

## **Detección de carbapenemasas en bacilos gram negativos aislados de hemocultivos. Comparación de métodos e impacto en el cambio terapéutico.**

Maglione Guillermina<sup>1a</sup>; Soloaga Rolando<sup>2a</sup>; Carrion Natalia<sup>3a</sup>; Diez Adriana<sup>4a</sup>; Salinas Andrea<sup>5a</sup>; Ratti Serafina<sup>6a</sup>; Eluchans Manuel<sup>7a</sup>; Margari Alejanda<sup>8b</sup>; Pidone Juan<sup>9a</sup>

- a. Servicio de Microbiología del Hospital Naval "Pedro Mallo", Buenos Aires, Argentina.
  - b. Servicio de Infectología del Hospital Naval "Pedro Mallo", Buenos Aires, Argentina.
1. Bioquímica
  2. Doctor en Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
  3. Bioquímica, Especialista en Microbiología Clínica, Pontificia Universidad Católica Argentina
  4. Bioquímica, Especialista en Microbiología Clínica, Pontificia Universidad Católica Argentina
  5. Bioquímica
  6. Bioquímica
  7. Bioquímico
  8. Médica Infectóloga
  9. Bioquímico, Especialista en Microbiología Clínica, Pontificia Universidad Católica Argentina

### **RESUMEN**

El tratamiento inicial inadecuado de los pacientes con bacteriemia debida a bacilos gram negativos productores de carbapenemasa se asocia con alta mortalidad. Los objetivos de este trabajo fueron comparar métodos para determinar carbapenemasas en bacilos gram negativos aislados de hemocultivos y determinar el impacto en el cambio del tratamiento antimicrobiano.

Se analizaron 119 episodios correspondientes a 105 pacientes y se obtuvieron 133 aislamientos, 31 de ellos productores de carbapenemasas (19 KPC, 8 MBL y 4 OXAs). La sensibilidad y especificidad para la detección de KPC fue del 100% con FilmArray y con la sinergia con discos de ácido borónico; los correspondientes valores para detección de metaloenzimas con la sinergia con EDTA fueron del 86,7% y 100% respectivamente. La sensibilidad y especificidad para todas las carbapenemasas fueron para Carba-Blue 86,7% y 100% y para NG-Carba-5 de 100% y 100% respectivamente. RESIST-3 OOK-test detectó todas las KPC y las OXAs (S:100% E:100%)

El informe bacteriológico rápido generó un cambio terapéutico en el 51,3% (n=61) de los pacientes infectados con estas cepas. La detección rápida, sensible y específica de carbapenemasas por los diferentes métodos permitió adecuar la terapia antimicrobiana de los pacientes con bacteriemia por cepas productoras de carbapenemasas.

**Palabras clave:** bacteriemia; bacilos gram negativos; carbapenemasas; detección.

## **SUMMARY**

Inadequate initial treatment of patients with bacteraemia due to gram-negative carbapenemase-producing bacilli is associated with high mortality. The objectives of this work were the comparison of methods to determine carbapenemases in gram negative bacilli isolated from blood cultures and to determine the impact on the change of antimicrobial treatment.

119 episodes corresponding to 105 patients were analyzed and 133 isolates were obtained, 31 of them producing carbapenemases (19 KPC, 8 MBL and 4 OXAs). The sensitivity and specificity for the detection of KPC was 100% with FilmArray and with the synergy with boronic acid discs; the corresponding values for metalloenzyme detection with synergy with EDTA were 86.7% and 100% respectively. The sensitivity and specificity for all carbapenemases were 86.7% and 100% for Carba-Blue and 100% and 100% for NG-Carba-5 respectively. RESIST-3 OOK-test detected all KPCs and OXAs (S: 100% E: 100%)

The rapid bacteriological report generated a therapeutic change in 51.3% (n = 61) of the patients infected with these strains. The rapid, sensitive and specific detection of carbapenemases by the different methods made it possible to adapt the antimicrobial therapy of patients with bacteremia caused by carbapenemase-producing strains.

**Keywords:** bacteremia; gram negative bacilli; carbapenemases; detection.

## **RESUMO**

O tratamento inicial inadequado de pacientes com bacteriemia por bacilos gram-negativos produtores de carbapenemase está associado a alta mortalidade. Os objetivos deste trabalho foram comparar métodos de determinação de carbapenemases em bacilos gram negativos isolados de hemoculturas e determinar o impacto na mudança de tratamento antimicrobiano.

Foram analisados 119 episódios correspondentes a 105 pacientes e obtidos 133 isolados, 31 deles produzindo carbapenemases (19 KPC, 8 MBL e 4 OXAs). A sensibilidade e especificidade para detecção de KPC foi de 100% com FilmArray e com a sinergia com discos de ácido borônico; os valores correspondentes para detecção de metaloenzima com sinergia com EDTA foram 86,7% e 100%, respectivamente. A sensibilidade e especificidade para todas as carbapenemases foram 86,7% e 100% para Carba-Blue e 100% e 100% para NG-Carba-5, respectivamente. O teste RESIST-3 OOK detectou todos os KPCs e OXAs (S: 100% E: 100%)

O rápido laudo bacteriológico gerou uma mudança terapêutica em 51,3% (n = 61) dos pacientes infectados por essas cepas. A detecção rápida, sensível e específica das carbapenemases pelos diferentes métodos possibilitou a adaptação da terapia antimicrobiana de pacientes com bacteremia por cepas produtoras de carbapenemases.

