



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

“USO DE LA PRUEBA NG CARBA 5 PARA LA DETECCIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS A PARTIR DE HEMOCULTIVOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA:

DRA. DIANA MUNGUÍA RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. BERNARDO ALFONSO MARTÍNEZ GUERRA

ASCESOR DE TESIS:

DR. LUIS ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO

PROFESOR TITULAR:

DR. GUILLERMO MIGUEL RUIZ PALACIOS Y SANTOS

CIUDAD DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DE ESPECIALIDAD EN MEDICINA (INFECTOLOGÍA):

“USO DE LA PRUEBA NG CARBA 5 PARA LA DETECCIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS A PARTIR DE HEMOCULTIVOS”

PRESENTA:

DRA. DIANA MUNGUÍA RAMOS



CARGO	FIRMA
Director de Enseñanza Dr. Sergio Ponce de León Rosales	
Profesor Titular de la Especialidad Dr. Guillermo Ruiz Palacios y Santos	
Director de Tesis Dr. Bernardo Alfonso Martínez Guerra	
Asesor de Tesis Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño	
Sustentante Dra. Diana Munguía Ramos	

INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

ÍNDICE

Tabla de contenido

1. Resumen	3
2. Marco teórico	4
2.1 Factores de riesgo para infecciones por Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos	4
2.2 Consideraciones en la terapéutica de las infecciones por Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos5 Carbapenémicos	5
2.3 Mecanismos de resistencia y clasificación	7
2.4 Métodos de detección.....	10
3. Justificación	13
4. Hipótesis	13
5. Pregunta de investigación	13
6. Objetivos	13
6.1 Objetivo único protocolizado:.....	13
6.2 Objetivos exploratorios no protocolizados:	13
7. Material y métodos	14
7.1 Uso convencional de la prueba NG CARBA 5 ® recomendado por el fabricante	14
7.3 Métodos que se probaron	15
7.3 Variables.....	17
a) Variables dependientes:	17
b) Variables independientes:	17
7.4. Tamaño de la muestra.....	17
7.5 Criterios de elegibilidad	18
8. Análisis estadístico	18
9. Aspectos éticos y riesgos esperados	18
10. Costos	18
11. Resultados	19
11.2 Elección del método a estudiar	19
11.3 Validación del método escogido y rendimiento de la prueba	20
12. Discusión	23
13. Conclusiones	25
14. Bibliografía	25

1. Resumen

Introducción: Las infecciones por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos son cada día más frecuentes y son un problema de salud pública. La prueba NG Carba 5 ® es un inmunoensayo de inmunocromatografía lateral que permite la detección y diferenciación de las carbapenemasas KPC, OXA 48-like, VIM, IMP y NDM en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivo: Desarrollar y validar un método de detección temprana de carbapenemasas utilizando la prueba NG CARBA 5 ® directamente en muestras de hemocultivos con desarrollo de bacilos Gram negativos que presente concordancia con los métodos estándar de detección fenotípica y genotípica.

Material y métodos: Se identificaron aislados previamente caracterizados de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y se inocularon en botellas para hemocultivos con sangre proveniente de los investigadores. Se probaron tres métodos y se eligió validar aquel considerado como más concordante con las pruebas estándar, viable, reproducible y de fácil aplicación. Para validar el método elegido, se identificaron aislados de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* provenientes de cualquier muestra clínica que presentaran resistencia a carbapenémicos detectada por medios automatizados. Dichos aislados se inocularon a botellas para hemocultivos con sangre estéril proveniente de los investigadores. También se incluyeron muestras provenientes de pacientes con bacteriemia por *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Se aplicó la prueba utilizando el método desarrollado y se realizaron análisis de porcentaje de acuerdo y rendimiento diagnóstico.

Resultados: Se desarrollaron tres métodos de aplicación de la prueba. Una vez elegido el método a validar, se aplicaron 32 pruebas en 32 aislados. Al comparar los resultados de las pruebas fenotípicas con las pruebas genotípicas, se observó concordancia en 75%, sensibilidad de 53% y especificidad de 100%. Al comparar los resultados del método desarrollado utilizando la prueba NG CARBA 5 ® con las pruebas fenotípicas, se observó concordancia en 81%, sensibilidad de 100% y especificidad de 74%. Al comparar los resultados del método desarrollado utilizando la prueba NG CARBA 5 ® con las pruebas genotípicas, se observó concordancia en 97%, sensibilidad de 93% y especificidad de 100%.

Conclusión: Se generó un método de detección rápido de carbapenemasas a partir de muestras de hemocultivos positivos utilizando NG CARBA 5 ®. Nuestro método es de fácil aplicación y presenta un excelente rendimiento, brindando resultados de manera confiable y rápida.

2.Marco teórico

Las infecciones por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos (BGNRC) son cada día más frecuentes y son un problema de salud pública (1). El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos reportó que entre 1986 y 1990, sólo el 2.3% de los aislamientos de *Enterobacter sp.* estudiados eran resistentes a imipenem (2,3). Posteriormente, en 2006 y 2007, la Red Nacional de Seguridad de Salud (NHSN, por sus siglas en inglés) reportó que el 4.0% de los aislados de *E. coli* y el 10.8% de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* fueron resistentes a los carbapenémicos, observando un incremento considerable con respecto a años previos (4). En Latinoamérica, la presencia de BGNRC es endémica y se ha reportado la diseminación de aislados con distintos mecanismos de resistencia entre distintos países (5).

Las infecciones por BGNRC pueden ser comunitarias, o bien, intrahospitalarias (6). La mortalidad atribuible a las bacteriemias por microorganismos productores de carbapenemasas es significativamente más alta en comparación con aquella relacionada a infecciones por bacterias no productoras de carbapenemasas. En series de casos de bacteriemia por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, se ha reportado una mortalidad de hasta el 50%, siendo la presencia de carbapenemasas un factor independiente asociado a mortalidad (7,8,9). La falla al tratamiento es más frecuente en pacientes con infecciones por bacterias productoras de carbapenemasa y es bien sabido que el retraso en el tiempo de administración del antimicrobiano adecuado impacta en los desenlaces clínicos y económicos (10,11).

Durante la pandemia de COVID-19 se ha incrementado de forma considerable la prevalencia de infecciones por microorganismos multidrogosresistentes. En un metaanálisis y revisión sistemática realizado en Calgary, Canadá, se reportó, en el contexto de sobreinfecciones en pacientes con COVID-19 durante el periodo de noviembre 2019 a junio 2021, una prevalencia del 24% de infecciones causadas por microorganismos resistentes (12,). Esto podría ser, principalmente, por el uso indiscriminado de antibióticos tanto en pabellones hospitalización, como en las unidades de terapia intensiva.

2.1 Factores de riesgo para infecciones por Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos

El principal factor de riesgo asociado al desarrollo de una infección o colonización por bacterias resistentes a los carbapenémicos es el uso de antibióticos de amplio espectro (6,13). Otros factores relevantes son: hospitalizaciones recientes en los últimos 180 días o ser residente de asilos o casas de estancia, comorbilidades como diabetes e inmunocompromiso, antecedente de haber sido sometido a algún procedimiento quirúrgico en los últimos 90 días, y uso de ventilación mecánica invasiva (13,14,15)

Se muestra en la tabla 1 los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de infecciones por bacterias resistentes a los carbapenémicos (16).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados al desarrollo de infecciones por bacterias resistentes a los carbapenémicos			
Variable	BGNRC vs controles sanos, RM (IC95%)	BGNRC vs bacterias no resistentes, RM (IC95%)	BGNRC vs los dos grupos anteriores, RM (IC95%)
Exposición a antibióticos previa en los últimos 3 meses	32.0 (9.0-111.0)	18.0 (5.2-62.0)	16.8 (5.1-55.0)
Estancia en asilo o casa de estancia	5.0 (2.6-9.1)	8.3 (5.0-16.7)	5.0 (2.5-10.0)
Trasferencia de otro hospital	0.01 (0.002-0.1)	0.13 (0.01-1.1)	26.6 (3.5-202.1)
Procedimiento quirúrgico en los últimos 6 meses	12.5 (5.6-27.7)	3.1 (1.4-6.8)	5.2 (2.6-10.5)
Diabetes	2.9 (1.5- 5.3)	3.8 (2.1-7.1)	3.1 (1.9-5.2)
Intubación	SD	1.4 (0.5-3.7)	1.3 (0.5-2.9)

BGNRC Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos, IC intervalo de confianza, RM razón de momios, SD sin datos

2.2 Consideraciones en la terapéutica de las infecciones por Bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos

Carbapenémicos

Los betalactámicos son los antibióticos que más frecuentemente se prescriben a nivel intra y extrahospitalario por su seguridad, amplio espectro antimicrobiano y eficacia (12). Las cuatro clases principales son las cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos y monobactámicos. En su estructura, las cuatro clases comparten un anillo de azetidinona. Estos antimicrobianos comparten el mismo mecanismo de acción, que consiste en la inhibición de la actividad de la transpeptidasa, enzima necesaria para la síntesis de la pared bacteriana. Las proteínas de unión a penicilina (PBP) contienen estas transpeptidasas y presentan un sitio activo dependiente de serina, que es acetilado por los betalactámicos de forma irreversible (17).

