*, se debe consultar la base de datos NCBI de referencia (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047>) (Pitout et al., 2020).

Método

- 1. Diseño del estudio:** experimental retrospectivo
- 2. Población de estudio:** 48 aislados clínicos de enterobacterias portadoras de CPMs recuperados del cepario del laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán del período de 2013 a 2016. Los aislados se recuperaron en agar sangre de carnero. Los aislados fueron previamente caracterizados mediante la detección de genes que confieren resistencia a carbapenémicos por PCR.
- 3. Variables:**
 - Solvente del carbapenémico
 - Características de lectura (intensidad de láser, número de disparos, marco de lectura) en el equipo MALDI-TOF/MS
 - Concentración del antibiótico empleado durante el protocolo
 - Tipo de CPM, que el método es capaz de identificar

4. Metodología

4.1 Preparación de reactivos

1. Preparación de la solución stock de ertapenem

1.- Se determinó la potencia del antibiótico en base a la pureza reportada en su certificado de análisis. Se pesaron 5.14 mg de sal sódica de ertapenem (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 1 mL de agua inyectable para obtener una solución stock de 5,000 µg/mL.

2.- Del stock se hicieron diluciones en solución amortiguadora de HCO_3NH_4 (MEYER, Ciudad de México, México) 10 mM para obtener concentraciones de: 500, 200, 100 y 50 µg/mL, de las cuales se hicieron alícuotas de 20 µL, que fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

2. Preparación de la solución matrix (BD)

Se pesaron 2.5 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico liofilizado (HCCA) (BD, Alemania) y se disolvieron en 250 µL de solvente orgánico (50% de acetonitrilo grado HPLC [Sigma-Aldrich, MO, US] 2.5% de ácido trifluoroacético (SIGMA) y 47.5% de agua.

4.2 Configuración del equipo MALDI-TOF/MS Bruker Daltonics.

1. Se utilizó el programa operativo flexControl 3.4 de BD para la lectura del espectro de masas del ertapenem.

Se creó un método de lectura dentro del programa operativo del equipo MALDI-TOF/MS denominado "flexControl", en la pestaña denominada "AutoXecute" en la

cual se realizaron los cambios de configuración general para la obtención de espectros de interés, dichas modificaciones fueron las siguientes:

General: Nombre del método:

D:\Methods\flexcontrolMethods\MBT_FC.parcarba.par; descripción: susceptibilidad carbapenémicos.

Laser: Poder inicial del láser: 17%; poder máximo del láser: 24%.

Evaluation: Selección de picos: se utilizó un marco de lectura de masas de 0 a 1000 Da; se usó la lista de antecedentes: fondo; exclusión de picos: ignorar 1 pico más grande en el rango de masa definido; el pico debe ser superior a 300; control difuso: proteínas/oligonucleótidos.

Accumulation: Resumen: 200 disparos satisfactorios en 200 pasos de disparos.

Movement: Patrón aleatorio; disparos en el punto de importancia: 200.

Processing: Método FlexAnalysis: Centroid.

4.3 *Caracterización del espectro de la matrix (HCCA) para su uso en la calibración del método*

1.- Se colocó 1 μL de la solución amortiguadora de HCO_3NH_4 10 mM en un pozo de la placa de acero de 96 pozos (BD), se dejó secar al aire y se agregó 1 μL de matrix en el mismo pozo, se dejó secar al aire y se leyó en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

2.- Obtenido el espectro, se analizó en el programa FlexAnalysis (BD) en busca de uno de los picos reportados en la literatura para el HCCA de 379 Da.

3.- Dicho proceso se repitió 10 veces, hasta que se logró identificar y caracterizar la presencia de dicho pico en los espectros emitidos para obtener reproducibilidad.

4.4 *Caracterización del espectro de ertapenem (curva de concentraciones)*

1.- Después de caracterizar el pico de interés del HCCA, este fue utilizado como calibrador para caracterizar el espectro emitido por el ertapenem.

2.- Se sacaron del ultra congelador un juego de alícuotas de las diluciones de ertapenem previamente preparadas (500, 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se descongelaron a temperatura ambiente.

3.- Una vez descongeladas las alícuotas, se agregó 1 μL de cada dilución en diferentes pozos de la placa metálica BD, se dejaron secar y se agregó 1 μL de matrix en el mismo pozo, se secó al aire libre y se leyó el espectro en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

4.- Obtenidos los espectros se analizaron por medio del programa flexAnalysis en busca de los picos de 450Da, 476 Da, 498 Da, y 521Da que genera el ertapenem informados en la literatura.

5.- Reproducibilidad. El proceso se repitió 10 veces con las distintas concentraciones preparadas, hasta que se logró identificar y caracterizar la presencia de dichos picos en los espectros emitidos.

4.5 Estandarización de la estabilidad del antibiótico durante la incubación

1.- Se utilizó la molécula del HCCA como calibrador para caracterizar el espectro del ertapenem.

2.- Se descongelaron alícuotas de las diluciones de ertapenem previamente preparadas (500, 200, 100 y 50 µg/µL) a temperatura ambiente.

3.- Para comprobar la estabilidad del antibiótico, se incubaron las alícuotas a 37°C ± 1°C durante 2.5 h.

4.- Después de la incubación, se agregó 1 µL de cada dilución en los diferentes pozos de la placa metálica BD, se dejó secar y se agregó 1 µL de matrix, se dejó secar al aire y se realizó la lectura del espectro en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da, obtenidos los espectros se analizaron por medio del programa flexAnalysis en busca de los 4 picos descritos en el punto 4.

4.6 Estandarización de la estabilidad del antibiótico durante su almacenamiento en congelación

1.- Se utilizó la molécula del HCCA como calibrador para caracterizar el espectro de ertapenem.

2.- Se descongelaron las alícuotas de las diluciones de ertapenem (500, 200, 100 y 50 µg/µL), después de haber transcurrido el primero, segundo y tercer mes.

3.- Después de descongeladas las diluciones, se agregó 1 µL de cada una en diferentes pozos de la placa metálica BD, se dejaron secar al aire y se agregó 1 µL de matrix, se dejaron secar al aire y se leyó la placa en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

4.- Obtenidos los espectros se analizaron por medio del programa flexAnalysis para buscar los 4 picos descritos en el punto 4.

4.7 Estandarización del control blanco

1.- Se realizaron experimentos para garantizar que no hubiera interferencia que afectara el espectro del antibiótico al estar presente la bacteria a probar.

2.- Se tomó el cultivo de la cepa de *E. coli* ATCC® 25922™ de 24 h de crecimiento en agar sangre de carnero al 5% (ASC) con un asa estéril de 1 µL (de 1 a 5 colonias),

y se agregó a una alícuota de 20 μL de HCO_3NH_4 10 mM sin antibiótico y el tubo se agitó en vortex durante 10 s.

3.- Una vez homogenizada la muestra se incubó a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2.5 h.

4.- Después de la incubación se centrifugó a 14,000 $\times g$, durante 2 min.

5.- Se tomó 1 μL del sobrenadante y se colocó en uno de los pozos de la placa metálica BD, se dejó secar al aire y se agregó 1 μL de matrix, se dejó secar al aire y se leyó la placa en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

6.- Obtenido el espectro se analizó por medio del programa flexAnalysis y se determinó si durante la incubación se había producido algún pico del espectro que pudiera ocasionar interferencia dentro del intervalo de lectura de 200 a 600 Da.

7.- Dicho proceso se repitió 10 veces para determinar que no hubiera interferencias.

4.8 Estandarización del control negativo

1.- Se descongelaron las alícuotas de las diluciones de ertapenem (500, 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a temperatura ambiente.

2.- Se tomó el cultivo de la cepa de *E. coli* ATCC® 25922™ de 24 h de crecimiento en agar sangre de carnero (ASC) con un asa estéril de 1 μL (de 1 a 5 colonias), y se agregaron a cada alícuota del ertapenem, los tubos se agitaron en vortex durante 10 s.

3.- Una vez homogenizadas las muestras se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2.5 h.

4.- Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 14,000 $\times g$, durante 2 min.

5.- De cada sobrenadante se tomó 1 μL y se depositaron en diferentes pozos de la placa metálica BD, se dejaron secar al aire y se agregó 1 μL de matrix, se dejó secar al aire y se leyeron en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

6.- Obtenidos los espectros se analizaron por medio del programa flexAnalysis en busca de los 4 picos descritos en el punto 4.