**Palavras-chave:** bacteremia; bacilos gram negativos; carbapenemases; detecção.

## Introducción

La mortalidad asociada al tratamiento inadecuado de la bacteriemia y sepsis por bacilos gram negativos es significativamente más alta con respecto al tratamiento inicial adecuado (1, 2, 3); este problema es aún mucho más grave cuando se trata de cepas productoras de carbapenemasas donde es más probable que el tratamiento inicial sea incorrecto y donde algunos autores han demostrado que la mortalidad relacionada a esto es un factor independiente de mortalidad (4).

Acorde a Bush, K (5) las carbapenemasas pueden ser clasificadas en serino enzimas de clase A (incluyen a las de grupo 2f con distintas variantes de KPC, GES, NMC-A, IMI, SME; inhibidas por ácido borónico y por avibactam) y clase D del grupo 2df (derivadas de OXA; inhibidas por avibactam) y por otro lado las metaloenzimas de clase B del grupo 3 (VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, etc; inhibidas por EDTA). El perfil de sustratos inactivados también varía acorde a la enzima y la cepa considerada, por ejemplo las metaloenzimas inactivan a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes pero no a aztreonam, las de tipo 2df a penicilinas y a carbapenemes pero menos eficientemente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y al igual que las anteriores no son inhibidas por ácido clavulánico y las de tipo 2f a penicilinas, aztreonam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación (excepto IMI, NMC-A, SME) y a carbapenemes, algunas de estas son inhibidas por ácido clavulánico (IMI, NMC-A, SME) y otras muy pobremente (KPC) (5).

Los métodos de detección de estas enzimas son variados e incluyen a la combinación de carbapenemes con inhibidores de carbapenemasas (ácido borónico, EDTA/ácido dipicolínico), colorimétricos basados en la hidrólisis del carbapenem (Carba NP, Carba Blue, Rapidec), mCIM y eCIM, métodos de Hodge y de Masuda y sus modificaciones, cromatográficos, medios de cultivo para cribaje, espectrometría de masa con tiempo de vuelo y métodos moleculares (PCR) (9-25). La sensibilidad y especificidad de los mismos es variable acorde al método, tipo de enzima y a la cepa considerada y en general las de tipo OXA son las más difíciles de detectar; la biología molecular se considera el método de referencia, sin embargo la sola detección del gen de resistencia no es suficiente porque los rangos de CIM son muy variables dependiendo de diversos factores como permeabilidad de la pared externa, eflujos, inóculo, cantidad de enzima producida (9-25).

## **Objetivos**

Los objetivos de este trabajo fueron: a) comparar los diferentes métodos (Carba Blue, sinergia con discos de ácido borónico y de EDTA, inmunocromatográficos y FilmArray) en la detección de carbapenemasas de bacilos gram negativos aislados a partir de hemocultivos b) Determinar el impacto en el cambio del tratamiento antibiótico, a partir del informe de laboratorio de la producción de carbapenemasas en bacilos gram negativos aislados desde hemocultivos.

## **Materiales y Métodos**

En el periodo comprendido entre marzo y diciembre del 2019, se analizaron todos los hemocultivos positivos con bacilos gram negativos y jerarquizados clínicamente de pacientes internados en el Hospital Naval Cirujano Mayor "Dr. Pedro Malló" de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Durante este período, se evaluaron 119 hemocultivos correspondientes a 105 pacientes y se aislaron 133 cepas de bacilos gram negativos. Se registraron los datos del paciente correspondientes a número de historia clínica, sexo, edad, origen, enfermedad de base, foco asociado, diagnóstico, tratamiento antibiótico previo y posterior al resultado informado por el laboratorio de bacteriología. Para el análisis del impacto en el cambio terapéutico, luego de conocer los resultados del laboratorio de bacteriología y con respecto a la presencia o no de carbapenemasas, se evaluaron tres condiciones: 1) con cambio en antibioticoterapia 2) sin cambio y 3) fallecido antes del cambio de tratamiento.

El 40% (n=42) de los pacientes incluidos fue de sexo femenino con una mediana en edad de 68 años y el 60% (n=63) de sexo masculino con una mediana de 69 años, el rango etario fue de 31-101 años para ambos sexos.

La mayoría de los pacientes presentó una o más comorbilidades que incluyeron neoplasias (n:48), cirugía (n:35), insuficiencia renal aguda o crónica (28), insuficiencia cardíaca (n:21), diabetes (n:20), hipertensión arterial (n:17), accidente cerebrovascular (n:16), neutropenia (n:15), cuadriplejía (n:13), insuficiencia respiratoria (n:12), insuficiencia hepática (n:8), alcoholismo (n:4), tabaquismo (n:4), VIH (n:4), desnutrición/anemia (n:3), obesidad (n:2), otras (n:5).

Las cepas de bacilos gram negativos estudiadas incluyeron a *Escherichia coli* (n=50), *Klebsiella pneumoniae* (n=34), *Pseudomonas aeruginosa* (n=11), *Proteus mirabilis* (n=7), *Acinetobacter baumannii* (n=7), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Morganella morganii* (n=3), *Klebsiella oxytoca* (n=3), *Klebsiella aerogenes* (n=2), *Acinetobacter ursingii* (n=2), *Serratia marscecens* (n=1), *Proteus vulgaris* (n=1), *Pseudomonas putida* (n=1), *Pseudomonas stutzeri* (n=1), *Pseudomonas fluorescens* (n=1), *Acinetobacter pittii* (n=1), *Acinetobacter junii* (n=1), *Acinetobacter* spp (n=1). Del total de episodios, 84% (n:100) fueron monomicrobianos y 16% (n:19) polimicrobianos.