Los carbapenémicos son los betalactámicos de mayor espectro. Tienen una cobertura adecuada para bacilos Gram negativos, principalmente *Enterobacteriaceae* y en algunos casos, *Pseudomonas sp.* y *Acinetobacter sp.*, así como bacterias anaerobias. Una de las principales características que les confiere superioridad respecto a los otros betalactámicos es que conservan su actividad frente a cefalosporinasas cromosómicas y betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Esto no ocurre en el caso de las penicilinas y las

cefalosporinas (18). El imipenem fue el primer carbapenémico que se autorizó para utilizarse como terapia en seres humanos en 1985 (19).

La estructura química de los carbapenémicos está conformada por un anillo betalactámico y uno pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. En la posición 1 contienen un átomo de carbono (-carba) y un enlace no saturado entre la posición 2 y 3 (-em). Todos los carbapenémicos tienen en la posición 6 un grupo hidroxietilo que protege al anillo de algunas serino betalactamasas, y en la posición 3 un radical carboxilo que es necesario para que el anillo pirrolidínico active al betalactámico. Las diferencias entre uno y otro carbapenémico dependen de los cambios en la posición 1 y 2 (19,12).

El imipenem es sensible a la dehidropeptidasa 1 renal siendo inactivado por esta enzima, por lo que fue necesario asociarlo a cilastatina que es un inhibidor de esta enzima (13). El resto de los carbapenémicos son estables frente a esta enzima. En la posición 2 del anillo hay una cadena lateral tioacídica que brinda a los distintos carbapenémicos algunas características como la actividad antimicrobiana, su potencial efecto neurotóxico y la capacidad para ser sujetos a la acción de bombas de eflujo (20,21). Dichos cambios confieren, por ejemplo, un mayor espectro frente a bacterias Gram negativas y uno menor en contra de Gram positivos en el caso de meropenem, así como una disminución en la toxicidad neurológica (convulsiones) en comparación con el imipenem (17,19, 22).

Al comparar con otros carbapenémicos, el ertapenem presenta un mayor peso molecular, es más lipofílico y presenta una mayor unión a proteínas. Esta característica le confiere un aumento en la semivida de eliminación y permite que su administración sea de una vez al día. No tiene una cobertura contra infecciones por *Pseudomonas sp.* y se cree que esto es debido a todas las características previamente mencionadas (peso molecular y lipofilia principalmente) que dificultan su penetración a través de las porinas OprD, no alcanzando así concentraciones adecuadas en el espacio periplasmático (19).

El doripenem cuenta con un espectro similar al meropenem frente a bacterias Gram negativas y al imipenem frente a Gram positivos, así como una mayor actividad contra *P. aeruginosa* (22).

El tebipenem es el único carbapenémico de administración vía oral aprobado hasta el momento. Su primer uso fue en pacientes pediátricos con otitis media, sinusitis y neumonía en el 2009 en Japón. En adultos, se ha propuesto como tratamiento para infecciones de vías urinarias complicadas por *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes que pueden ser tratados de forma ambulatoria. La estructura del tebipenem se caracteriza por un núcleo de carbapenémico beta metil, un anillo de tiazol de azetidina bicíclico en la posición 2, y en la posición 3, un éster de pivoxilo. Este último compuesto es el que permite la biodisponibilidad por vía oral. El espectro antimicrobiano es muy similar al de ertapenem, sin tener cobertura para *Pseudomonas sp.* ni *Acinetobacter sp.* (23,24).

2.3 Mecanismos de resistencia y clasificación

La presencia de betalactamasas hace del uso de los betalactámicos un reto. Existen distintos mecanismos de resistencia a los carbapenémicos, siendo el más frecuente entre los géneros del orden de los Enterobacterales la producción de enzimas conocidas como carbapenemasas (25). Estas enzimas hidrolizan el enlace de unión entre betalactámico y la pared bacteriana, lo que resulta que el antibiótico no pueda inhibir a las PBP y sea inefectivo (17). Las carbapenemasas son un tipo de betalactamasas y se han reportado alrededor de 3000 variantes distintas (26). Las betalactamasas se dividen en 4 clases de acuerdo con la clasificación molecular de Ambler (A, B, C y D). Dicha clasificación es acorde a la secuencia de aminoácidos que las conforman. La otra clasificación que se utiliza es la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, que divide a las betalactamasas de acuerdo con la similitud que presentan entre los perfiles de hidrólisis y su respuesta a los distintos inhibidores de betalactamasas. En esta clasificación, se categorizan a las betalactamasas en cuatro grupos y estos se subdividen en múltiples subgrupos (2a, 2b, 2br, 2d, etc). (1,6,27) Algunas de las betalactamasas que fueron descritas de forma inicial recibieron el nombre de los lugares en donde fueron caracterizadas o de los autores que las describieron y hasta el momento estos nombres se han mantenido por ejemplo la metalo-beta-lactamasa Nueva Delhi (NDM, por sus siglas en inglés), Verona integron metalo-beta-lactamasa (VIM) y la Sao Paulo metalo-beta lactamasa (SPM) (12). De acuerdo con la clasificación de Ambler las carbapenemasas de la clase A (p. ej. KPC y GES) y D (p. ej. OXA 51 y OXA-48) son enzimas hidrolíticas cuyo sitio activo depende de la presencia de serina. Estas enzimas hidrolizan a los betalactámicos en una reacción de múltiples pasos. En cambio, las carbapenemasas de la clase B, también conocidas como metalo-beta-lactamasas, requieren de una o dos moléculas de zinc para hidrolizar a los carbapenémicos. Las metalo-beta-lactamasas más frecuentes son NDM, VIM e IMP (1,28).

La clase A también llamada betalactamasas de amplio espectro del grupo serina conforma el grupo más grande, y presenta un espectro de actividad amplio (9,25, 27). En este grupo se encuentran las penicilinasas que tienen la capacidad de hidrolizar a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación; algunos ejemplos que se han identificado en *Enterobacteriaceae* son TEM-1 y SHV-1 (17). Las BLEE también pertenecen a esta clase. Dichas enzimas hidrolizan de igual forma cefalosporinas y penicilinas, y son susceptibles a los inhibidores clavulanato, tazobactam y avibactam. La enzima CTX-M es la BLEE más prevalente, con una extensión mundial; ésta hidroliza de manera general cefotaxima y ceftriaxona, y en menor medida, ceftazidima. Las enzimas CTX-M son inhibidas por tazobactam, avibactam, relebactam y vaborbactam (29) y se han secuenciado en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* principalmente, aunque ya se han reportado en *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sp.*, y *Serratia marcescens*. Las betalactamasas de la clase A que son resistentes a los inhibidores son variantes de las enzimas TEM-1 conocidas como TEM resistentes a los inhibidores y lo que les confiere esta resistencia son cambios en distintos aminoácidos (Met69, Ser130, Arg275) (17). Como se ha mencionado anteriormente, las carbapenemasas de la clase A de Ambler incluyen a KPC, SME, NMC-A, IMI y GES; estas enzimas están catalogadas en el grupo funcional 2f. La enzima KPC que es la carbapenemasa de mayor distribución

mundial, se detecta principalmente en *K. pneumoniae*, pero también existe en otros bacilos Gram negativos como *Acinetobacter sp*, *P. aeruginosa* y otras *Enterobacteriaceae*. El espectro de susceptibilidad de estas carbapenemasas consiste en que son inhibidas de forma importante por avibactam pero son resistentes al ácido clavulánico y al tazobactam. Las enzimas NMC-A e IMI son enzimas cromosómicamente codificadas capaces de hidrolizar carbapenémicos y se encuentran principalmente en *Enterobacter cloacae*. La enzima SME ha sido descrita de forma exclusiva en *Serratia marcescens*. (30)