7.- El proceso fue repetido 10 veces con cada una de las concentraciones probadas del ertapenem (reproducibilidad).

4.9 Estandarización de los controles positivos

1.- Se descongelaron dos juegos de alícuotas de las concentraciones de ertapenem (500, 200, 100 y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a temperatura ambiente.

2.- Se sembraron las cepas *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ y *E. cloacae* ATCC® BAA-2468™ en ASC para tener cultivos de 24 horas de crecimiento.

3. Una vez descongelados los tubos con el antibiótico, se inocularon con asa estéril de 1 μL (de 1 a 5 colonias) la cepa *E. cloacae* ATCC[®] BAA-2468[™], y a otro juego de tubos la cepa *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705[™], los tubos se agitaron en vortex durante 10 s.

4.- Todos los tubos se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2.5 h.

5.- Después de la incubación se centrifugaron a 14,000 $\times\text{g}$, durante 2 min.

6.- De cada sobrenadante se tomó 1 μL y se colocaron en diferentes pozos de la placa metálica BD, se dejaron secar al aire y se colocó 1 μL de matrix en cada pozo, se dejaron secar al aire y se leyeron en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

7.- Obtenidos los espectros se analizaron en el programa flexAnalysis para determinar si había un espectro distinto al que se había estado obteniendo anteriormente con el ertapenem, en este caso solo se buscó un pico de interés del producto descarboxilado de 450 Da.

8.- El proceso fue repetido 10 veces con las distintas concentraciones del antibiótico (reproducibilidad), para observar el pico del producto de degradación del antibiótico debido a la hidrólisis de la CPM presente en las bacterias que se probaron.

4.10 Evaluación del método para la detección de cepas portadoras de carbapenemasas

Una vez estandarizado el método se procedió a probar los 48 aislados de enterobacterias de la siguiente manera:

1.- Los aislados a probar se descongelaron a 4°C , se incluyeron las cepas control

2.- Posteriormente, se agitaron en vortex y con asa estéril se tomó una crioperla y fue inoculada en ASC mediante estría cruzada, las placas fueron incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche.

3.- Después de la incubación, se observó el crecimiento y la pureza de las cepas recuperadas, se preparó una suspensión 0.5 de McFarland y se realizó susceptibilidad a ertapenem 10 μg (Becto Dickinson), por la técnica de difusión en disco para confirmar el fenotipo de resistencia.

4.- Se descongelaron alícuotas de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ertapenem.

5.- En cada tubo con el antibiótico, se le agregaron de 1-5 colonias de cada aislado a probar, los controles positivos y el control negativo, los tubos fueron agitados en vortex, durante 10 s.

6.- Todos los tubos se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2.5 h.

7.- Después del tiempo de incubación se centrifugaron a 14,000 $\times\text{g}$, durante 2 min.

8.- En la placa metálica BD primero se colocó 1 µL de la solución amortiguadora de HCO₃NH₄ 10 mM y posteriormente se tomó 1 µL del sobrenadante de cada una de las cepas para cada pozo de la placa, se dejaron secar al aire y se agregó 1 µL de matrix en cada pozo, se dejaron secar y se realizó la lectura de la placa en el equipo bajo las condiciones previamente descritas en un rango de 200 a 600 Da.

9.- Con los espectros generados, se analizó primero el obtenido del HCCA, que fue empleado por el programa flexControl 3.4 para calibrar las lecturas obtenidas por el equipo, y analizar correctamente los espectros emitidos por los controles positivos, control negativo y muestras problema por medio del programa flexAnalysis en busca de los 4 picos descritos en el punto 4

10.- Durante el análisis, los espectros primero fueron validados mediante los espectros obtenidos en los controles positivos y el negativo. En el momento en que se estaban analizando los espectros de las cepas problema, estos se validaron mediante los resultados satisfactorios obtenidos de los controles positivos y el negativo.

11.- El ensayo de detección de hidrólisis de ertapenem por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS fue repetido 3 veces con la concentración de 200 µm/mL (reproducibilidad) en cada cepa.

Actividades realizadas

Las descritas en el apartado anterior.

Objetivos y metas alcanzados

Mediante este reporte se logró liberar el servicio social.

Resultados

1. Estandarización de la prueba en el equipo MALDI-TOF/MS.

Caracterización del espectro de ertapenem (curva de concentraciones)

Se logró caracterizar con éxito los 4 picos reportados en la literatura, después se analizó la influencia de la concentración del antibiótico sobre cada espectro y se determinó si existían diferencias debido a esta variable y así establecer la concentración del antibiótico a emplear durante el desarrollo del protocolo.

No se observaron diferencias entre los espectros obtenidos a distintas concentraciones, y por ello se decidió emplear la concentración de 200 µg/mL, debido a que era la que más se encontraba reportada en ensayos similares.

Estandarización de la estabilidad del antibiótico durante la incubación

En los espectros obtenidos, se analizó la influencia de la temperatura sobre el antibiótico con diferentes concentraciones y se observó si había diferencia entre los

espectros del antibiótico antes y después de la incubación. El espectro de ertapenem puro no se alteró por la incubación a 37 ± 1 °C durante 2.5 h.

Estandarización de la estabilidad del antibiótico durante su almacenamiento en congelación

En los espectros obtenidos, se analizó la influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la molécula del antibiótico a distintas concentraciones y se determinó si había diferencias entre los espectros del antibiótico previo al almacenamiento y posterior a este, tales como el aumento de otros productos de degradación, con la intención de establecer su vida útil durante el almacenamiento a -70°C.

No se observaron diferencias entre los espectros del ertapenem recién preparado y los espectros del ertapenem almacenado durante 2 meses a -70 ° C.

Estandarización del control blanco

Todos los espectros de los sobrenadantes de la cepa incubada sin ertapenem (blanco) mostraron perfiles de picos comparables a los del NH_4HCO_3 puro (Fig. 3, ver **Anexos**), observamos que en todas las repeticiones no se generó ninguna molécula o metabolito que pudiera producir ruido durante el análisis del espectro emitido para ertapenem.

Estandarización del control negativo

Posterior a la incubación de dicho control con ertapenem, se analizó el espectro del sobrenadante para observar si había modificaciones del mismo (cambios en la intensidad y/o ausencia de picos), y comprobar que la cepa susceptible a carbapenémicos no produjera la degradación del antibiótico después de la incubación.

Durante el proceso de estandarización todos los espectros de los sobrenadantes posteriores al proceso de la incubación con el control negativo mostraron perfiles de picos comparables con los de ertapenem puro.

Estandarización de los controles positivos

Posterior a la incubación de dichos controles con ertapenem, se analizó el espectro del sobrenadante para observar si había modificaciones del mismo (cambios en la intensidad y/o ausencia de picos), y comprobar que las cepas portadoras de CPMS produjeran la degradación del antibiótico después de la incubación.

Durante el proceso de estandarización en todos los espectros de los sobrenadantes posteriores al proceso de la incubación con los controles positivos, se pudo confirmar el incremento del pico del producto de degradación del antibiótico (450 Da), así como la disminución del pico perteneciente a ertapenem puro (476 Da), los cuales corresponden al espectro característico de la molécula hidrolizada.

Se analizaron un total de 48 enterobacterias provenientes del cepario del laboratorio de microbiología del INNSZ, de las cuales 21 fueron *E. coli* (44%), 16 *K. pneumoniae* (33%), 8 *K. oxytoca* (17%), 2 *C. freundii* (4%) y una cepa de *R. ornithinolytica* (2%). De las 48 cepas estudiadas, 36 eran portadoras de genes similares a *bla*_{OXA-48} (75%), 9 portadoras de genes *bla*_{KPC} (19%) y 3 portadoras de genes *bla*_{GES} (6%), tal como se muestra en la **Tabla 1** (ver **Anexos**).

Cuando se realizó la prueba de susceptibilidad a ertapenem por la técnica de difusión en disco para verificar que el fenotipo de resistencia siguiera presente en las bacterias recuperadas del cepario, se pudo corroborar que con base en los criterios de interpretación de susceptibilidad del CLSI en su documento M100 30th, 2020, 40 cepas seguían presentando un perfil de resistencia a ertapenem (83%), 6 presentaban un perfil de susceptibilidad intermedia (13%) y dos perdieron su fenotipo de resistencia, ya que se mostraron como susceptibles a dicho carbapenémico (4%), tal como se muestra en la **Tabla 2** (ver **Anexos**).