Se utilizó el sistema Bact-Alert (Biomerieux, Marcy, Francia) de hemocultivos, los cuales se incubaron por 5 días. La identificación final fue realizada por medio de MaldiToF (Bruker Daltonics) y la sensibilidad final a partir de colonias aisladas por medio de Vitek 2 (Biomerieux, Marcy, Francia).

Al obtenerse un hemocultivo positivo, en primera instancia se realizaba coloración de Gram y se informaba inmediatamente al Servicio de Infectología, registrando los datos del receptor de la información y asentando, horario, nombre del paciente y numero de hemocultivos positivos con su respectivo resultado, también se consultaba el estado del paciente y antibioticoterapia actual y eventual cambio acorde al informe.

Luego los hemocultivos se subcultivaban en agar sangre, agar chocolate, agar CLDE, y agar cromogenico CPS (Biomerieux, Marcy, Francia), también se le realizaba la técnica de PCR múltiple de FilmArray (BioFire, Salt Lake City, EEUU) utilizando el panel de sepsis BCID y además se extraía del frasco de hemocultivo 6 ml de caldo, que se colocaron en un tubo separador de suero (Beckton Dickinson) al cual se lo centrifugó a 2000 rpm por 10 min para realizar desde el sedimento, el antibiograma y la identificación a través del sistema automatizado Vitek 2C (Biomerieux, Marcy, Francia). A las 24 h de incubación de las placas de cultivo a 35°± 2°C se realizó la identificación microbiana con la técnica proteómica de MaldiToF a partir de las colonias aisladas. Posteriormente se le aplicó un protocolo de tres métodos de detección de carbapenemasas que incluyeron el método colorimétrico (Carba Blue), método cromatográfico con dos equipos RESIST-3 O.O.K K.SeT (Coris BioConcept, Bélgica) y TEST NG CARBA5 (NG Biotech, Guipry, Francia) y test de sinergia entre carbapenemes y discos de EDTA y ácido bórico (para aquellos microorganismos productores de AMP-C se agregó además el método

de comparación de tabletas de carbapenemes con cloxacilina). RESIST-3 O.O.K K.SeT (Coris BioConcept, Bélgica) se ensayó sobre 50 cepas, TEST NG CARBA5 (NG Biotech, Guipry, Francia) sobre 82, FilmArray sobre 126, Carba Blue sobre 130 y la sinergia con ácido borónico y con EDTA en 131 cepas.

Para los métodos de FilmArray y cromatográficos (RESIST-3 O-O.K K.SeT, NG Carba5), se siguieron las instrucciones de los respectivos fabricantes con un tiempo para obtener resultados de 1 h a partir del hemocultivo positivo con el primero y de un máximo de 15 min a partir de colonias aisladas con los cromatográficos; para la técnica de Carba Blue se siguieron las recomendaciones acorde a la publicación de Pasteran y col, para ello se trabajó desde las colonias aisladas y la lectura final se realizó a las 2 h (10).

En el caso de sinergia entre carbapenemes y discos de inhibidores se utilizó un disco de 10 ug de imipenem y otro de 10 ug de meropenem y se observó la sinergia o no de cada uno de ellos con discos de ácido borónico de 300 ug y EDTA (en todos los casos de Laboratorios Britania, Argentina) colocados a 1,5 mm de borde a borde, esta distancia se varió dependiendo de los halos de inhibición y de si el resultado era claro o no. Para las cepas productoras de AMP-C se agregó la sinergia con cloxacilina para evitar falsos positivos con el disco de ácido borónico; para ello se comparó las zonas de inhibición producidas por tabletas de meropenem (10 ug) vs tabletas con meropenem (10 ug) + cloxacilina (750 ug) (todos de Rosco Diagnostica, Dinamarca) y se consideró positivo (presencia de carbapenemasa) un incremento < 5 mm a favor del disco con el inhibidor de cefalosporinasa y sinergia positiva con ácido borónico.

El sistema FilmArray (Biofire, Salt Lake City, EEUU) incluye en su base de datos la detección de KPC pero no de otras carbapenemasas. RESIST-3 O-O.K K.set (Coris BioConcept, Bélgica) detecta KPC y los grupos de enzimas OXA-48 y OXA-163 (OXA-163, OXA-247, OXA-405, OXA-438), en tanto que el test NG Carba5 (NG Biotech, Guipry, Francia) hace lo propio con las enzimas NDM (NDM-1 -4 -5 -6 -7 -9), KPC (KPC-2 -3), IMP (IMP-1 -8 -11), VIM (VIM-1 -2 -4 -19) OXA-48-like (OXA-48 -162 -181 -204 -232 -244 -517 -519 -535) y puede dar reactividad cruzada con beta-lactamasas de espectro extendido con débil actividad de carbapenemasa como OXA-163 y OXA-405. La sinergia entre carbapenemes y discos de ácido borónico se usó para identificar enzimas del grupo 2f y la correspondiente con discos de EDTA a las metaloenzimas.

Se calculó la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y negativo para cada método, como así también la correlación positiva y negativa entre técnicas; se consideró positivo cuando este resultado se obtenía por al menos un método. Para determinar si se produjo un cambio terapéutico significativo o no frente a la detección de carbapenemasas se calculó  $\chi^2$ .

### **Criterios de exclusión**

No se incluyeron en el estudio hemocultivos de pacientes que a juicio clínico del servicio de Infectología no tuvieran un cuadro compatible con bacteriemia/sepsis o que ya hubieran fallecido y donde el resultado no cambiaría conducta terapéutica.