La clase B de la clasificación de Ambler contiene a las metalo-betalactamasas, y éstas se categorizan en el grupo 3 de la clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. Se caracterizan por la presencia de una o dos moléculas de zinc en su sitio activo y tienen la capacidad de hidrolizar a casi todos los betalactámicos, con la excepción de los monobactámicos. En este grupo se incluyen IMP, VIM y NDM, que actualmente presentan distribución mundial. Otras que se han identificado en Brasil y Alemania, respectivamente, son SPM y GIM, encontrándose principalmente en *P. aeruginosa* (17, 29)

Las betalactamasas que corresponden al grupo C de Ambler son las que se conocen como tipo AmpC betalactamasas. Éstas tienen la capacidad de generar resistencia a la mayoría de las cefalosporinas, incluyendo a las de tercera generación, al igual que a las penicilinas y a los monobactámicos. Dentro de este grupo no existen carbapenemasas. Las bacterias que las producen AmpC de forma cromosómica y que son de relevancia clínica son *C. freundii*, complejo *E. cloacae*, *K. aerogenes* y *S. marcescens*. La expresión de estas enzimas cromosómicas es inducible al estar expuestas a betalactámicos. Existen en plásmidos y se conocen como cefamicinasas, ya que hidrolizan cefoxitin y otras cefamicinas. Se ha observado que algunos aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *Salmonella enterica* con AmpC plasmídica presentan pérdida de porinas y esto confiere además resistencia a los carbapenémicos (17).

El grupo al que pertenecen las betalactamasas que hidrolizan la oxacilina es el grupo D de la clasificación de Ambler, y son catalogadas dentro del grupo 2d de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros. Si bien estas enzimas tienen una capacidad hidrolítica contra la oxacilina, algunas pueden hidrolizar cefalosporinas y carbapenémicos, y pueden ser inhibidas por avibactam. Las enzimas OXA-11, OXA-14 y OXA-20 se comportan como BLEE. En cambio, OXA-48, OXA-162, OXA-181 y OXA-232 tienen la capacidad de hidrolizar carbapenémicos (17, 29). Si bien cefepime, ceftazidima y aztreonam no son hidrolizados por algunas de las enzimas de este grupo, cabe recalcar que la coexistencia de BLEE y OXA-48 se ha documentado (31). La tabla 2 resume la clasificación de las betalactamasas (27).

Tabla 2. Clasificación de las beta-lactamasas					
AMBLER (Clase molecular)	Bush-Jacoby	Substratos	Derivados	Inhibidas por Ac Clavulánico/ EDTA	Especies bacterianas representativas

A	2a	Penicilina	PC-1	Si/ No	<i>S. aureus</i>
	2b	Penicilina y cefalosporinas de 3a generación	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Si/ No	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>
	2be	Cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos	TEM-3, SHV-2, CTX.M-15, PER	Si/ No	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Proteus sp.</i>
	2br	Penicilina	TEM-30, SHV-10	No/No	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Proteus sp.</i>
	2ber	Cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos	TEM-50	No/No	
	2c	Cabernicilina	PSE-1, CARB-3	Si/ No	<i>P. aeruginosa</i>
	2e	Cabernicilina y Cefepime	RTG-4	Si/ No	<i>E. coli</i> <i>B. fragilis</i> <i>E. cloacae</i>
	2f	Carbapenémicos	KPC, IMI, SME	Variable/ No	<i>K. pneumoniae</i> <i>Serratia sp.</i>
B	3a	Carbapenémicos	IMP, VIM, GIM	No/ Si	<i>P. aeruginosa</i>
	3b	Carbapenémicos	CAU, GOB FEZ	No/ Si	
C	1	Cefalosporina y Cafamicina	AmpC, CMY-2 FOX, MIR, ACT	No/No	<i>Citrobacter freundii</i> <i>E. cloacae</i>
D	2d	Cloxacilina	OXA-1 OXA-10	Variable/ No	
	2de	Cefalosporinas de amplio espectro	OXA-11 OXA-15	Variable/ No	<i>P. aeruginosa</i>
	2df	Carbapenémicos	OXA-23 OXA-24 OXA-48	Variable/ No	<i>Acinetobacter baumannii</i>

CTX cefotaxima M betalactamasa, IMI Imipenemasa, PC penicilinas, KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, SHV sulfhidril variable betalactamasa, TEM Temoniera betalactamasa.

2.4 Métodos de detección

Se ha determinado, que identificar la resistencia a los carbapenémicos es de suma relevancia. Lo anterior se debe a que se ha demostrado un mayor tiempo transcurrido entre la identificación de la resistencia a carbapenémicos y el inicio del tratamiento adecuado incrementa la mortalidad. La rápida identificación de aislados resistentes a carbapenémicos influye directamente en la elección del antibiótico a utilizar (11). Otra razón relevante es la fácil transmisión de estas enzimas entre bacterias e incluso entre diferentes géneros bacterianos. Dado lo anterior, al identificar infecciones por BGNRC, deben de adoptar medidas de aislamiento por contacto para detener su diseminación (10).

Existen distintos ensayos para detectar e identificar la presencia de carbapenemasas. Dichos ensayos son recomendados por CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) y EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). El proceso para la detección de carbapenemasas inicia con la obtención del aislado bacteriano puro, para posteriormente ser sometido a estudio por métodos automatizados que brindan un antibiograma inicial en un lapso de 36 a 48 horas posteriores al primer desarrollo de colonias en medios de cultivo (32) Algunos de los métodos automatizados que actualmente existen en el mercado son el Vitek®, Phoenix® y la espectrometría de masas (matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectrometry, MALDI- TOF por sus siglas en inglés).

Todos los aislados resistentes a carbapenémicos deben de ser estudiados para corroborar el patrón de resistencia y los hallazgos. La confirmación se realiza por medio de estudios fenotípicos y/o genotípicos. El método estándar para realizar el diagnóstico fenotípico es la prueba de microdilución en caldo. La prueba de microdilución brinda las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC, por sus siglas en inglés) para cada carbapenémico en un tiempo aproximado de 72 a 96 horas a partir del primer desarrollo de colonias en medios de cultivo. La microdilución en caldo, demuestra la resistencia a carbapenémicos pero no su mecanismo por lo que existen algunos métodos fenotípicos que permiten establecer si la resistencia a carbapenémicos es mediada por carbapenemasas (33):

1. *Ensayos basados en el crecimiento*

Estos miden la resistencia basándose en el crecimiento de un microorganismo en presencia de un carbapenémico. Algunos ejemplos que utilizan este concepto es la prueba modificada de Hodge (actualmente ya no recomendado por el CLSI) y el método de inactivación de carbapenémicos modificado (mCIM) (13).

- Métodos de inactivación de carbapenémicos

Es una prueba fenotípica en la cual se incuba un disco de meropenem de 10 µg con la cepa problema (aislado de interés) durante 4 horas. Si el microorganismo que se está estudiando no cuenta con una carbapenemasa, el disco de meropenem conservará su actividad mientras

que, en presencia de una carbapenemasa, existirá hidrólisis del meropenem en el disco. Posteriormente el disco de meropenem es removido y colocado en una placa de agar Mueller-Hinton sembrado con una cepa susceptible de *E. coli* (cepa control). Posterior a una incubación de 16 a 24 horas, la zona de inhibición alrededor del disco puede ser medida. La ausencia de inhibición de la cepa control indica la presencia de una carbapenemasa (ya que el carbapenémico fue hidrolizado cuando fue expuesto a la cepa problema). Los diámetros de la zona de inhibición están previamente determinados para cada antibiótico de acuerdo a los establecido por CLSI y EUCAST. La prueba CIM tiene una sensibilidad de 94% y una especificidad de 99 a 100% para detectar carbapenemasas. Suele ser una prueba de bajo costo que utiliza materiales baratos y fáciles de conseguir, con un costo similar a la prueba de Hodge modificada. Tiene la ventaja de mejorar la detección de enzimas tipo-OXA-48 (33, 21). Dado que no es posible distinguir serin carbapenemasas de metalo-betalactamasas utilizando únicamente la prueba mCIM, es necesario añadir un paso más al agregar EDTA a la prueba. Si la cepa a estudiar es productora de una metalo-beta-lactamasa, el EDTA quelará el zinc de la solución, lo que provocará la inhibición de la carbapenemasa y el disco de meropenem no será hidrolizado (34). A esta prueba se le conoce como eCIM y se debe realizar sólo si previamente se realizó una prueba de mCIM con resultado positivo. Una de las limitantes de esta prueba es la incapacidad de detectar la presencia de múltiples carbapenemasas de manera simultánea, particularmente de serin carbapenemasas y metalo-beta-lactamasas.