De las 36 cepas resistentes, nueve fueron portadoras de KPC, 33 portadoras de CPMs similares a OXA-48 y 3 portadoras de tipo GES. Así mismo, las cepas con susceptibilidad intermedia, todas eran portadoras de CPMs similares a OXA-48. De las cepas susceptibles, todas fueron portadoras de CPMs similares a OXA-48.

El ensayo de detección de hidrólisis de ertapenem por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS fue repetido 3 veces con la concentración de 200 µg/mL, ya que se tenía que confirmar la ausencia total o parcial de los picos del espectro del carbapenémico, así como el aumento en la intensidad del pico del producto de degradación en todos los espectros obtenidos, debido a la presencia de las cepas portadoras de CPMs después del proceso de incubación.

2. Resultados del análisis de las cepas problema en el equipo MALDI-TOF/MS

Se analizaron todas las bacterias que conservaron su perfil de resistencia a ertapenem, se observó que algunas de las cepas (portadoras de enzimas similares a OXA-48 y GES) producían picos que representan hidrólisis parcial o ausencia total de los picos del carbapenémico, por ello se procedió a realizar una relación matemática (MS) con la fórmula: $[M/M+E]$; en donde M es la intensidad del metabolito y E es la Intensidad del pico del ertapenem, esta relación permitió diferenciar el producto descarboxilado de 450 Da y el de ertapenem puro de 476 Da (pico de mayor intensidad) después del proceso de incubación, logrando así establecer el punto de corte de 0.82, que permitió diferenciar entre las CPE de las no CPE. En todas las corridas de las cepas problema, se incluyeron las cepas control ATCC con CPE positivo y negativo.

Los resultados de la MS de las cepas probadas oscilaron entre 0,82 y 1,00 como positivas. La MS de las cepas negativas fue de 0.3 a 0.47. Todas las cepas con resultado negativo presentaron MS <0,82. Todas las cepas con resultado positivo presentaron MS ≥ 0,82, con excepción de dos cepas que solo se podían interpretar

como positivas mediante la adición de otro criterio, que fue la visualización del espectro, dichas cepas eran productoras de CPMs similares a OXA-48 y tenían MS menor que el límite calculado, 0.71 y 0.77, respectivamente.

Mediante la técnica de detección de CPMs por el método de MALDI-TOF/MS, 40/48 (83.3%) cepas fueron positivas y 8/48 (16.6 %) fueron negativas. De las cepas positivas: 9/40 (22.5%) eran portadoras de KPC, 30/40 (75%) portadoras de CPMs similares a OXA-48 y 1/40 (2.5%) fue portadora de tipo GES. De las cepas negativas, 6/8 (75%) eran portadoras de enzimas similares OXA-48 y 2/8 (25%) de tipo GES. De las cepas portadoras de similares a OXA-48 que dieron un resultado negativo, 2/6 (33%) fueron susceptibles a ertapenem. Los resultados fueron obtenidos por triplicado.

Todos los resultados que fueron incongruentes entre el proceso de caracterización inicial (PCR), fenotípico y de detección de hidrólisis por MALDI-TOF/MS fueron sometidos a la detección de CPMs mediante la prueba mCim. Además, fueron analizadas nuevamente mediante PCR y secuenciación para la detección de genes implicados en la producción de CPMs y los resultados fueron:

Se encontraron dos grupos de cepas con resultados atípicos, en el primer grupo se encontraron dos cepas de *E. coli* portadoras de enzimas similares a OXA-48 y dos *E.coli* portadoras de enzimas tipo GES. Este grupo se caracterizó por presentar un fenotipo de resistencia a ertapenem por medio de la técnica de difusión en disco, pero al momento de realizar la prueba por MALDI-TOF, estas dieron un resultado negativo debido a la ausencia de hidrólisis de la molécula de ertapenem. Al presentarse esta incongruencia, estas cepas se probaron con mCim, encontramos que, los dos aislados portadores de GES y un aislado portador de OXA-48 fue susceptible a ertapenem y el otro aislado también OXA-48, el resultado fue indeterminado, posteriormente, las cepas fueron enviadas para su caracterización mediante técnicas de biología molecular, en donde encontramos que, las cepas caracterizadas anteriormente como portadoras de genes similares a OXA-48 no presentaban amplificación hacia dicho gen, mientras que las cepas caracterizadas como portadoras de genes tipo GES, volvieron a amplificar nuevamente en dicho blanco, sin embargo no se pudo analizar dichos genes, debido a que el método de secuenciación presentó algunos problemas técnicos.

En el segundo grupo de cepas atípicas, se encuentran dos aislados de *K. pneumoniae*, portadores de enzimas similares a OXA-48. Este grupo se caracterizó por presentar fenotipo de resistencia a ertapenem por medio de la técnica de difusión en disco, pero al momento de realizar la prueba por MALDI-TOF, estas presentaron un MS <0.82, sin embargo, el espectro emitido por ambas cepas fue muy sugestivo de actividad CPM. Al presentarse esta incongruencia, las cepas fueron probadas por mCim, en la cual, uno de los dos aislados dio un resultado indeterminado y la otro dio un resultado positivo, para resolver esta discrepancia se realizó nuevamente la amplificación de dicho gen mediante PCR y posteriormente

su secuenciación y encontramos que ambas cepas amplificaron para genes similares a OXA-48 y posteriormente mediante la técnica de secuenciación se pudo confirmar que ambos genes pertenecían específicamente al grupo OXA-232.

Discusión

En este trabajo estandarizamos un método para la detección de CPMs en enterobacterias por medio de la tecnología MALDI-TOF/MS. Los resultados mostraron que dicho método es capaz de detectar las CPMs tipo KPC y similares a OXA-48 en enterobacterias.

Se logró obtener los espectros emitidos por la molécula de ertapenem, el cual fue calibrado internamente con el espectro observado de la matrix, estableciendo así primero un espectro basal que posteriormente dio paso a la correcta identificación de los picos producidos por la molécula de ertapenem y sus metabolitos, así como, la estabilidad del antibiótico a diferentes temperaturas y tiempo de almacenamiento.

Durante las repeticiones de los ensayos de hidrólisis de ertapenem con los controles positivo y negativo, se lograron obtener los espectros característicos en el sobrenadante de la solución con el antibiótico en contacto con una cepa productora y no productora de CPM después de la incubación. Cuando la molécula de ertapenem estuvo en presencia de una cepa productora se observó la desaparición total de los picos correspondientes a la molécula de ertapenem pura, así como de las sales monosódica y disódica y al mismo tiempo se pudo visualizar un aumento significativo del pico del producto de degradación, lo cual sucedió debido a la actividad hidrolítica propia de las CPMs presentes en los controles positivos, tal como se ha documentado que ocurre en otros ensayos de hidrolisis llevados a cabo con cepas productoras de CPMs (Burckhardt I & Zimmermann S, 2011, Vogne C et al, 2014, Yu J et al, 2018), al mismo tiempo, se observó que el espectro del ertapenem se mantuvo inalterado ante la presencia de una cepa no productora de CPM, esto debido a la incapacidad de dicha cepa para hidrolizar el carbapenémico, logrando así obtener los espectros característicos para un resultado positivo y negativo de la prueba.

En este estudio, además se comprobó que la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección rápida de CPE es confiable y rápida. Se probaron un total de 48 enterobacterias aisladas de muestras clínicas, las cuales ya habían sido caracterizadas como portadoras de CPMs pertenecientes a los grupos A y D de Ambler por métodos moleculares. Para la detección de los picos de ertapenem posterior al proceso de incubación con dichas cepas, primero se realizó un análisis manual de los espectros, pero este enfoque resultaba demasiado subjetivo, como se ha referido en ensayos de hidrólisis CPMs semejantes (Oviaño M et al, 2016, Vogne C et al, 2014). Las CPMs OXA-232 presente en la mayoría de los aislados de pacientes en el INCMNSZ, solo generan hidrólisis parcial en ertapenem, por ello,

un resultado basado en la desaparición total de los picos de dicho antibiótico resultaba poco adecuado. En base a estos resultados utilizamos el software especial flexAnalysis 3.0 para calcular la relación entre la intensidad del pico correspondiente al producto de degradación (450 Da) y la intensidad correspondiente del pico de la molécula de ertapenem pura (476 Da), con lo cual, se puede establecer una relación que refleja el cambio de la concentración de ambas moléculas, posterior al proceso de incubación, lográndose obtener puntos de corte que pudieron separar las cepas productoras de las no productoras de CPMs como se ha mostrado en estudios similares (Vogne C et al, 2014, Lasserre C, 2015).