### **Aspectos éticos**

El Comité de Docencia, Ética e Investigación del Hospital Naval "Cirujano Mayor Pedro Mallo" aprobó este proyecto.

Todos los exámenes realizados forman parte de la rutina del laboratorio de Microbiología por lo que no fue necesario pedir autorización a los pacientes.

### **Resultados**

Se detectaron 31 cepas productoras de carbapenemasas en 25 episodios de bacteriemia, 19 (61,2%) correspondieron a KPC, 8 (25,8%) a metaloenzimas y 4 (12,9%) a enzimas del tipo OXA. Las enzimas de tipo KPC se detectaron en 15 cepas de *K.pneumoniae*, 2 de *E.coli* y 2 de *E.cloacae*; las metaloenzimas se encontraron en 3 cepas de *A.baumannii*, 3 *K.pneumoniae* y 2 *E.cloacae* y las OXA en 2 *K.pneumoniae*, 1 *E.coli* y 1 *P.mirabilis*. Las enzimas de tipo OXA correspondieron a 3 OXA-163 y 1 OXA-48. De las metaloenzimas, se caracterizaron a 4/8 como NDM por medio de NG Carba 5 y el resto no pudo ser identificada por carecer en ese momento de este equipo.

Con respecto a la detección de KPC, FilmArray (BioFire, Salt Lake City, EEUU) detectó a las 19 cepas productoras de la misma y no se observaron falsos positivos sobre 107 cepas no productoras (100% de sensibilidad, de especificidad y de valor predictivo positivo y negativo).

NG Carba5 detectó a todas las cepas productoras de KPC, metaloenzimas y OXA (19/19), sin falsos positivos (0/63). La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo fue del 100% para todas ellas.

RESIST-3 O-O.K K.Set (Coris BioConcept, Bélgica) detectó a todas (8/8) las enzimas de tipo KPC y OXAs ensayadas por este método sin observarse falsos positivos (0/38), con 100% de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y negativo para estas enzimas.

Carba Blue detectó 26/30 cepas productoras de carbapenemasas (sensibilidad: 86,7%, especificidad:100%), en una cepa no se pudo realizar el mismo; las 4 cepas no detectadas correspondieron a enzimas del tipo OXA (3 OXA-163 y 1 OXA-48); la sinergia con discos ácido borónico detectó todas las enzimas de tipo KPC (19/19) sin falsos positivos (0/100), con sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo del 100% para dicha enzima; la sinergia con EDTA detectó 7 de las 8 metaloenzimas (fallo con 1 NDM detectada por NG Carba 5) con sensibilidad del 87,5% y especificidad del 100% para este mecanismo de resistencia.

En la tabla 1, se muestra la comparación de los distintos métodos.

Tabla 1. Comparación de distintos métodos de detección de carbapenemasas.

Método	KPC		Metaloenzima		OXA	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Film-Array	100	100	ND	ND	ND	ND
Carba Blue	100	100	100	100	0	0
EDTA	ND	ND	87,5	100	ND	ND
RESIST-3 O-O.K K.Set	100	100	ND	ND	100	100
NG Carba 5	100	100	100	100	100	100

ND: No determinado

La correlación positiva y negativa en la detección de KPC entre los distintos métodos fue del 100%. La correlación positiva y negativa con respecto a metaloenzimas fue del 100% considerando Carba Blue y NG Carba 5, en tanto que la sinergia con discos de EDTA mostro una correlación positiva del 100% pero negativa del 87,5% con respecto a estas dos técnicas. Con las enzimas del tipo OXA la correlación positiva y negativa entre los dos métodos cromatográficos fue del 100% así como la correlación positiva de estos con Carba Blue, sin embargo la correlación negativa de este último con los dos primeros fue del 0%.

A partir del informe del laboratorio de Microbiología se observaron 51,3% (n= 61) de cambios terapéuticos. El 42,0% (n= 50) continuaron sin cambios en la terapia antibiótica y el 6,7%(n=8) fallecieron antes del cambio de conducta o del informe del laboratorio. Se produjeron más cambios terapéuticos en 68% (17/25) de los pacientes infectados con carbapenemasas que en aquéllos donde no se las detectó (46,8%, 44/94,  $p<0,05$ ). En el primer grupo de pacientes también se observó escalamiento a un esquema antimicrobiano de mayor espectro en 100% (17/17) en comparación a 86,36% (38/44) del segundo grupo ( $p<0,05$ ). Por otro lado, el desescalamiento fue más probable en el segundo grupo (13,63%; 6/44) que en el primero con 0% (0/17) ( $p<0,05$ )

### **Discusión y conclusiones**

Los carbapenemes han sido considerados por muchos años la opción para el tratamiento de cepas de bacilos gram negativos multi-resistentes, sin embargo la emergencia de carbapenemasas ha reducido significativamente su utilidad en algunos lugares. Un meta-análisis de 22 estudios de Martin y col (4) incluyó 12 publicaciones donde se comparaba la mortalidad de las infecciones graves por enterobacterias productoras y no productoras de carbapenemasas y demostró que la presencia de este mecanismo de resistencia así como la monoterapia en el tratamiento de las mismas eran factores independientes de mortalidad (OR: 3,38 e IC95%: 2,35-4,89 y OR: 2,19 e IC95% 1-4,80), por otra parte 6 de estos estudios se refirieron solo a bacteriemia y las conclusiones fueron similares (OR, 3.65; 95% CI, 2.11–6.30). Este trabajo demostró que el retraso en instaurar un tratamiento adecuado también incrementaba la mortalidad tuviera la cepa carbapenemasa o no.