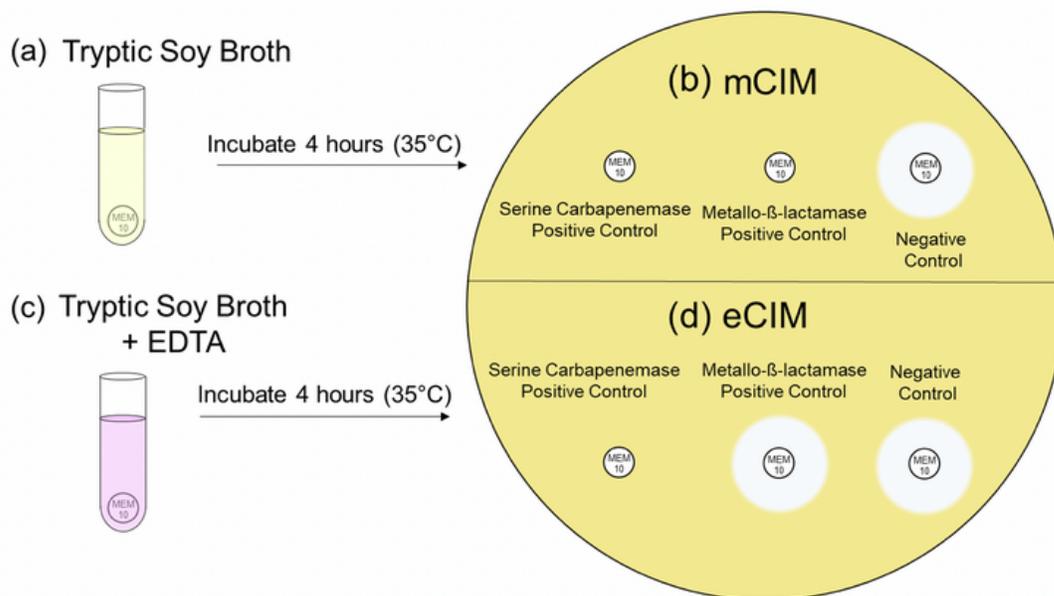


Imagen tomada de Opening the Black box of Phenotypic of Carbapenemase Detection de la página de American Society for Microbiology, disponible en: <https://asm.org/Articles/2019/May/Opening-the-Black-Box-Phenotypic-Carbapenemase-Det>

2. Ensayos basados en la hidrólisis de carbapenémicos

Detectan productos de degradación del antimicrobiano. Algunos ejemplos son Carba NP test® y la espectrometría de masas MALDI-TOF (13).

3. Inmunoensayos de flujo laminar

Detectan carbapenemasas utilizando anticuerpos dirigidos contra las enzimas (13). Permiten la identificación de uno o varios tipos de carbapenemasas de manera simultánea. Se elaborará con respecto a dicho método en apartados posteriores.

Adicionalmente, es necesario realizar confirmación genotípica de la presencia de carbapenemasas por medio de pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (18). Los métodos de biología molecular como la PCR tiempo real, PCR múltiple, microarreglos y secuenciación del RNA, brindan resultados exactos y son el estándar de oro para la detección pero son de alto costo y con tiempos de entrega de resultados variables. Dichos métodos detectan los genes que codifican las enzimas KPC, VIM, IMP, NDM y OXA-48, entre otras (35). En el caso de nuestro laboratorio se utilizan PCR cualitativas previamente validadas para cada carbapenemasa a estudiar. Se requiere un buffer, un preparado de nucleótidos (dNTP), agua, cloruro de magnesio, un iniciador y un finalizador y la DNA polimerasa. En un primer momento se extrae el DNA por medio de un proceso de choque térmico de las cepas a estudiar. Posteriormente, el DNA es sometido a replicación en un termorregulador en donde se llevan a cabo de 25 a 35 ciclos de replicación dependiendo de la enzima de interés. Cada ciclo consiste en un paso de desnaturalización, uno de alineamiento y uno de extensión. Una vez amplificado el DNA, el producto se coloca en un gel de agarosa para poder visualizar los resultados y ser interpretados de acuerdo con el peso molecular (22).

Debido a que el retraso en el diagnóstico y tratamiento adecuado tiene una implicación negativa en el pronóstico de los pacientes, existe una necesidad de detectar oportunamente la presencia de resistencia a carbapenémicos. Se han desarrollado múltiples pruebas rápidas para lograr un diagnóstico oportuno. (36) La prueba rápida NG CARBA 5® (NG Biotech, Guipry, Francia) es un inmunoensayo de inmunocromatografía lateral que permite la detección y diferenciación de las 5 familias más comunes de carbapenemasas (KPC, OXA-48 like, VIM, IMP y NDM) en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. La prueba no detecta la carbapenemasa GES. La prueba funciona utilizando anticuerpos monoclonales contra las diferentes enzimas para lograr una detección sensible y específica a partir de diferentes tipos de muestra (8, 9). La prueba se ha validado previamente y se recomienda su uso a partir del desarrollo de colonias en medio sólido. Dicha detección ha sido evaluada tanto de forma retrospectiva como prospectiva en aislamientos de *Enterobacteriaceae*. Se ha observado que las pruebas tienen una sensibilidad y especificidad mayor a 95%, reduciendo el tiempo de identificación al compararlo con otros métodos fenotípicos (36,37,38). Adicionalmente, la prueba se ha intentado utilizar para detectar carbapenemasas a partir de hemocultivos con resultados variables y procesos aún no estandarizados (37,38, 39, 40).

3.Justificación

Hasta el momento, el uso de prueba de NG CARBA 5 ® sólo se ha utilizado en cepas previamente conocidas y no en un contexto clínico. Existe evidencia insuficiente sobre el uso y rendimiento diagnóstico de la prueba NG CARBA 5 ® a partir de hemocultivos positivos con desarrollo de BGNRC. No existe un método estandarizado y de fácil aplicación de la prueba NG CARBA 5 ® en muestras de hemocultivos.

4.Hipótesis

Es posible desarrollar un método de detección temprana de carbapenemasas utilizando la prueba NG CARBA 5 ® directamente en muestras de hemocultivos positivos para bacilos Gram negativos que presente una concordancia igual o mayor al 80% al comparar con los métodos de referencia fenotípicos y genotípicos.

5.Pregunta de investigación

¿Es posible desarrollar un método de detección temprana de carbapenemasas utilizando la prueba NG CARBA 5 ® directamente en muestras de hemocultivos positivos con desarrollo bacilos Gram negativos que tenga concordancia con los métodos estándar de detección fenotípica y genotípica?

6.Objetivos

6.1 Objetivo único protocolizado:

- Desarrollar y validar un método de detección temprana de carbapenemasas utilizando la prueba NG CARBA 5 ® directamente en muestras de hemocultivos positivos con desarrollos de bacilos Gram negativos que presente concordancia con los métodos estándar de detección fenotípica y genotípica.

6.2 Objetivos exploratorios no protocolizados:

- Desarrollar y validar un método de fácil implementación para aplicar la prueba NG CARBA 5 ® a muestras de hemocultivos, ya sean hemocultivos provenientes de pacientes con bacteriemia o bien, hemocultivos inoculados con aislados clínicos relevantes previamente identificados.
- Identificar a pacientes con infecciones por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos.
- Registrar los episodios bacteriemias por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos.
- Identificar los aislados de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos en cualquier muestra que haya sido procesada por el laboratorio de microbiología.
- Registrar los resultados de susceptibilidad de los aislados de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos.

- En caso de aislados no provenientes de sangre, inocular botellas de hemocultivos con colonias de bacilos Gram negativos.
- Aplicar la prueba NG CARBA 5 ® directamente en muestras de hemocultivos positivos a desarrollo de bacilos Gram negativos.
- Correlacionar los resultados obtenidos por la prueba NG CARBA 5 ® aplicada en hemocultivos con los resultados de susceptibilidad fenotípica y genotípica que se llevan a cabo de manera rutinaria en el laboratorio de microbiología.

7. Material y métodos

Se identificaron aislados de bacilos de la familia de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y se desarrolló el método siguiendo los siguientes pasos:

1. Identificación de aislados de BGNRC en cualquier muestra enviada al laboratorio de microbiología clínica durante el periodo de estudio.
2. Preparación de una solución al 0.5 McFarland con solución salina y un inóculo del aislado a estudiar.
3. Extracción de 10 mL de sangre de los investigadores directo a botellas de hemocultivos marca BACTEC ® Plus aeróbico.
4. Inoculación de 1 mL de la solución salina preparada con el aislado a la botella previamente inoculada con sangre.
5. Incubación en medios automatizados hasta detección positiva.
6. Realizar la prueba NG CARBA 5 ® utilizando diferentes métodos a desarrollar como parte del objetivo del estudio (descritos en apartados posteriores).
7. En caso de que se identificaran aislados de BGNRC en muestras de hemocultivos enviadas al laboratorio de microbiología clínica durante el periodo de estudio se realizó la prueba NG CARBA 5 ® utilizando diferentes métodos a desarrollar como parte del objetivo del estudio (descritos en apartados posteriores).