Se utilizó el punto de corte de 0.82, con el que encontramos que el ensayo es confiable con 91% de sensibilidad y 100% de especificidad, obtuvimos resultados de rendimiento similares a los observados en estudios previos, en donde se han reportado valores de sensibilidad y especificidad mayores al 90% (Hoyos-Mallecot Y et al, 2014, Oviaño M et al, 2016, Kost K et al, 2017).

Cuando analizamos los resultados obtenidos en los ensayos de hidrólisis del carbapenémico, se pudo apreciar como las cepas portadoras de enzimas tipo KPC, a diferencia de las cepas portadoras de CPMs pertenecientes al grupo D producen hidrólisis total del ertapenem, esto debido a la mayor actividad hidrolítica propia de dichas enzimas, esta característica se ha mostrado en ensayos previos realizados con la espectrometría de masas MALDI-TOF en donde se han obtenido resultados de desempeño excelentes para su detección (Burckhardt I & Zimmermann S, 2011, Oviaño M et al, 2016), en este estudio, se observó que el método obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para su detección. Por otra parte, debido a la ausencia de la hidrólisis total del ertapenem en las cepas portadoras de CPMs similares a OXA-48 y de tipo GES, los resultados que se obtuvieron requirieron de un mayor análisis. Dos cepas que habían sido caracterizadas previamente como portadoras de genes similares a OXA-48 al realizar pruebas de confirmación de resistencia mediante difusión en disco y mCIM fueron susceptibles a ertapenem y en el ensayo de hidrólisis por MALDI-TOF/MS no presentaron hidrólisis del antibiótico. Esto se debe probablemente a que los plásmidos que contienen dicha resistencia por ser elementos genéticos móviles, los perdió la bacteria probablemente durante su almacenamiento sin antibiótico.

Durante el análisis del primer grupo de cepas con resultados atípicos, se pudo observar que las cuatro cepas pertenecientes a este grupo (2 cepas portadoras de genes similares a OXA-48 y 2 de tipo GES) poseían un fenotipo de resistencia a ertapenem mediante la prueba de difusión en disco, sin embargo, estas obtuvieron un resultado negativo mediante las pruebas de mCIM y MALDI-TOF/MS, por ello se realizaron PCR y secuenciación, para volver a caracterizarlas y confirmar si realmente presentaban el gen de la CPM. Una nueva caracterización mediante pruebas de tecnología molecular, en la cual se obtuvo que las 2 cepas que presuntivamente eran portadoras de genes similares a OXA-48, se observó que

efectivamente habían perdido el gen, pero aun así seguían presentado un perfil de resistencia a ertapenem, esto probablemente por otro mecanismo de resistencia, que ya no fue comprobado en este estudio. Por otro lado, las cepas que se habían caracterizado con la presencia de GES, al realizar la PCR para la búsqueda del gen, no hubo amplificación y por ello no se pudo realizar la secuencia nucleotídica para saber a cuál de las 31 variantes de esta familia pertenecía la cepa. Sin embargo, ante la ausencia de un resultado que pudiera elucidar el tipo específico de enzima que poseían estas 4 cepas no se pudo confirmar si los resultados obtenidos eran debido a la pérdida de la resistencia a ertapenem, o si era debido a que el fenotipo de resistencia mostrado fue por otros mecanismos de resistencia distintos, ya que el proceso de caracterización constaba de la búsqueda de genes pertenecientes a CPMs, pero no se realizó la búsqueda de otros mecanismos de resistencia adicionales que pueden generar resistencia a dicho carbapenémico.

Durante el análisis del segundo grupo de cepas con resultados atípicos, se pudo observar que las dos cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes a este grupo eran portadoras de CPMs similares a OXA-48. Este grupo se caracterizó por presentar un fenotipo de resistencia a ertapenem por medio de la técnica de difusión en disco, pero al momento de realizar la prueba por MALDI-TOF, estas presentaron un $MS < 0.82$, sin embargo, el espectro emitido por ambas cepas fue sugestivo de actividad CPM, por lo cual, en dichas cepas se consideraron resultados parcialmente positivos. Además, una cepa presentó un resultado positivo con la prueba mCim, mientras que la otra presentó un resultado indeterminado, de modo que esto indicó que la actividad hidrolítica de una de las dos cepas fue baja, que es una de las características propias de las CPMs pertenecientes a esta familia y que, en diversos estudios llevados a cabo, siempre ha representado un problema para su correcta detección (Oviaño M et al, 2016, Laurent Dortet et al, 2018). Posteriormente, se realizó una nueva caracterización de estas dos cepas mediante PCR y secuenciación, se confirmó que las 2 cepas eran portadoras de genes similares a OXA-48 y posteriormente durante el proceso de secuenciación de los amplicones obtenidos se determinó que ambas tenían OXA-232.

Finalmente, una vez analizados los resultados atípicos obtenidos durante las repeticiones de los ensayos de hidrólisis de las cepas portadoras de CPMs similares a OXA-48 se pudo establecer que siguiendo el criterio para dictaminar una cepa con presencia de CPM, se debe obtener un índice ≥ 0.82 , el método detectó 83.3 % de las cepas probadas como CPE, con 94% de sensibilidad y 100% de especificidad para su detección (debido a los resultados negativos obtenidos por las dos cepas de tipo OXA-232), estos valores son semejantes e inclusive superiores a los observados en otros estudios (Vogne C et al, 2014, Hoyos-Mallecot Y et al, 2014, Oviaño M et al, 2016, Kost K et al, 2017).

Por otra parte, la actividad CPM con un índice < 0.82 se considera positiva parcial, cuando emite espectros de hidrólisis del ertapenem con respecto al espectro de la molécula pura. Se recomienda observar y analizar el espectro de forma visual para

determinar que el antibiótico presenta hidrólisis parcial, sin embargo, es indispensable que este análisis lo realice personal entrenado para el análisis de espectros emitidos por la tecnología MALDI-TOF. Si nos basamos en el $MS \geq 0.82$ y se incluye el análisis visual de la hidrólisis parcial, el método alcanza 100% de sensibilidad y especificidad.

Se observó que la tecnología MALDI-TOF para la detección de resistencia a carbapenémicos tiene muchas ventajas en comparación con los métodos basados por difusión en agar, microdilución en caldo o PCR. Primero, dependiendo del tipo de CPM, los resultados pueden estar disponibles en 2.5 h. En segundo lugar, este método es sencillo y de bajo costo. Desafortunadamente, este método tiene una desventaja, no puede detectar otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos como la pérdida de la permeabilidad mediada por porinas, presencia de bombas de eflujo, o cuando existe la sobreproducción de algunas betalactamasas de tipo A o C etc, esto es una limitante de este estudio. (Haidar et al., 2017).

A medida que la difusión de CPE ha ido aumentando drásticamente en todo el mundo, ha surgido la necesidad urgente de la detección rápida de estos microorganismos. La espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en un método de elección rápido y eficiente en la identificación de bacterias y la detección de la resistencia a carbapenémicos, en un tiempo mucho menor que el obtenido con pruebas convencionales de susceptibilidad a antibióticos y métodos moleculares.

Conclusiones

- 1.- El método MALDI-TOF es reproducible y fue capaz de identificar de manera correcta las enterobacterias portadoras de CPMs tipo KPC y similares OXA-48.
2. La reproducibilidad del método es del 100%
- 2.- Este método reduce el tiempo en la información de resultados confiables de 48 h a 2.5 h.
- 3.- La reducción del tiempo de los resultados tiene gran impacto en el tratamiento oportuno del paciente, lo que conlleva a menor estancia hospitalaria, disminuyendo el riesgo de adquirir infecciones intrahospitalarias y la disminución de costos.
- 4.- Para la detección de enterobacterias portadoras de CPMs de tipo "GES", no es recomendable el uso de este método debido a las incongruencias en los resultados obtenidos en este trabajo.