Estos datos son coincidentes con los publicados previamente por otros autores (26,27,28,29), lo que lleva a la necesidad de tratamiento combinado que incluya un carbapenem (en infusión prolongada a dosis máxima) y en tratamiento combinado, en muchos casos con antibióticos tóxicos como colistin y actualmente también podría considerarse nuevos antibióticos como ceftazidima-avibactama (a menos que se trate de una metaloenzima) a un costo elevado (30).

Acorde a nuestros datos, el resultado de la detección de carbapenemasas llevó a un cambio terapéutico significativo, particularmente en lo que hace a ampliar el espectro antibiótico pero también frente a un resultado negativo a reducir el mismo.

Todo esto demuestra la imperiosa necesidad de contar con resultados confiables y rápidos a partir de los hemocultivos positivos y de su comunicación inmediata para optimizar el tratamiento antimicrobiano no solo para ampliar el espectro antibacteriano sino también eventualmente para reducir el mismo y disminuir costos, toxicidad y presión de selección de cepas resistentes.

Los métodos colorimétricos caseros (Carba NP, Carba Blue) o comerciales (Rapidec) para detección de estas enzimas se basan en la hidrólisis de los carbapenemes y en el cambio de pH generado por el mismo y detectado por un indicador como rojo fenol o azul de bromo timol; la sensibilidad se encuentra en el orden del 85-100% y la especificidad en 91-100%, la mayoría de los falsos negativos se relacionan con enzimas tipo OXA (6,7,8,9,10). La técnica de Carba Blue es una variante del método original propuesto por Nordmann y Poirel (6) que utiliza azul de bromo timol como indicador en lugar de rojo fenol; Pires J y col (14) compararon la sensibilidad y especificidad de los test colorimétricos Carba NP que utiliza rojo de fenol como indicador y el test Carba-Blue, para ello incluyeron 30 cepas productoras de carbapenemasas y 33 enterobacterias no productoras de carbapenemasas. Las pruebas fueron leídas por tres operadores, y se informó una sensibilidad del 100% para ambas pruebas, pero Carba -NP fue ligeramente más específico que Carba-Blue (98,9% vs. 91,7%). Se requirieron diferentes tiempos para observar un resultado positivo para diferentes tipos de carbapenemasas (ej: KPC o MBL en los primeros 30 min, enzimas de tipo OXA entre 1,30 h a 2 h). Garcia-Fernández S y col. (15) también compararon las pruebas de Carba NP y Carba-Blue en enterobacterias productoras de carbapenemasas de origen hospitalario (n = 102) y ambiental (n = 57). Ambos métodos demostraron ser rápidos y rentables, con alta sensibilidad (98% a 100%) y especificidad (100%), y pueden introducirse

fácilmente en el laboratorio de rutina. Carba-Blue detectó el 100% de las enzimas KPC, VIM y NDM y el 94% de las enzimas OXA-48. Finalmente, Pasteran y col (10) analizaron 300 cepas de bacilos gram negativos (182 productores de carbapenemasas y 112 no productores) y hallaron una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100%; nuevamente los problemas se presentaron con enzimas del tipo OXA-48 y principalmente con OXA-163.

Nuestros datos son coincidentes con los publicados en la literatura con 100% de sensibilidad y de especificidad en la detección de enzimas del tipo KPC y NDM pero al igual que otros autores encontramos serias limitaciones con las de tipo OXA especialmente con OXA-163 que es más bien una beta lactamasa de espectro extendido con pobre actividad de carbapenemasa. Si bien no diferencia los distintos tipos de carbapenemasas, la ventaja de estas técnicas radica en que los resultados están disponibles entre 30 min a 2 h de inoculadas y de esta forma permiten adoptar importantes decisiones terapéuticas desde el comienzo, por otro lado los métodos caseros como Carba Blue tienen un bajo costo lo que permite realizar el test a todos los bacilos gram negativos aislados de muestras relevantes.

Algunos autores como Salimnia y col (31), Fiori y col (32) y Banerjee y col (33) encontraron una sensibilidad y especificidad del 100% en la detección de KPC con el sistema de FilmArray, estos datos son equivalentes a los hallados en el presente trabajo aunque el número de cepas ensayado fue más alto que en esas publicaciones; si bien el panel BCID de FilmArray solo detecta KPC, los resultados están disponibles en 1 h y con un tiempo de preparación de la muestra de 2-3 min a partir del hemocultivo positivo lo que permite adecuar la terapia desde el comienzo; sin embargo solo 61,2% de nuestras cepas productoras de carbapenemasas correspondía a KPC. Actualmente se encuentra disponible el panel BCID2 que incluye además la identificación de enzimas del tipo VIM, IMP, NDM, OXA y otros genes de resistencia como *mcr-1* (resistencia plasmídica a colistin), *mecA/C* (meticilino resistencia en estafilococos) y *van A/B* (resistencia a glicopéptidos en enterococos). Aunque el costo de esta técnica es superior al de las otras, diversos autores demostraron que es costo-efectiva en términos de reducción en el uso de antimicrobianos de mayor espectro, de tiempo de internación y de estudios adicionales innecesarios (33, 34, 35, 36).