7.1 Uso convencional de la prueba NG CARBA 5 ® recomendado por el fabricante

El fabricante recomienda el uso de la prueba exclusivamente en medio sólido de acuerdo con las siguientes instrucciones:

Método de aplicación de prueba NG CARBA 5 ® para muestras bacterianas a partir de medio de cultivo sólido:

1. De una placa de cultivo de agar sólido, tomar una colonia con un asa y se suspender un tubo Eppendorf con 150 mcL de solución buffer incluida con el kit de la prueba.
2. Cerrar el tubo.
3. Homogeneizar la mezcla utilizando un equipo vórtex.

4. Abrir la envoltura que contiene la placa de prueba.
5. Tomar 100 mcL de la mezcla y dispensar el volumen en el pozo de muestra de la prueba indicado como "S".
6. Leer los resultados 15 minutos después.

Los medios de cultivo validados de los cuales se puede tomar la colonia bacteriana son:

- Agar soya-tripticasa
- Agar Müller Hinton
- Caldo Luria
- Agar Columbia + 5% de sangre de caballo
- ChromIDTB® ESBL
- mSuperCARBA®
- CHROMagar®

Para la lectura de la muestra:

La muestra migra a lo largo de la placa y las carbapenemasas presentes son capturadas en la zona de prueba bajo las bandas K (KPC), O (OXA 48-like), V (VIM), I (IMP) y N (NDM). La zona de control (C) siempre debe aparecer marcada, sin importar el resultado, esto confirma que la prueba se ha hecho correctamente.

Si aparece una línea roja en las bandas de prueba (K, O, V, I y/o N), se ha detectado una carbapenemasa.

Interpretación de la prueba:

- Un resultado positivo se identifica cuando aparece una línea roja en la zona de control y una o varias líneas en las zonas de las bandas (K, O, V, I o N). Es posible que la prueba muestre distintas franjas lo que significa que se han detectado más de una carbapenemasa.
- Un resultado negativo se observa cuando sólo aparece una línea roja en la zona de control C, lo cual significa que no se ha detectado carbapenemasa alguna que se pueda identificar con el inmunoensayo de flujo lateral.
- La intensidad de la franja puede variar, una línea de intensidad débil se debe interpretar como un resultado positivo. La prueba es cualitativa.
- Un resultado sin franja en la zona control (C), es un resultado no válido. Lo anterior puede suceder cuando se utiliza un volumen insuficiente de muestra o se realizó el procedimiento de manera incorrecta.

7.3 Métodos que se probaron

De acuerdo con lo revisado en la literatura se propusieron los siguientes métodos a probar con el fin de escoger el más viable.

Método 1 (propuesto por Takissian J, et.al (37))

1. De los hemocultivos que sean positivos, extraer 500 mL de sangre a un tubo Eppendorf y centrifugar a 12,000 revoluciones por minuto (RPM) por 2 minutos.
2. Decantar el sobrenadante.
3. Agregar solución Triton 1 x (1/10 volumen/ dilución de volumen de Triton 100X) al pellet de bacterias resultante y homogeneizar utilizando un equipo vórtex.
4. Centrifugar nuevamente a 12,000 RPM por 2 minutos.
5. Descartar el sobrenadante resultante.
6. Agregar 150 mL del buffer contenido en el kit de la prueba NG CARBA 5 ® y homogeneizar.
7. Añadir 100 mL de la suspensión sobre la placa de prueba.
8. Leer el resultado 15 minutos después

Método 2 (desarrollado por los investigadores)

1. De los hemocultivos que sean positivos, extraer 500 mL de sangre a un tubo Eppendorf y centrifugar a 12,000 RPM por 2 minutos.
2. Descartar sobrenadante.
3. Mezclar con el pellet resultante con solución salina para lograr una solución McFarland 0.5.
4. Añadir 100 mL de la solución resultante a un tubo de Eppendorf con 150 mL del buffer contenido en el kit de la prueba NG CARBA 5 ® y homogeneizar utilizando un equipo vórtex.
5. Añadir 100 mL de la suspensión se colocarán sobre la placa.
6. Leer el resultado 15 minutos después.

Método 3 (desarrollado por los investigadores)

1. De los hemocultivos que sean positivos se extraer 3 mL de sangre a un tubo Vacutainer ® dorado de 5 mL para suero con gel y activador de coagulación y centrifugar a 10,000 RPM por 10 minutos.
2. Descartar sobrenadante.
3. Tomar pellet de las bacterias con asa o aplicador de madera y añadir a tubo Eppendorf con 100 mL del buffer contenido en el kit de la prueba NG CARBA 5 ®.
4. Homogeneizar utilizando un equipo vórtex.
5. Añadir 100 mL de la suspensión sobre la placa de la prueba.
6. Leer el resultado 15 minutos después.

Proceso de selección de método a validar

Para elegir el método óptimo de aplicación de la prueba, se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- Facilidad de aplicación a criterio de los investigadores

- Consistencia entre los resultados al comparar con el estándar
- Número de reactivos a utilizar en cada método
- Tiempo de procesamiento

Una vez seleccionado el método óptimo, se incluyeron los aislados acorde a los criterios de elegibilidad y estudiaron las variables de interés.

7.3 Variables

a) Variables dependientes:

- Viabilidad del método escogido definida por la presencia de resultados válidos (presencia de banda control).
- Concordancia y rendimiento diagnóstico de la prueba NG Carba 5 ® para la detección de carbapenemasas en hemocultivos tomando la prueba de microdilución en caldo como estándar de referencia para la detección fenotípica.
- Concordancia, rendimiento diagnóstico y resultado de la prueba NG Carba 5 ® para la detección de carbapenemasas en hemocultivos tomando las pruebas genotípicas como estándar de referencia.

b) Variables independientes:

- Ocurrencia y tipos de cultivos positivos a desarrollo de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas.
- Género y especie de microorganismo detectado.
- Tipo de carbapenemasa detectada por prueba NG CARBA 5 ® (KPC, NDM, OXA-48 like, VIM, IMP).
- Presencia de carbapenemasa detectada por prueba mCIM (presente o ausente).
- Tipo de carbapenemasa detectada por prueba eCIM (serin carbapenemasa o metalo-betalactamasa).
- Tipo de carbapenemasa detectada por secuenciación (KPC, NDM, OXA, VIM, IMP, GES).
- Número de carbapenemasas detectadas por cada prueba NG CARBA 5 ®.
- Número de carbapenemasas detectadas por secuenciación.

7.4. Tamaño de la muestra

Se trata de un estudio piloto, pues los métodos a estudiar no se han evaluado en un contexto clínico. Como parte del plan de análisis, no se realizó un cálculo de tamaño de muestra, ya que se trata de un estudio piloto. De manera exploratoria, se realizó un cálculo de tamaño muestra tentativo utilizando la siguiente fórmula (41). Se tomaron en cuenta una sensibilidad y especificidad deseada de 90%, precisión del 80%, un valor alfa de 0.05. Considerando una prevalencia de carbapenemasas de 30% entre los aislados resistentes a

$$n_{Se} = \frac{Z_{\frac{\alpha}{2}}^2 \widehat{Se}(1 - \widehat{Se})}{d^2 \times Prev}$$

$$n_{Sp} = \frac{Z_{\frac{\alpha}{2}}^2 \widehat{Sp}(1 - \widehat{Sp})}{d^2 \times (1 - Prev)}$$

carbapenémico por cualquier mecanismo, se calculó un tamaño de muestra en 29. Considerando una prevalencia de carbapenemasas de 60% entre los aislados resistentes a carbapenémico por cualquier mecanismo, se calculó un tamaño de muestra en 21.

7.5 Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

- Se incluyeron aislados con desarrollo de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cualquier muestra clínica que presentara resistencia a cualquier carbapenémico detectada por medios automatizados (VITEK®).
- Se incluyeron las muestras provenientes de aquellos pacientes con un episodio de bacteriemia por *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* que presentara resistencia a cualquier carbapenémico detectada por medios automatizados (VITEK®).