Recomendaciones

El presente trabajo experimental puede ser útil para futuros ensayos en los cuales se busque evaluar otros antibióticos en los que se pueda evaluar la resistencia en enterobacterias.

Asesores Responsables

Asesora Interna:



Dra. María Elisa Drago Serrano
Profesora Investigadora
Número económico: 17243

Asesora Externa



Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Investigadora en Ciencias Médicas D
Cédula Profesional: 3705115

Bibliografía

- Antonelli, A., Arena, F., Giani, T., Colavecchio, O. L., Valeva, S. V., Paule, S., Boleij, P., & Rossolini, G. M. (2016). Performance of the BD MAX™ instrument with Check-Direct CPE real-time PCR for the detection of carbapenemase genes from rectal swabs, in a setting with endemic dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(1), 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.002>
- Arjun Srinivasan. (2010). CDC Commentary: Preventing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Medscape. https://www.medscape.com/viewarticle/713709?src=par_cdc_stm_mscpedt&faf=1
- Bernabeu, S., Dortet, L., & Naas, T. (2017). Evaluation of the β -CARBATM test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 1646–1658. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx061>
- Bernabeu, S., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(1). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.021>
- Blázquez, J. (2003). Hypermutation as a Factor Contributing to the Acquisition of Antimicrobial Resistance. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 37, Issue 9). <https://doi.org/10.1086/378810>
- Bloemberg, G. V., Braun-Kiewnick, A., Tedrup, J., Meijerink, C., Durer, E., Ritter, C., Keller, P. M., & Hombach, M. (2017). Evaluation of the AID carbapenemase line probe assay for rapid detection and identification of carbapenemase genes in gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(7). <https://doi.org/10.1093/jac/dkx100>
- Bogaerts, P., Oueslati, S., Meunier, D. *et al.* Multicentre evaluation of the BYG Carba v2.0 test. (2017). A simplified electrochemical assay for the rapid laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Rep* 7, 9937. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09820-y>
- Bogaerts, P., Yunus, S., Massart, M., Huang, T. D., & Glupczynski, Y. (2016). Evaluation of the BYG carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(2), 349–358. <https://doi.org/10.1128/JCM.02404-15>
- Bonnin, R. A., Jousset, A. B., Urvoy, N., Gauthier, L., Tlili, L., Creton, E., Cotellon, G., Arthur, F., Dortet, L., & Naas, T. (2017). Detection of GES-5 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a Newcomer in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(3), e02263-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02263-16>

- Borer, A., Saidel-Odes, L., Eskira, S., Nativ, R., Riesenber, K., Livshiz-Riven, I., Schlaeffer, F., Sherf, M., & Peled, N. (2012). Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. *American Journal of Infection Control*, 40(5). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.05.022>
- Bou, G., Vila, J., Seral, C., & Castillo, F. J. (2014). Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(S4). [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70171-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70171-5)
- Boutal, H., Naas, T., Devilliers, K., Oueslati, S., Dortet, L., Bernabeu, S., Simon, S., & Volland, H. (2017). Development and validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of NDM-producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00248-17>
- Boutal, H., Vogel, A., Bernabeu, S., Devilliers, K., Creton, E., Cotellon, G., Plaisance, M., Oueslati, S., Dortet, L., Jousset, A., Simon, S., Naas, T., & Volland, H. (2018). A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(4). <https://doi.org/10.1093/jac/dkx521>
- Bratu, S., Landman, D., Haag, R., Recco, R., Eramo, A., Alam, M., & Quale, J. (2005). Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: A new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of Internal Medicine*, 165(12). <https://doi.org/10.1001/archinte.165.12.1430>
- Burckhardt, I., & Zimmermann, S. (2011). Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00287-11>
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 62, Issue 10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., Pannell, M., Lock, J. L., Queenan, A. M., Jorgensen, J. H., Lee, R. M., Lewis, J. S., & Jarrett, D. (2013). Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 41, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.008>
- Castanheira, M., Toleman, M. A., Jones, R. N., Schmidt, F. J., & Walsh, T. R. (2004). Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM.1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

48(12), 4654–4661. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4654-4661.2004>

Ceyskens, P. J., Garcia-Graells, C., Fux, F., Botteldoorn, N., Mattheus, W., Wuyts, V., De Keersmaecker, S., Dierick, K., & Bertrand, S. (2016). Development of a Luminex xTAG® assay for cost-effective multiplex detection of β -lactamases in Gram-negative bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9). <https://doi.org/10.1093/jac/dkw201>

CDC. (2015). Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). CS261687-A.

CDC. (2019). CRE Technical Information. https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fhai%2Forganisms%2Fcre%2Fdefinition.html

CLSI. (2021). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition. CLSI supplement M 100. (ISBN 978-1-68440-104-8 [Print]; ISBN 978-1-68440-105-5 [Electronic]).

Compain, F., Gallah, S., Eckert, C., Arlet, G., Ramahefasolo, A., Decré, D., Lavollay, M., & Podglajen, I. (2016). Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the rapid and easy-to-use Chromogenic β carba test. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), 3065–3068. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-16>

Creighton, J., & Tibbs, C. (2017). Evaluation of the MAST indirect carbapenemase test and comparison with a modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase enzymes in Gram-negative bacteria. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, 71(3), 136–140.

Cunningham, S. A., Vasoo, S., & Patel, R. (2016). Evaluation of the check-points check MDR CT103 and CT103 XL microarray kits by use of preparatory rapid cell lysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.03302-15>

De Jonge, B. L. M., Karlowsky, J. A., Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Sahm, D. F., & Nichols, W. W. (2016). In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.03042-15>

Dhar, S., Martin, E. T., Lephart, P. R., McRoberts, J. P., Chopra, T., Burger, T. T., Tal-Jasper, R., Hayakawa, K., Ofer-Friedman, H., Lazarovitch, T., Zaidenstein, R., Perez, F., Bonomo, R. A., Kaye, K. S., & Marchaim, D. (2016). Risk factors and outcomes for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolation, stratified by its multilocus sequence typing: ST258 versus non-ST258. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv213>

Doi, Y., & Paterson, D. L. (2015). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 36(1), 74–84.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1544208>

- Dortet, L., Bréchar, L., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 340–344. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12318>
- Dortet, Laurent, Agathine, A., Naas, T., Cuzon, G., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(11), 3014–3022. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv213>
- Dortet, Laurent, Bréchar, L., Cuzon, G., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.01239-13>
- Dortet, Laurent, Fusaro, M., & Naasa, T. (2016). Improvement of the xpert carba-kit for the detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00517-16>
- Dortet, Laurent, Tandé, D., De Briel, D., Bernabeu, S., Lasserre, C., Gregorowicz, G., Jousset, A. B., & Naas, T. (2018). MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Comparison of the commercialized MBT STAR® -carba IVD kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC® CARBA NP. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9), 2352–2359. <https://doi.org/10.1093/jac/dky209>
- Doyle, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D. L., & Pitouta, J. D. D. (2012). Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-12>
- Drawz, S. M., Papp-Wallace, K. M., & Bonomo, R. A. (2014). New β -lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 1835–1846. <https://doi.org/10.1128/AAC.00826-13>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- EUCAST. (2017). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Kofteridis, D., Vartzili, S., Chelvatzoglou, F. C., Papaioannou, V., Maraki, S., Samonis, G., & Michalopoulos, A. (2007). Risk factors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections: A matched case - Control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5). <https://doi.org/10.1093/jac/dkm356>