Pasteran, F y col (13) usaron el OXA-163/48 Duo K-SeT Test (Coris BioConcept) para la caracterización de cepas productoras de carbapenemasas del tipo KPC, OXA-48 y OXA-163. Este método se basa en la captura inmunológica con anticuerpos monoclonales de dos epitopes específicos de las variantes OXA-48 (OXA-48, OXA 204, OXA-232 y OXA-244) y OXA-163 y para ello usa nanopartículas de oro coloidal ligadas a una membrana dentro de un dispositivo de flujo lateral. Originalmente el test OXA-48 K-SeT Test (Coris BioConcept) estaba orientado solo a KPC y a OXA-48 y sus variantes pero recientemente han emergido nuevas variantes alélicas como OXA-163 y sus variantes relacionadas OXA-247, OXA-405, y OXA-438, las cuales no son detectadas por el kit original pero si por el Duo; los resultados se leen a los 15 min. Hallaron 100% de sensibilidad y de especificidad con resultados en menos de 10 min. Las enzimas OXA de espectro reducido de *Acinetobacter* spp daban resultado negativo como así también otros tipos de carbapenemasas (MBL y clase 2f), ESBL y AMPC. Finalmente, también demostraron su utilidad a partir de frascos de hemocultivos positivos para los cuales tomaron alícuotas de 0,1 ml que se colocaron en 10 gotas de LY-A buffer, y luego 3 gotas de la mezcla eran aplicadas al pocillo de la muestra; nuevamente la sensibilidad y especificidad para OXA-48 y OXA-163 fue del 100%. Excesos de inóculo pueden producir una doble banda en OXA-48 y 163. Una línea rojiza-púrpura en OXA-48 indica la presencia de esta o sus variantes, la misma línea solo en OXA-163 indica la presencia de esta o sus variantes y una línea rojiza-púrpura en OXA-48 y débil en OXA 163 se interpreta como OXA-48 o sus variantes.

Boutal H, y cols (37) desarrollaron y validaron un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de las cinco carbapenemasas principales (tipo KPC, NDM, VIM e IMP y tipo OXA-48) llamado Carba5, y lo evaluaron retrospectiva y prospectivamente utilizando 296 aislamientos de enterobacterias. Los 185 aislamientos que expresaban una carbapenemasa relacionada con uno de los objetivos Carba5 se detectaron correcta e inequívocamente en menos de 15 min. Todos los demás aislamientos dieron resultados negativos, excepto los que producen OXA-163 y OXA-405. No se observó reacción cruzada con beta-lactamasas de espectro extendido, AmpC u oxacilinasas (OXA-1, -2, -9 y -10); el ensayo alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95,3% (retrospectivamente) al 100% (prospectivamente). Potron A, y cols. (38) evaluaron el rendimiento del ensayo inmunocromatográfico NG-Test Carba 5 (NG-Biotech) para la detección de carbapenemasas en una colección de 107 bacilos gram negativos no

fermentadores. Todos los productores de carbapenemasas KPC, VIM y NDM enzimas similares a OXA48 evaluados fueron detectados con precisión. De las 16 variantes de IMP probadas, 6 (37,5%) no fueron detectadas. Cabe destacar que la versión del NG-Test Carba 5 que se comercializa desde 2019 incluye variantes IMP no incluidas previamente, lo que podrían ser útil para la detección de carbapenemasas en países donde los productores de IMP son más frecuentes. Takkisian J. y col (39) evaluaron la prueba de NG Carba 5 (NG Biotech), para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en hemocultivos (n = 205). Detectaron y discriminaron en menos de 30 minutos productores de KPC, IMP, VIM, NDM y OXA-48 con una sensibilidad y especificidad de 97,7% y 96,1%, respectivamente. Giordano L y col. (40) probaron directamente 484 organismos de hemocultivos positivos, de muestras clínicas (n=310) y simulados (n=174) con el ensayo NG-Test Carba 5; la sensibilidad y especificidad fue del 98,3% y 100%, respectivamente. Hopkins KL y col (41) evaluaron 197 aislamientos bacterianos caracterizados previamente, incluidos 177 productores confirmados de carbapenemasas y 20 aislamientos resistentes a carbapenemes pero carbapenemasas negativos; el NG-Test Carba5 identificó a todos los productores de KPC (n=30), tipo OXA-48 (n=31), NDM (n=31) y VIM (n=29) sin falsos positivos y se detectaron IMP en 12/17 aislamientos con estas enzimas con una sensibilidad global de 97,31% y especificidad de 99,75%. Todas estas publicaciones previas coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto al rendimiento y rapidez del resultado, sin embargo la cantidad de metaloenzimas en el mismo es muy baja por lo que no es posible establecer con certeza el rendimiento especialmente frente a cepas con enzimas del tipo IMP y lo mismo puede decirse con respecto a los productores de OXA.

Tsakris y cols (42) diseñaron un algoritmo fenotípico simple que emplea tres pruebas de disco combinadas que consisten en meropenem solo y con ácido fenilborónico (PBA) y con EDTA para la diferenciación de las enzimas KPC y MBL. El aumento de la zona de inhibición de  $\geq 5$  mm se consideró un resultado positivo de la prueba de disco combinado. Se examinaron un total de 141 aislados clínicos de enterobacterias positivos para carbapenemasas genotípicamente confirmadas (63 productores de KPC, 47 productores de MBL y 31 productores de KPC y MBL) con diversas CIMs a carbapenemes y a modo de comparación, también se analizaron 84 aislados clínicos de enterobacterias carbapenemasas negativas. El algoritmo fenotípico fue capaz de