Criterios de exclusión

No existen criterios de exclusión.

Criterios de eliminación

No existen criterios de eliminación.

8. Análisis estadístico

Se reportaron las variables cualitativas en frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se reportaron en números absolutos. Una vez obtenidos los resultados de las pruebas se realizaron análisis de porcentaje de acuerdo y análisis de rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos). No se realizó estadística inferencial, pues se trató de un estudio de prueba diagnóstica.

9. Aspectos éticos y riesgos esperados

No se esperan riesgos potenciales derivados del estudio. No se esperan eventos adversos derivados del estudio. El desarrollo de métodos diagnósticos para detección de resistencias a antimicrobianos rápidos podría beneficiar a la población general y facilitar la administración oportuna de un tratamiento adecuado.

10. Costos

El estudio no generó ningún costo. Los materiales utilizados forman parte del inventario del Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Para la investigación, se donaron las pruebas NG CARBA 5 ® por parte de los investigadores. Las pruebas son propiedad del equipo de investigación. Dicha donación no estableció ningún tipo de compromiso por parte del Instituto, los investigadores, ni ninguna compañía ajena al Instituto. El equipo de investigación no cobró tarifa alguna por el uso de las pruebas.

11. Resultados

11.2 Elección del método a estudiar

Para la elección de método se probaron, utilizando los tres métodos, cepas conocidas y previamente caracterizadas por métodos estándar. Se eligió validar el método 3 (desarrollado por los investigadores) dado lo siguiente:

- Facilidad de aplicación a criterio de los investigadores:
El método 1 presentó dificultades con el uso de solución Tritón ya que al aplicar la solución se formaron burbujas que impidieron la aplicación de la solución en la placa de prueba. De la misma manera el uso de reactivos adicionales implicó una dificultad al comparar con los otros dos métodos. Para la aplicación del método 2, la generación de una solución McFarland como un paso intermedio implicó la realización de pasos adicionales al comparar con el método 3.
- Consistencia entre los resultados al comparar con el estándar:
El método 1 presentó concordancia entre el resultado de la prueba NG CARBA 5 ® y las pruebas genotípicas en 6 de 10 pruebas. Las 4 pruebas restantes mostraron resultados no concordantes con detección de carbapenemasas (resultados positivos a todas las bandas incluida la banda control, lo cual no es biológicamente plausible). El método 2 mostró concordancia entre el resultado de la prueba NG CARBA 5 ® y las pruebas genotípicas en 0 de 10 pruebas, resultando todas las pruebas negativas para todas las bandas. El método 3 mostró una concordancia en 10 de 10 pruebas.
- Número de reactivos a utilizar en cada método
En comparación con el método 3, el método 1 y 2 utilizan reactivos adicionales (solución tritón y solución salina, respectivamente).
- Tiempo de procesamiento
El tiempo de procesamiento observado fue equivalente entre los tres métodos. Si bien el tiempo de centrifugación en el método 3 es mayor que en los métodos 1 y 2, el procesamiento con reactivos adicionales en dichos métodos adicionó tiempo al procesamiento. El tiempo promedio entre el inicio de la prueba a partir de hemocultivos positivos y la lectura de la prueba fue de 35 minutos por prueba. No se determinó el tiempo de manera sistemática.

11.3 Validación del método escogido y rendimiento de la prueba

Se realizaron 32 pruebas, de las cuales 26 se llevaron a cabo a partir de botellas inoculadas con sangre de los investigadores y 6 a partir de botellas provenientes de pacientes con bacteriemia. Se estudiaron 21 aislados de *Enterobacteriaceae* (11 *E. coli*, 5 *K. pneumoniae*, 3 *E. cloacae*, 1 *K. aerogenes* y 1 *R. ornithinolytica*) y 11 aislados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Las pruebas fenotípicas (mCIM) detectaron la presencia de carbapenemasas en 15 aislados. De 15 pruebas eCIM, 6 fueron positivas correspondiendo a metalo-betalactamasas. La amplificación de ácidos nucleicos detectó la presencia de 23 carbapenemasas en 17 aislados (10 NDM, 7 OXA-48, 3 KPC, 2 GES y 1 VIM). Utilizando el método seleccionado la prueba NG Carba 5® detectó 20 carbapenemasas en 15 aislados (9 NDM, 7 OXA-48-Like, 3 KPC, 1 VIM). En 6 ocasiones, las pruebas de amplificación detectaron dos carbapenemasas de manera simultánea, mientras que esto ocurrió en 5 ocasiones al utilizar la prueba NG Carba 5®. (Tabla 1)

Tabla 3. Características de las cepas evaluadas y resultados obtenidos en las distintas pruebas

Id	Aislado	Origen	MIC CRO	MIC CAZ	MIC ETP	MIC MEM	MIC IPM	mCIM	eCIM	Secuenciación	NG CARBA 5	Concordancia entre mCIM/eCIM y NG CARBA 5	Concordancia entre secuenciación y NG CARBA 5
1	<i>E. coli</i>	Sangre	≥64/R	≥64/R	2/I	1/S	1/S	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
2	<i>E. coli</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	0.5/S	1/S	2/I	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
3	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Negativo	KPC/NDM	KPC/NDM	No	Si
4	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Negativo	KPC/NDM	KPC/NDM	No	Si
5	<i>P. aeruginosa</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	NA	≥32/R	16/R	Negativo	NR	GES	Negativa	Si	Si
6	<i>E. cloacae</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	8/R	2/I	2/I	Negativo	NR	GES	Negativa	Si	Si
7	<i>P. aeruginosa</i>	Biopsia	≥64/R	≥64/R	NA	4/I	≥32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
8	<i>P. aeruginosa</i>	Líquido biliar	32/R	4/S	NA	4/I	≥32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
9	<i>K. aerogenes</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	8/R	1/S	4/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
10	<i>P. aeruginosa</i>	Traqueal	≥64/R	8/S	NA	8/R	16/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
11	<i>E. coli</i>	Herida	≥64/R	≥64/R	≥8/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Positivo	NDM	NDM	Si	Si
12	<i>P. aeruginosa</i>	Biopsia	≥64/R	≥64/R	NA	≥32/R	32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
13	<i>P. aeruginosa</i>	Absceso	32/R	≤1/S	NA	4/I	16/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
14	<i>K. pneumoniae</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Negativo	KPC/NDM	KPC/NDM	No	Si
15	<i>P. aeruginosa</i>	Sangre	≥64/R	≤1/S	NA	8/R	16/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
16	<i>E. coli</i>	Traqueal	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥32/R	≥16/R	Positivo	Positivo	NDM	NDM	Si	Si
17	<i>E. coli</i>	Absceso	≥64/R	16/R	4/R	≤1/S	4/R	Positivo	Negativo	OXA-48	OXA-48-Like	Si	Si
18	<i>E. coli</i>	Absceso	≥64/R	16/R	4/R	≤1/S	4/R	Positivo	Negativo	OXA-48/NDM	OXA-48-Like	No	No
19	<i>E. coli</i>	Sangre	≥64/R	≥64/R	≥8/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Positivo	NDM	NDM	Si	Si
20	<i>E. coli</i>	Absceso	≥64/R	≥64/R	≥16/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Positivo	NDM	NDM	Si	Si
21	<i>E. coli</i>	Expectoración	≥64/R	≥64/R	≥8/R	≥32/R	≥32/R	Positivo	Negativo	OXA-48/NDM	OXA-48-Like/NDM	No	Si
22	<i>P. aeruginosa</i>	Sangre	16/R	4/S	NA	4/I	≥32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
23	<i>P. aeruginosa</i>	Expectoración	≥64/R	4/S	NA	16/R	≥32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
24	<i>P. aeruginosa</i>	Urocultivo	32/R	8/S	NA	8/R	≥32/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
25	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre	≤1/S	≤1/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.25/S	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
26	<i>E. cloacae</i>	Sangre	≤1/S	≤1/S	≤0.5/S	≤0.25/S	≤0.25/S	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
27	<i>E. cloacae</i>	Urocultivo	≥64/S	≥64/R	16/R	2/I	4/R	Negativo	NR	No detectada	Negativa	Si	Si
28	<i>K. pneumoniae</i>	Urocultivo	≥64/R	≥64/R	≥16/R	2/I	2/I	Positivo	Positivo	OXA-48	OXA-48-Like	Si	Si
29	<i>P. aeruginosa</i>	Nefrostomía	64/R	≥64/R	NA	32/R	32/R	Positivo	Positivo	VIM	VIM	Si	Si
30	<i>R. ornithinolytica</i>	Absceso	≤1/R	≤1/S	4/R	1/S	2/I	Positivo	Negativo	OXA-48	OXA-48-Like	Si	Si
31	<i>E. coli</i>	Sangre	≥16/R	4/S	2/R	0.5/S	1/S	Positivo	Negativo	OXA-48	OXA-48-Like	Si	Si
32	<i>E. coli</i>	Sangre	≥64/R	≥64/R	≥8/R	≥16/R	8/R	Positivo	Negativo	OXA-48/NDM	OXA-48-Like/NDM	No	Si

I:intermedio, R: resistente, S: sensible, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, ETP: ertapenem, MEM: meropenem, IPM: imipenem, NR: no realizado
 Las concentraciones mínimas inhibitorias de ceftriaxona y ceftazidima se determinaron por medios automatizados (VITEK 2®, BioMérieux). Las concentraciones mínimas inhibitorias de ertapenem, meropenem e imipenem se determinaron por microdilución en caldo utilizando recomendaciones de CLSI.