- Findlay, J., Hopkins, K. L., Meunier, D., & Woodford, N. (2014). Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5). <https://doi.org/10.1093/jac/dku571>
- Gans, J. D., & Wolinsky, M. (2008). Improved assay-dependent searching of nucleic acid sequence databases. *Nucleic Acids Research*, 36(12). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn301>
- García-Fernández, S., Morosini, M. I., Marco, F., Gijón, D., Vergara, A., Vila, J., Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R. (2014). Evaluation of the eazyplex® SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1047–1050. <https://doi.org/10.1093/jac/dku476>
- García Apac, C. (2018). Resistencia antimicrobiana. In *Diagnóstico* (Vol. 57, Issue 2). <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i2.138>
- Giakkoupi, P., Tzouveleakis, L. S., Tsakris, A., Loukova, V., Sofianou, D., & Tzelepi, E. (2000). IBC-1, a novel integron-associated class a β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an Enterobacter cloacae clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2247–2253. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2247-2253.2000>
- Gil-Romero, Y., Sanz-Rodríguez, N., Almagro-Moltó, M., & Gómez-Garcés, J. L. (2013). Nueva descripción en España de un portador de Klebsiella pneumoniae productora de una carbapenemasa NDM-1. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 418–419. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.009>
- Girlich, D., Halimi, D., Zambardi, G., & Nordmann, P. (2013). Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.002>
- Glupczynski, Y., Evrard, S., Ote, I., Mertens, P., Huang, T. D., Leclipteux, T., & Bogaerts, P. (2016). Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5). <https://doi.org/10.1093/jac/dkv472>
- Haidar, G., Clancy, C. J., Chen, L., Samanta, P., Shields, R. K., Kreiswirth, B. N., & Nguyen, M. H. (2017). Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime-Avibactam and Imipenem-Relebactam against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9). <https://doi.org/10.1128/aac.00642-17>
- Hartl, R., Widhalm, S., Kerschner, H., & Apfalter, P. (2013). Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased

- carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(5). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12146>
- Hinić, V., Reist, J., & Egli, A. (2018). Evaluation of the rapid biochemical β -CARBATM test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.008>
- Hofko, M., Mischnik, A., Kaase, M., Zimmermann, S., & Dalpke, A. H. (2014). Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.00373-14>
- Hoyos-Mallecot, Y., Riazzo, C., Miranda-Casas, C., Rojo-Martín, M. D., Gutiérrez-Fernández, J., & Navarro-Marí, J. M. (2014). Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *Journal of microbiological methods*, 105, 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.016>
- Hrabák, J., Chudáčková, E., & Papagiannitsis, C. C. (2014). Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 20, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12678>
- Hrabák, Jaroslav, Študentová, V., Walková, R., Žemličková, H., Jakubů, V., Chudáčková, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y., Perry, J. D., Wilkinson, K., & Bergerová, T. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.01002-12>
- Hrabák, Jaroslav, Walková, R., Študentová, V., Chudáčková, E., & Bergerová, T. (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00984-11>
- Hu, Y. Y., Gu, D. X., Cai, J. C., Zhou, H. W., & Zhang, R. (2015). Emergence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 463 isolates in Hangzhou, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(5), 2914–2917. <https://doi.org/10.1128/AAC.04903-14>
- Huang, T. D., Berhin, C., Bogaerts, P., & Glupczynski, Y. (2014). Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(2). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.010>
- Hughes, H. Y., Conlan, S. P., Lau, A. F., Dekker, J. P., Michelin, A. V., Youn, J. H., Henderson, D. K., Frank, K. M., Segre, J. A., & Palmorea, T. N. (2016). Detection and whole-genome sequencing of carbapenemase-producing *aeromonas hydrophila* isolates from routine perirectal surveillance culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.03229-15>

- Hussein, K., Sprecher, H., Mashiach, T., Oren, I., Kassis, I., & Finkelstein, R. (2009). Carbapenem Resistance Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates Risk Factors, Molecular Characteristics, and Susceptibility Patterns . *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(7). <https://doi.org/10.1086/598244>
- Laconis, J. P., & Sanders, C. C. (1990). Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(1), 44–51. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.1.44>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). [Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens Consenso latino-americano para definición, categorización e notificación de patógenos multirresistentes, com resistência ampliada ou panresistentes]. *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 43. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Hackel, M., Rabine, S., De Jonge, B. L. M., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Global dissemination of blaKPC into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and in vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4490–4500. <https://doi.org/10.1128/AAC.00107-16>
- Kazmierczak, K. M., Rabine, S., Hackel, M., McLaughlin, R. E., Biedenbach, D. J., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 1067–1078. <https://doi.org/10.1128/AAC.02379-15>
- Kost, K., Yi, J., Rogers, B., & Jerris, R. (2017). Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Practical laboratory medicine*, 8, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2017.03.002>
- Kuwabara, S., & Abraham, E. P. (1967). Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochemical Journal*, 103(3). <https://doi.org/10.1042/bj1030027c>
- Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., Tandé, D. (2015). Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol*. 53(7):2163-71. doi: 10.1128/JCM.03467-14. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25926485; PMCID: PMC4473196.
- Lau, A. F., Wang, H., Weingarten, R. A., Drake, S. K., Suffredini, A. F., Garfield, M. K., Chen, Y., Gucek, M., Youn, J. H., Stock, F., Tso, H., DeLeo, J., Cimino, J. J., Frank, K. M., & Dekker, J. P. (2014). A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid

- tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.00694-14>
- Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), 1584–1590. <https://doi.org/10.1128/aac.43.7.1584>
- Lee, T. D., Adie, K., McNabb, A., Purych, D., Mannan, K., Azana, R., Ng, C., Tang, P., & Hoang, L. M. N. (2015). Rapid detection of KPC, NDM, and OXA-48-like carbapenemases by real-time PCR from rectal swab surveillance samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.01237-15>
- Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(S4). [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70168-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5)
- Mathers, A. J., Carroll, J., Sifri, C. D., & Hazen, K. C. (2013). Modified hodge test versus indirect carbapenemase test: Prospective evaluation of a phenotypic assay for detection of klebsiella pneumoniae carbapenemase (kpc) in enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.03240-12>
- Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P. A., Motyl, M. R., Adams, M. D., Chen, L., Kreiswirth, B., & Pitout, J. D. D. (2017). Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2249–2258. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>
- Matsumura, Y., & Pitout, J. D. (2016). Recent advances in the laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1172964>
- McConville, T. H., Sullivan, S. B., Gomez-Simmonds, A., Whittier, S., & Uhlemann, A. C. (2017). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186195>
- Monteiro, J., Widen, R. H., Pignatari, A. C. C., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4). <https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
- Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J., Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V., Wang, H., ... Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae*

- carbapenemases. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 13, Issue 9). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
- Naas, T., Vandell, L., Sougakoff, W., Livermore, D. M., & Nordmann, P. (1994). Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6), 1262–1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.6.1262>
- Nordmann, P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. In *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 44, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.11.007>
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., & Nicolas, M. H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 939–946. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.939>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 20, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
- Nordmann, Patrice, Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10). <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
- Nordmann, Patrice, & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
- Novais, Â., Brilhante, M., Pires, J., & Peixe, L. (2015). Evaluation of the recently launched rapid carb blue kit for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1128/JCM.01170-15>
- Oviaño, M., Barba, M. J., Fernández, B., Ortega, A., Aracil, B., Oteo, J., Campos, J., & Bou, G. (2016). Rapid Detection of OXA-48-Producing Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 754–759. <https://doi.org/10.1128/JCM.02496-15>
- Papagiannitsis, C. C., Študentová, V., Izdebski, R., Oikonomou, O., Pfeifer, Y., Petinaki, E., & Hrabáka, J. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.03094-14>
- Pierce, V. M., Simner, P. J., Lonsway, D. R., Roe-Carpenter, D. E., Johnson, J. K., Brasso, W. B., Bobenchik, A. M., Lockett, Z. C., Charnot-Katsikas, A., Ferraro, M. J., Thomson, R. B., Jenkins, S. G., Limbago, B. M., & Das, S. (2017). Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae. *Journal of Clinical*

Microbiology, 55(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.00193-17>

- Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4281–4283. <https://doi.org/10.1128/JCM.01634-13>
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A., & Matsumura, Y. (2020). The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G., & Nordmann, P. (2001). GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2598–2603. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2598-2603.2001>
- Poirel, Laurent, Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 622–632. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.622-632.2000>
- Poirel, Laurent, Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., & Nordmann, P. (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), 891–897. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.891-897.2000>
- Rasmussen, B. A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O’Gara, C., & Medeiros, A. A. (1996). Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class a carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(9), 2080–2086. <https://doi.org/10.1128/aac.40.9.2080>
- Rimoldi, S. G., Gentile, B., Pagani, C., Di Gregorio, A., Anselmo, A., Palozzi, A. M., Fortunato, A., Pittiglio, V., Ridolfo, A. L., Gismondo, M. R., Rizzardini, G., & Lista, F. (2017). Whole genome sequencing for the molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the Italian ASST Fatebenefratelli Sacco Hospital, 2012-2014. *BMC Infectious Diseases*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2760-7>
- Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. In *Annals of Intensive Care* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
- Safdar, N., & Maki, D. G. (2002). The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 136, Issue 11). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-136-11-200206040-00013>