diferenciar MBL de los productores de KPC, así como detectar la posible coproducción de ambas carbapenemasas. El método detectó todos los productores de KPC o MBL (sensibilidad 100%), así como a 30 de los productores de KPC y MBL (sensibilidad 96.8%). La especificidad para la detección de KPC fue del 98,8%. Giske y cols (43) determinaron si los discos de meropenem suplementados con cuatro inhibidores de  $\beta$ -lactamasa (ácido dipicolínico o DPA), EDTA, ácido aminofenilborónico (APBA) o cloxacilina) podrían discriminar entre varias enterobacterias productoras de carbapenemasas y aislados no susceptibles a carbapenemes con hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido y/o AmpC en combinación con impermeabilidad. Además, evaluaron el rendimiento de las tabletas de diagnóstico disponibles comercialmente que contienen meropenem en combinación con inhibidores. La sensibilidad de la prueba para la detección de KPC fue del 100%, y la especificidad fue del 98% si se incluía el criterio adicional de un resultado negativo de cloxacilina. Las tabletas comerciales (Laboratorios Rosco Diagnostica, Dinamarca) funcionaron casi tan bien como los discos suplementados para la detección de MBL y KPC con sensibilidad del 100% en ambos casos.

Acorde a nuestros datos la sinergia con ácido borónico detectó a todas las enzimas de tipo KPC (caracterizadas por los métodos cromatográficos) y no presentó falsos positivos posiblemente debido a la baja incidencia de este mecanismo en las cepas productoras de AMP-C incluidas en este trabajo. La sinergia con EDTA presentó 100% de especificidad pero falló con una cepa productora de NDM que fue detectada por NG Test Carba 5.

Las limitaciones de este estudio estuvieron referidas a la incapacidad de establecer a la mortalidad como un indicador, en parte debido a las dificultades en el seguimiento de los pacientes a 30 días y en parte a que la mortalidad se ve influenciada por gran variedad de factores que además de la sensibilidad de la cepa incluyen la demora en alcanzar una terapia óptima, presencia de shock, de comorbilidades en general y de enfermedades de base últimamente fatales en particular, del tipo de microorganismo asociado y del foco relacionado entre otros. También hay que mencionar que el número de cepas productoras de OXA o de metaloenzimas fue muy bajo por lo que es necesario confirmarlo con un mayor número de cepas. Finalmente, las enzimas del tipo OXA y las metaloenzimas no pudieron ser confirmadas en este trabajo por medio de un método molecular.

La correlación positiva y negativa así como el rendimiento en la detección de KPC entre los distintos métodos fue excelente así como la correlación positiva con respecto a metaloenzimas entre Carba Blue y NG Test Carba 5 pero la correlación negativa entre estas dos técnicas fue del 87,5% debido a la falla de la sinergia con EDTA en una cepa productora de NDM. Con las enzimas del tipo OXA los dos métodos cromatográficos presentaron también una excelente correlación negativa y positiva entre sí en tanto que Carba Blue no detectó ninguno de los casos aunque hay que tener en cuenta que el número de cepas con estas enzimas es bajo y por otro lado la mayoría correspondió a OXA-163 que es más bien una beta lactamasa de espectro extendido. La ventaja de FilmArray es que los resultados se obtienen en 1 h a partir del hemocultivo positivo y en este trabajo el resto de las técnicas se realizó a partir de las colonias aisladas en el subcultivo de 18-24 h de incubación; sin embargo los métodos cromatográficos podrían también realizarse directamente desde el frasco con resultados muy buenos (13). NG Test CARBA 5 (Biotech, France) presenta ventajas sobre Duo K-SeT test (Coris BioConcept) dado que detecta NDM, IMP, VIM, KPC, OXA pero a diferencia de este último no diferencia OXA-48 de OXA-163, ambos permiten obtener resultados en menos de 15 min.

Los resultados rápidos comunicados inmediatamente al Servicio de Infectología permitieron introducir cambios terapéuticos relevantes tanto en lo que hace al escalamiento en el espectro antibacteriano como en la reducción del mismo.

### **Referencias bibliográficas**

1. Zubert S; Funk DJ; Kumar A. Antibiotics in sepsis and septic shock: like everything else in life, timing is everything. *Crit Care Med* 2010, 38(4):1211-2.
2. Kumar A. Antimicrobial delay and outcome in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2014; 42(12):e802
3. Micek S; Welch E; Hhan J; Pervez M; Doherty J; Reichley R; Bauer J; Dunne W; Kollef M. Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with gram-negative bacteremia. *Journal of Hospital Medicine*. 2011, 7 : 405–410
4. Martin A; Fahrbach K; Zhao Q; Lodise T. Association between carbapenem resistance and mortality among adult, hospitalized patients with serious infections due to

- Enterobacteriaceae: results of a systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5(7):ofy 150
5. Bush, K. Past and Present Perspectives on B-Lactamases. *Antimicrob Ag Chemother* 2018; 62(10): e01076-18
  6. Nordman P; Poirel I; Dortet I. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1503-1507.
  7. Poirel L; Nordman P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 2015; 53(9):3003-8
  8. Hombach M; Gunten B; Castelberg C; Bloemberg G. Evaluation of the Rapid Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2015; 12:3828- 3833.
  9. Pasteran F; Tijet N; Melano R; Corso A. Simplified protocol for Carba NP Test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2015; 12:3908-3911.
  10. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, Gomez S, and Corso A. "Evaluation of the Blue-Carba Test for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol* 2015; 53(6): 1996–1998.
  11. Pasteran, F; Veliz, O; Rapoport, M; Guerriero, L; Corso, A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo beta lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12):4301-03.
  12. Pasteran, F; Lucero, C; Soloaga, R; Rapoport, M; Corso, A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011; 49:697-701.
  13. Pasteran, F; Denorme, L; Ote, I; Gomez, S; De Belder D; Glupczynski Y; Bogaerts P; Ghiglione B; Power P; Mertens P; Corso A . Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol* 2016; 54(11): 2832-2836.

14. Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51:4281–4283.
15. García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, et al. Detection of Carbapenemase Production in a Collection of Enterobacteriaceae with Characterized Resistance Mechanisms from Clinical and Environmental Origins by Use of Both Carba NP and Blue-Carba Tests. *J Clin Microbiol* 2016; 54 (2):464-466.
16. Hopkins KL; Meunier; Naas T; Volland H; Woodford N. Evaluation of the NG-Test. CARBA 5 multiple immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:3523–3526.
17. Takissian J; Bonnin RA; Naas T; Dortet L. NG-Test Carba 5 for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales from Positive Blood Cultures. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(5): e00011-19
18. Giordano L; Fiori B; D'Inzeo T; Parisi G; Liotti FM; Menchinelli G; De Angelis G; De Maio F; Luzzaro F; Sanguinetti M; Posteraro B; Spanu T. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NGTest Carba 5 Assay. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(7): e00550-19
19. 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. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrobial Chemother* 2018; 73:909–915.
20. Potron A; Fournier D; Emeraud C; Triponney P, Plésiat P, Naas T, Dortet L. . Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 for Rapid Identification of Carbapenemase in Nonfermenters. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(9): e00968-19
21. Hamprecht A; Vehreschild JJ; Seifert H; Saleh A. Rapid detection of NDM, KPC and OXA-48 carbapenemases directly from positive blood cultures using a new multiplex immunochromatographic assay. *PLoS One* 2018; 13: e0204157.

22. Sun K; Xu X; Yan J; Zhang L. Evaluation of Six Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria With Characterized Resistance Mechanisms. *Ann Lab Med.* 2017; 37(4):305-312.
23. Uwamino,Y; Sugita,K; Hasegawa,N; Nishimura,T; Fujiwara,H; Iwata,S. Laboratory and epidemiology communications rapid detection and typing of carbapenemase genes from carbapenem resistant Enterobacteriaceae isolates collected in a japanese hospital using the Xpert Carba-R assay. *Jpn Infect Dis* 2017; 70:124-125.
24. Cortegiani,A, Russotto,V, Graziano,G, Geraci,D; Saporito,L; cocorullo,G; raineri,S, Mammina,C; Giarratano,A. Use of Cepheid Xpert Carba-R for rapid detection of carbapenemase producing bacteria in abdominal septic patients admitted to intensive care unit. *Plos One* 2016; 11(8). 2016.
25. Burckhardt,I; Zimmermann,S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1-2,5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3321-3324.
26. Tumbarello M; Treccarichi EM; De Rosa FG; Giannella M; Giacobbe DR; Bassetti M; Losito AR; Bartoletti M; Del Bono V; Corcione S; Maiuro G; Tedeschi S; Celani L; Cardellino CS; Spanu T; Marchese A; Ambretti S; Cauda R; Viscoli C; Viale P; ISGRISITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva). Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(7):2133-43.
27. Tzuovelekis L; Markogiannakis A; Psychogiou A; Tassios P; Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:682-707.
28. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1798–803.
29. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Gudiol C, Martínez JA Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; Suppl 4:49-55.

30. Zhanel G; Lawson CD; Adam H; et.al.Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination. *Drugs*. 2013; 73(2):159-77.
31. Salimnia H; Fairfax M; Lephart P; Scheckenberger P; Desjarlais S; Johnson K; Robinson G; Carroll K; Greer A; Morgan M; Chan R; Loeffelholz M; Valencia-Shleton V; Jenkins S; Shuetz A; Daly J; Barney T; Hemmert A; Kanack K. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a multicenter controlled trial. *J Clin Microbiol* 2016, 54(3):687-698
32. Fiori,B; D Inzeo,T; Gianquinto,A; Machinelli,G; Liotti,F; de maio,F, De Angelis,G; Quaranta,G; Nagel,D; Tumbarello,M; Posteraro,B; Sanguinetti,M; Spanu,T. Optimized use of the Maldi BioTyper System and FilmArray BCID panel for the direct identification of microbial pathogens from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2016; 54:576-584.
33. Banerjee R; Teng C; Cunningham S; Ihdle S ; Steckelberg J ; Shah J ; Mandrekar J ; Patel R . Randomized trial of rapid multiplex polymerase chain reaction-based blood culture identification and susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 2015, 61(7):1071-80
34. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84: 159-64.
35. MacVane SH, Nolte FS. Benefits of adding a rapid PCR based blood culture identification panel to an established antimicrobial stewardship program. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 2.455-63.
36. Messacar K, Hurst A; Child J; Campbell K; Palmer C; Hamilton S; Dowell, E; Robinson, C; Parker, S; Dominguez, S. Clinical impact and provider acceptability of real-time antimicrobial stewardship decision support for rapid diagnostics in children with positive blood culture results. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2017; 6: 267-74.
37. 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.. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrobial Chemother* 2018; 73:909–915.

38. Potron A, Fournier D, Emeraud C, et al. Evaluation of the Immunochromatographic NG-Test Carba 5 for Rapid Identification of Carbapenemase in Nonfermenters. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(9) :e00968-19
39. Takissian J, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. NG-Test Carba 5 for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales from Positive Blood Cultures. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(5): e00011-19
40. Giordano L, Fiori B, D'Inzeo T, et al. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NGTest Carba 5 Assay. *Antimicrobial Agents Chemother* 2019; 63(7): e00550-19.
41. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiple immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:3523–3526.
42. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(8):1664-1671.
43. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(4):552-556.