Al comparar las pruebas fenotípicas estándar con las pruebas genotípicas, se observó concordancia en 24 de 32 muestras con un porcentaje de acuerdo de 75.0%. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron 53%, 100%, 100%, y 65%, respectivamente. (Figura 1)

	Secuenciación positiva	Secuenciación negativa		
mCIM/eCIM positiva	9	0	9	Sensibilidad 53%
mCIM/eCIM negativa	8	15	23	Especificidad 100%
	17	15	n=32	Valor Predictivo + 100%
				Valor Predictivo - 65%

Porcentaje de acuerdo: 75.0%

Figura 1. Rendimiento diagnóstico de las pruebas fenotípicas estándar al comparar con pruebas genotípicas

Al comparar el método de detección rápida a partir de hemocultivos positivos utilizando la prueba NG CARBA 5® con las pruebas fenotípicas, se observó concordancia en 26 de 32 muestras con un porcentaje de acuerdo de 81.3%. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron 100%, 74%, 60%, y 100%, respectivamente. (Figura 2)

	mCIM/eCIM positiva	mCIM/eCIM negativa		
NG CARBA 5 Positiva	9	6	15	Sensibilidad 100%
NG CARBA 5 Negativa	0	17	17	Especificidad 74%
	9	23	n=32	Valor Predictivo + 60%
				Valor Predictivo - 100%

Porcentaje de acuerdo: 81.3%

Figura 2. Rendimiento diagnóstico del método propuesto al comparar con pruebas fenotípicas

Al comparar el método de detección rápida a partir de hemocultivos positivos utilizando la prueba NG CARBA 5® con las pruebas genotípicas, se observó concordancia en 31 de 32 muestras con un porcentaje de acuerdo de 96.9 %. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron 93%, 100%, 100%, y 94%, respectivamente. (Figura 3)

	Secuenciación positiva	Secuenciación negativa	
NG CARBA 5 Positiva	14	0	14
NG CARBA 5 Negativa	1	17	18
	15	17	n=32

Sensibilidad	93%
Especificidad	100%
Valor Predictivo +	100%
Valor Predictivo -	94%

Porcentaje de acuerdo: 96.9%

Figura 3. Rendimiento diagnóstico del método propuesto al comparar con pruebas genotípicas

12. Discusión

En el presente estudio, se desarrolló un método con un rendimiento adecuado al comparar con el estándar de oro (pruebas genotípicas). Nuestro método mostró adecuada concordancia, sensibilidad y especificidad. Además, en nuestro estudio, se observó que el método propuesto utilizando la prueba NG CARBA 5[®] a partir de muestras de hemocultivos positivos, tiene mejor rendimiento que las pruebas fenotípicas estándar (mCIM/eCIM). Lo anterior se debe a la capacidad de nuestro método para detectar la presencia simultánea de carbapenemasas. La detección simultánea de carbapenemasas utilizando la prueba NG CARBA 5[®] se ha reportado previamente (42, 43) y podría ofrecer una ventaja en la toma de decisiones para el manejo. La presencia simultánea de carbapenemasas se ha observado en 3 al 86% de los aislados (44, 45), dependiendo la región geográfica y de los métodos de detección utilizados.

El método propuesto parece ser de fácil aplicación ya que utiliza una menor cantidad de reactivos y se obtienen los resultados en un tiempo reducido. Probamos distintos métodos, evaluando la viabilidad, la fácil aplicación, la claridad de los resultados y la concordancia con las pruebas estándar. Al comparar con la metodología reportada por Takissian J. et al. (37), nuestra propuesta presentó la ventaja de no necesitar reactivos adicionales como el Triton 100x. Al momento de intentar replicar el método previamente publicado, nos enfrentamos al hallazgo inesperado de la generación burbujas al aplicar el Triton 100x. Lo anterior ocasionó que la solución no impregnara de forma adecuada el papel filtro de la placa, por lo que las bandas o no resultaban evidentes de forma clara, o bien, presentaban positividad para todas las carbapenemasas, dificultando así la interpretación. En un primer momento, el equipo de investigación propuso dos métodos. El método no seleccionado presentó dificultades adicionales que limitan su aplicación. El utilizar solución salina para crear una solución al 0.5 Mac Farland hizo que el procedimiento consistiera en un paso más. Adicionalmente, los resultados no tuvieron una concordancia aceptable pues se reportó un número elevado de falsos negativos. Al comparar con el estándar de oro (amplificación de ácidos nucleicos), el método finalmente elegido para validar presenta un menor requerimiento de materiales e infraestructura.

Reportes previos han evaluado el rendimiento diagnóstico de la prueba NG CARBA 5[®] utilizando cepas desarrolladas en medios de cultivo sólido, previamente identificadas y confirmadas por los métodos fenotípicos de inactivación de carbapenémicos y genotípicos (40,41). En el estudio de Huang et. al,

realizado en la Universidad de Taiwán, se utilizaron cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* y se obtuvo una concordancia del 100% con las pruebas de PCR tiempo real (Xpert CARBA-R®). Los autores reportaron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99% (38). Al compararla con otras pruebas de detección de antígenos y anticuerpos, NG CARBA 5® presentó una mayor especificidad con una similar sensibilidad (39). Existen estudios en donde se ha estudiado el rendimiento de NG CARBA 5® directamente en muestras de hemocultivos, obteniendo resultados similares a los reportados por este estudio. El método propuesto por Stokes et al. reportó un adecuado rendimiento, sin embargo, la factibilidad podría estar limitada por el número de reactivos y pasos inherentes a su propuesta (39). Kriger et al. reportaron el uso de la prueba NG CARBA 5® a partir de hemocultivos, sin embargo, no es claro su método en la publicación, limitando así su reproducibilidad (42). Giordano et al. publicaron un método reproducible y con adecuado rendimiento para la detección de carbapenemasas a partir de muestras de hemocultivos (46). El rendimiento fue similar a nuestros resultados y el método propuesto por los autores podría ser de fácil aplicación también.

Es necesario reconocer las limitaciones del estudio. Nuestro estudio se llevó a cabo utilizando aislados clínicos de un centro de tercer nivel. Los aislados recuperados en nuestro centro podrían no ser representativos de la frecuencia y tipo de carbapenemasas observados en otros centros. Ninguno de los aislados estudiados presentaron carbapenemasa de tipo IMP. En otros estudios se han reportado falsos negativos en muestras que contenían IMP-14 (39). La baja frecuencia de IMP en estudios que buscan validar la prueba NG CARBA 5® a partir de muestras de hemocultivos se ha reportado previamente (42,46). Adicionalmente, nuestro estudio no comparó el método propuesto con el previamente reportado por Giordano et al. (46). Una limitación adicional es que no se evaluó el costo ni el tiempo de procesamiento de la prueba de manera sistemática. Si bien no era el objetivo del estudio, el impacto de nuestros resultados en la atención de los pacientes no fue evaluado. Reportamos los resultados de un estudio piloto que no estudió el impacto clínico de nuestro método. Es necesario continuar la investigación para determinar el impacto clínico de la implementación de detección rápida de hemocultivos. Si bien la frecuencia de infecciones por BGNRC ha aumentado de manera progresiva, la frecuencia de bacteriemias por BGNRC no excede el 5% de los episodios infecciosos en nuestro centro. Realizar la prueba a todos los hemocultivos podría reflejarse en un número excesivamente alto de pruebas negativas. Es necesario determinar en qué pacientes se deben de utilizar estas pruebas. Aquellos pacientes previamente colonizados por BGNRC podrían constituir una población de estudio interesante. De la misma manera, se estudiaron muestras de hemocultivos con desarrollo de un solo aislado; será necesario investigar el rendimiento del método en el contexto de bacteriemias polimicrobianas. Una de las limitaciones inherentes a la prueba es que no detecta carbapenemasas tipo GES que es una de las más frecuentes en las *P. aeruginosa* (47). Otra limitación es que esta prueba no es válida para el uso en aislamientos por *Acinetobacter sp* y *Achromobacter sp*, ambos microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias y frecuentemente resistentes a carbapenémicos.