- Saleh, A., Göttig, S., & Hamprecht, A. G. (2018). Multiplex immunochromatographic detection of OXA-48, KPC, and NDM carbapenemases: Impact of inoculum, antibiotics, and agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.00050-18>
- Schechner, V., Kotlovsky, T., Kazma, M., Mishali, H., Schwartz, D., Navon-Venezia, S., Schwaber, M. J., & Carmeli, Y. (2013). Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who is prone to become clinically infected? *Clinical Microbiology and Infection*, 19(5). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03888.x>
- Seale AC, Gordon NC, Islam J *et al.* (2017). AMR Surveillance in low and middle-income settings - A roadmap for participation in the Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS) [version 1; peer review: 3 approved]. *Wellcome Open Res* 2017, 2:92. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.12527.1>
- Siegel, Jane D. *et al.* (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *American Journal of Infection Control*, 35(10) S65 - S164 <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.10.007>.
- Smith, M., Diederer, B., Scharringa, J., Leversteijn-Van Hall, M., Fluit, A. C., & Stuart, J. C. (2016). Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in enterobacteriaceae with the cepheid xpert carba-R assay. *Journal of Medical Microbiology*, 65(9). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000310>
- Srisrattakarn, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamlá, P., Chaimanee, P., Daduang, J., & Chanawong, A. (2017). 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2295-5>
- Studentova, V., Papagiannitsis, C. C., Izdebski, R., Pfeifer, Y., Chudackova, E., Bergerova, T., Gniadkowski, M., & Hrabak, J. (2015). Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiologica*, 60(2). <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0349-8>
- Suay-García, B., & Pérez-Gracia, M. T. (2019). Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. In *Antibiotics* (Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>
- Tamma, P. D., Goodman, K. E., Harris, A. D., Tekle, T., Roberts, A., Taiwo, A., & Simner, P. J. (2017). Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 64(3). <https://doi.org/10.1093/cid/ciw741>
- Tamma, P. D., Opene, B. N. A., Gluck, A., Chambers, K. K., Carroll, K. C., & Simner,

- P. J. (2017). Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.02338-16>
- Tamma, P. D., & Simner, P. J. (2018). Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 56, Issue 11). <https://doi.org/10.1128/JCM.01140-18>
- Tarumoto, N., Kodana, M., Watanabe, N., Sakai, J., Imai, K., Yamaguchi, T., Taji, Y., Ebihara, Y., Murakami, T., Maeda, T., Mitsutake, K., & Maesaki, S. (2018). First report of the isolation of bla_{IMI-1}-producing colistin-heteroresistant *Enterobacter cloacae* in Japan, September 2016. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(11), 941–943. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.04.004>
- Temkin, E., Adler, A., Lerner, A., & Carmeli, Y. (2014). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Biology, epidemiology, and management. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323(1). <https://doi.org/10.1111/nyas.12537>
- Tenover, F. C., Kalsi, R. K., Williams, P. P., Carey, R. B., Stocker, S., Lonsway, D., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., McGowan, J. E., & Hanna, B. (2006). Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8). <https://doi.org/10.3201/eid1208.060291>
- Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2013). Evaluation of the carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00878-13>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tsakris, A., Poulou, A., Bogaerts, P., Dimitroulia, E., Pournaras, S., & Glupczynski, Y. (2015). Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.03318-14>
- Ulyashova, M. M., Khalilova, Y. I., Rubtsova, M. Y., Edelstein, M. V, Alexandrova, I. A., & Egorov, A. M. (2010). Oligonucleotide Microarray for the Identification of Carbapenemase Genes of Molecular Classes A, B, and D. *Acta Naturae*, 2(3). <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-3-101-109>
- Van der Zee, A., Roorda, L., Bosman, G., Fluit, A. C., Hermans, M., Smits, P. H. M., van der Zanden, A. G. M., te Witt, R., Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Cohen Stuart, J., & Ossewaarde, J. M. (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-27>

- Van Der Zwaluw, K., De Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., De Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). 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*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123690>
- Van Dijk, K., Voets, G. M., Scharringa, J., Voskuil, S., Fluit, A. C., Rottier, W. C., Leverstein-Van Hall, M. A., & Cohen Stuart, J. W. T. (2014). A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(4). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12322>
- Vasoo, S., Cunningham, S. A., Kohner, P. C., Simner, P. J., Mandrekar, J. N., Lolans, K., Hayden, M. K., & Patel, R. (2013). Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the carba NP test, with the modified hodge test for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00965-13>
- Vogne, C., Prod'hom, G., Jaton, K., Decosterd, L. A., & Greub, G. (2014). A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram-negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: Validation with triple quadrupole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(12), O1106–O1112. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12715>
- Wachino, B. (2005). *Nomenclature of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases*. *49*(5), 2148–2150. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2148>
- Walsh, T. R., Bolmström, A., Qwärnström, A., & Gales, A. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(8), 2755–2759. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2755-2759.2002>
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(3), 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. In *Microbe Magazine* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.1128/microbe.10.354.1>
- WHO. (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2019). Implementation manual to prevent and control the spread of carbapenem-resistant organisms at the national and health care facility level. (WHO/UHC/SDS/2019.6). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. (2020). Antibiotic Resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

- Wilkinson, K. M., Winstanley, T. G., Lanyon, C., Cummings, S. P., Raza, M. W., & Perry, J. D. (2012). Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.01613-12>
- Woodford, N., Tierno, P. M., Young, K., Tysall, L., Palepou, M. F. I., Ward, E., Painter, R. E., Suber, D. F., Shungu, D., Silver, L. L., Inglima, K., Kornblum, J., & Livermore, D. M. (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(12), 4793–4799. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004>
- Yang, Y., Rasmussen, B. A., & Bush, K. (1992). Biochemical characterization of the metallo- β -lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *36*(5), 1155–1157. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.5.1155>
- Yang, Y., Wu, P., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(5), 755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- Yigit, Hesna, Queenan, A. M., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., Domenech-Sanchez, A., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2003). Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(12), 3881–3889. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3881-3889.2003>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Youn, J. H., Drake, S. K., Weingarten, R. A., Frank, K. M., Dekker, J. P., & Lau, A. F. (2016). Clinical performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for detection of certain bla KPC - containing plasmids. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1128/JCM.01643-15>
- Yu J, Liu J, Li Y, Yu J, Zhu W, Liu Y, Shen L. (2018). Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 17(1):22. doi: 10.1186/s12941-018-0274-9. PMID: 29776363; PMCID: PMC5960105.

Anexos

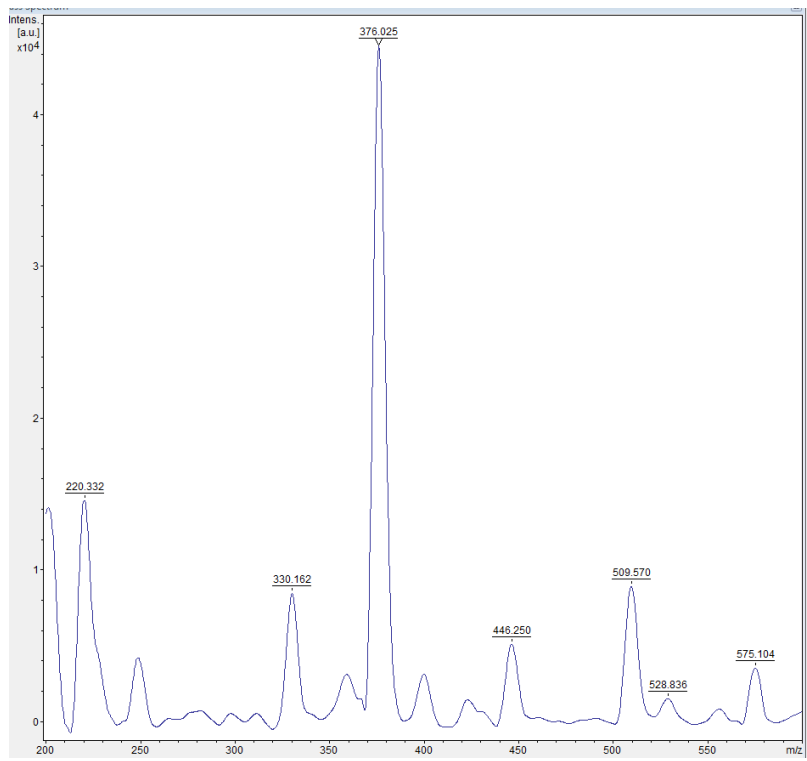


Fig. 2. Espectro de la matrix.

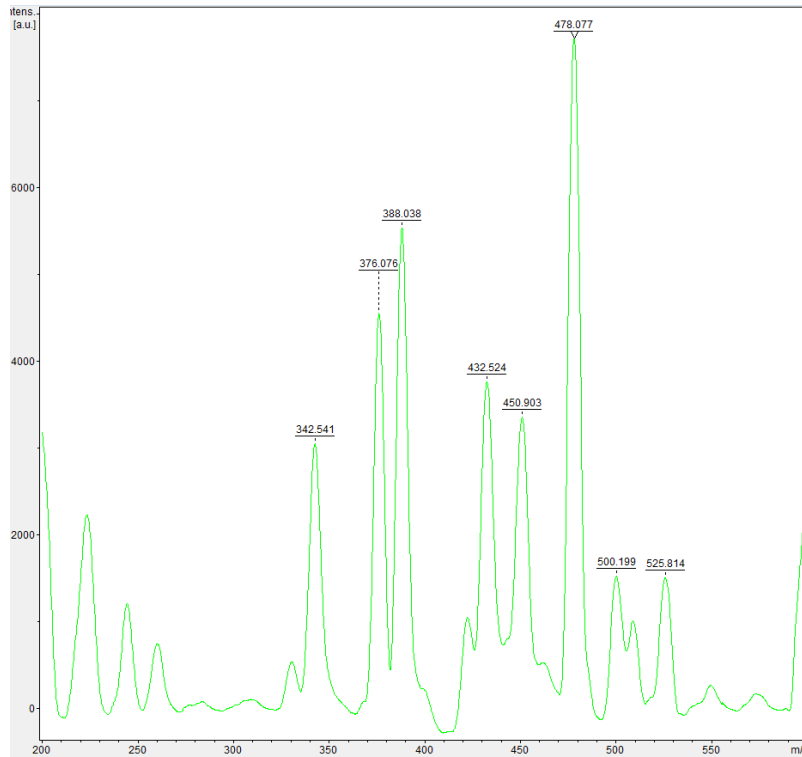


Fig. 3. Espectro de la matrix y ertapenem.

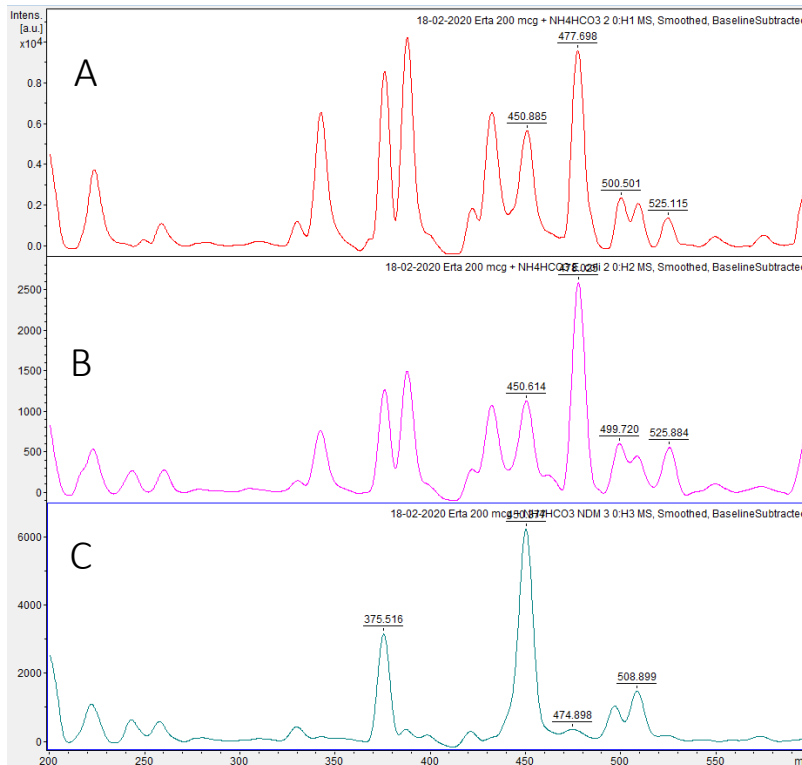


Fig. 4. Comparación de distintos tipos de espectros después del tiempo de incubación. A, ertapenem puro. B, ertapenem puro + *E. coli* ATCC 25922 (CN). C, ertapenem puro + *E. cloacae* ATCC BAA-2468™ (CP).

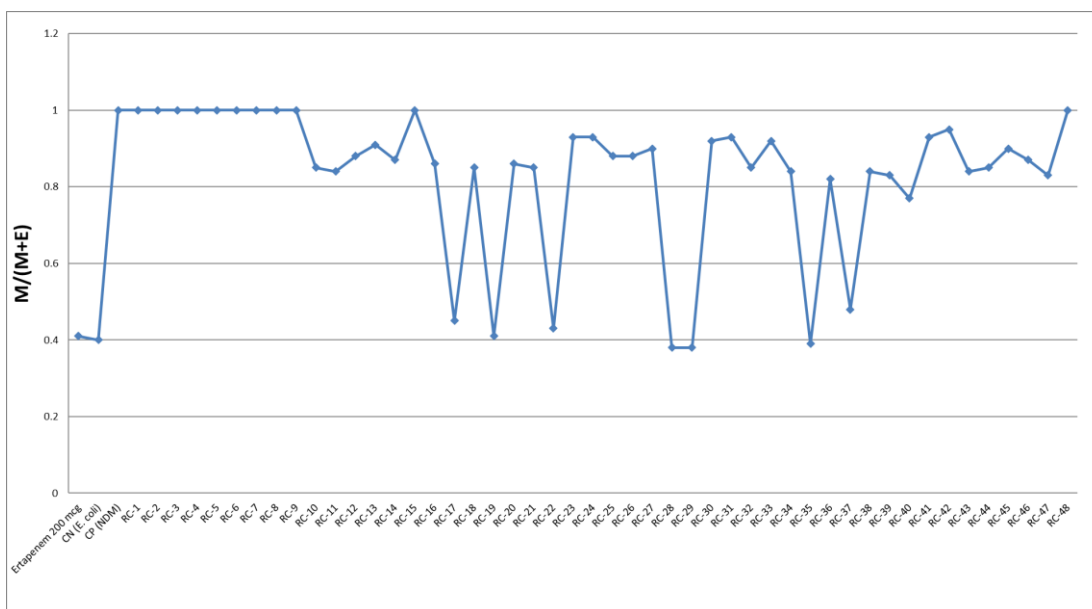


Fig. 5. Relación del índice de hidrólisis (M/[M+E]) de las cepas problema y controles.

TABLA 1. Resumen de los datos del ensayo de hidrólisis de ertapenem			
Tipo de CPM	Tipo de bacterias (No aislados)	Ensayo MALDI-TOF/MS	
		N° de aislados detectados con un índice ≥ 0.82	N° de aislados detectados con un espectro sugestivo CPM
KPC	<i>K. pneumoniae</i> (8)	8	8
	<i>E. coli</i> (1)	1	1
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> (8)	5	7
	<i>K. oxytoca</i> (8)	8	8
	<i>E. coli</i> (17)	14	14
	<i>C. freundii</i> (2)	2	2
	<i>R. ornithinolytica</i> (1)	1	1
GES	<i>E. coli</i> (3)	1	1
Total	48	40	42

TABLA 2. Resultados de pruebas de susceptibilidad a ertapenem a por difusión en disco de las cepas problema.

Tipo de CPMs	No de Cepas	Susceptibilidad a ertapenem		
		R	I	S
KPC	9	9		
OXA-48	36	33	1	2
GES	3	3		