Nuestro estudio presenta fortalezas que deben de ser consideradas. Realizamos comparaciones sistemáticas con otros métodos. Nuestro método es claro, fácilmente reproducible y concordante al comparar con las pruebas estándar. La viabilidad y rendimiento del método podrían favorecer su uso en centros en donde no haya métodos estándar de detección de carbapenemasas. Tuvimos resultado positivo para VIM expresada por un aislado de *P. aeruginosa* que fue detectada de forma correcta por la prueba. En estudios previos, se han reportado dificultades para detectar VIM (42).

Las infecciones por bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos son un problema de salud pública. Si bien las infecciones por microorganismos resistentes a carbapenémicos se asocian a mayor mortalidad, el tiempo al antibiótico apropiado es un factor de riesgo para muerte independiente (11). El retraso en el diagnóstico de infecciones por microorganismos resistentes a los antibióticos juega un papel en el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos (48). Es necesaria la implementación y uso de pruebas que aporten resultados rápidos y que permitan tomar decisiones que impactan en los desenlaces de los pacientes.

13. Conclusiones

Se generó un método de detección rápida de carbapenemasas a partir de muestras de hemocultivos positivos utilizando NG CARBA 5 ®. Nuestro método es de fácil aplicación y presenta un excelente rendimiento, brindando resultados de manera confiable y rápida. Es necesario continuar el estudio del impacto de la detección rápida de carbapenemasas.

14. Bibliografía

1. Giordano L, Fiori B, D'inzeo T, Parisi G, Liotti FM, Menchinelli G, et al. Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG-Test Carba 5 Assay [Internet]. Vol. 63. 2019. Available from: http://www.eucast.org/ast_of
2. Gaynes R, Culver D. Resistance to Imipenem Among Selected Gram Negative Bacilli in the United States. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1992;12(1):10-14
3. Gupta N, Limbago B, Patel J. Carbapenem- Resistant Enterobacteriaceae *Epidemiology and Prevention*. *CID*. 2011;53:60-67
4. Hidron A, Edwards J, Patel J. Antimicrobial- Resistant Pathogens Associated with Healthcare Associated Infections Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2008; 29:996-1011
5. García-Betancur J, Appel T, Esparza G, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean, Expert Review of Anti-infective Therapy, 2021; 19(2): 197-213 DOI: 10.1080/14787210.2020.1813023
6. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Vol. 8, *Virulence*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 460–9.

7. Babiker, A., Clarke, L. G., Saul, M., Gealey, J. A., Clancy, C. J., Nguyen, M. H., & Shields, R. K. (2021). Changing Epidemiology and Decreased Mortality Associated With Carbapenem-resistant Gram-negative Bacteria, 2000-2017. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(11), e4521–e4530. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1464>
8. Ben-David, D. *et al.* Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **18**, 54–60 (2012).
9. Fraenkel-Wandel, Y., Raveh-Brawer, D., Wiener-Well, Y., Yinnon, A. M. & Assous, M. v. Mortality due to blaKPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **71**, 1083–1087 (2016).
10. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? Vol. 8, Virulence. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 417–26.
11. Lodise T, Berger A, Altincatal A *et al.* Antimicrobial Resistance or Delayed Appropriate Therapy- Does One Influence Outcomes More than the Other Among Patients with Serious Infections due to Carbapenem- Resistant versus Carbapenem Susceptible Enterobacteriaceae? *OFID*.2019; 6(6):ofz194
12. Kariyawasam R. *et al.* Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019- June 2021).*Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2022;11(45): 2-18
13. McConville T *et al.* 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):e0186195
14. Peleg A. *et al* Dissemination of the Metallo- β -lactamase gene bla IMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia.*CID* 2005; 41:1549-46
15. Guh A, Bulens S, Mu Yi. Epidemiology of Carbapenem- Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012- 2013. *JAMA*. 2015; 314(14): 1479-1487
16. Marchaim D, Chopra T, Bhargava A, *et al.* Recent Exposure to Antimicrobials and Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Role of Antimicrobial Stewardship. *Infect Control Hosp Epidemiol*.2012; 33(8):817-830 doi:10.1086/666642.
17. Bush K, Bradford P. Interplay between β lactamases and new β lactamase inhibitors. *Nature Reviews*.2019;17: 295-306
18. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Nov 20];55(11):4943–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21859938/>
19. M.J. Fresnadillo Martínez *et al.* Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias *Enferm Infecc Microbiol Clin*,2010;28(2):53-64
20. Hawkey P, Livermore D. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ*.2012;344 (E3236):2-7doi: 10.1136/bmj.e3236
21. van der Zwaluw, K. *et al.* 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**, (2015).

22. Doyle et al. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*.2012; 50(12):3877-3880
23. Jain A, Utley L, Parr R et al. Tebipenem, the first oral carbapenem antibiotic, *Expert Review of Anti-infective Therapy*,2018;16:7, 513-522, DOI: 10.1080/14787210.2018.1496821
24. Eckburg P, Muir L, Critchley I, et al. Oral Tebipenem Pivoxil Hydrobromide in Complicated Urinary Tract Infection. *N Engl J Med*, 2022;386:1327-38
25. Kois AK, Nicolau DP, Kuti JL. Unresolved issues in the identification and treatment of carbapenem-resistant Gram-negative organisms. *Current opinion in infectious diseases* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Nov 24];33(6):482–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33009141/>
26. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(1):S28–S36
27. Bush K, Jacoby George Updated Functional Classification of β - Lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3):969-976
28. Weinstein MP, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 316.
29. Martínez-Martínez L, González- López J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology.*Enferm Infecc Microbiol Clin*.2014;32(Supl 4): 4-9
30. Armstrong T, Fenn S, Hardie K. JMM Profile: Carbapenems: a broad- spectrum antibiotic. *Journal of Medical Microbiology*. 2021;70 (001462): 1-5
31. Stewart A, Harris P, Henderson A. Treatment of Infections by OXA- 48- Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(e011):95-18.
32. *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. (2021).
33. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Nov 18];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30158194/>
34. Tamma, P. D. *et al*. Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology* **55**, 1046–1055 (2017).
35. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease* [Internet]. 2013 Nov [cited 2021 Nov 18];77(3):179–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091103/>
36. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, et al. The Journal of antimicrobial chemotherapy [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Nov 18];73(4):909–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29365094/>
37. 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 and chemotherapy* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Nov 18];63(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30803973/>

38. Huang Y, Kuo Y, Lee N et al. Evaluating NG- Test Carba 5 Multiplex Immunochromatographic and Cepheid Xpert CARBA-R Assays among Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Associated with Bloodstream Infection. *MicrobiolSpectrum*.2022; 10(1):e01728-21
39. Stokes W et al. Rapid detection of carbapenemases- producing organisms directly from blood cultures positive for gram- negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40: 381- 384
40. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M et al. Integrating rapid diagnostic in Gram-negative bloodstream infections of patients colonized by carbapenemase- producing Enterobacterales. *Journal of Hospital Infection*. 2021;110: 84-88
41. Jones SR, Carley S, Harrison M. An introduction to power and sample size estimation. *Emergency Medical Journal*. 2003;20:453-458
42. Kriger O, Shatzmann-Steuerman R, Smollan G, et.al. Rapid Detection of Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae from Blood Culture Bottles of Known CPE Carriers. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021; XX: 00-00
43. Vasilakopoulou A, Karakosta P, Vourli S, Kalogeropoulou E, Pournaras S. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *Microorganisms*. 2021;9(5):942.
44. Elbadawi HS, Elhag KM, Mahgoub E, et al. Detection and characterization of carbapenem resistant Gram-negative bacilli isolates recovered from hospitalized patients at Soba University Hospital, Sudan. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):136.
45. Haji SH, Aka STH, Ali FA. Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PLoS One*. 2021;16(11):e0259005.
46. Giordano L, Fiori B, et.al Simplified Testing Method for Direct Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Positive Blood Cultures Using the NG- Test Carba 5 Assay. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00550-19
47. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemases en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(Supl 1):19-28
48. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016;387(10014):176-187. doi:10.1016/S0140-6736(15)00473-0