



# Evaluación de tres métodos de tamizaje para detección de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas en hisopados rectales

Diego Fernando Josa, Gisell Bustos, Isabel Cristina Torres y Germán Esparza S.

## Evaluation of three screening methods for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal swabs

**Background:** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) have taken great importance on public health at global scale, which makes it necessary to implement rapid test for its prompt detection. **Aim:** To evaluate three screening methods to detect CPE in rectal swabs. **Material and Methods:** Transverse study, prospective. Seventy three rectal swabs were evaluated by three methodologies. Microorganism identification and susceptibility testing were made using automated systems. Carbapenemase production was confirmed by modified Hodge test and synergy tests using boronic acid and EDTA. **Results:** The method 1 (*ChromID CARBA*<sup>®</sup>) detected 20 positive samples (27.4%), 5 false positives (6.9 %), with concordance index of 93.2%, sensitivity 100% and specificity of 90%. Method 2 (*HB&L Carbapenemase*<sup>®</sup>) detected 17 positive samples (23.3%) and 3 false negatives (4.1%). The sensitivity and specificity of the assay were 85% and 100%, with concordance index of 95.9%. Method 3 (*Xpert Carba-R*<sup>®</sup>) detected 19 positive samples (57.5%) and 1 false negatives (3.1%), sensitivity 95%, specificity 100% and concordance index of 97%. **Discussion:** There is a wide variety of methodologies for rapid detection of carbapenemase-producing microorganisms. Choosing the best method must have as requirement a good sensitivity, specificity, and cost-effectiveness.

**Key words:** Rectal swabs, screening, carbapenemasas, prompt detection.

**Palabras clave:** Hisopado rectal, tamizaje, carbapenemasas, detección rápida.

## Introducción

Las *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (EPC) han tomado gran importancia en el mundo, por el aumento en el número de infecciones y el incremento en las tasas de morbi-mortalidad. Su rápida diseminación, su difícil control y la escasez de opciones terapéuticas para el manejo de las infecciones, son factores que han permitido que estos microorganismos sean los causantes de brotes a nivel hospitalario causando numerosas muertes<sup>1-5</sup>.

Su efectiva capacidad de diseminación radica en que los genes que codifican estas carbapenemasas están localizados en transposones e integrones que se movilizan fácilmente entre especies bacterianas. Las carbapenemasas de clase A con serina en su sitio activo (KPC *like*) son las prevalentes en todos los continentes, seguidas de las carbapenemasas de la clase B (VIM, NDM) que tienen zinc en el sitio activo<sup>3,6-8</sup>. En Colombia, se han publicado varios reportes de brotes por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo serina (KPC *like*) y hallazgos de otros genes como por VIM, NDM y OXA<sup>9-11</sup>.

Entre los sitios corporales con mayor densidad de

colonización se encuentran el tracto respiratorio, asociado al uso de dispositivos invasores (ventilación mecánica), y el tracto gastrointestinal, considerado el más importante<sup>3,6,8,10</sup>. Estos pacientes colonizados, se convierten en un vehículo efectivo de diseminación, provocando brotes de magnitud considerable<sup>4,6,7,12</sup>.

A esto se suma, la escasa búsqueda activa en pacientes hospitalizados o remitidos de otras instituciones, donde se ha demostrado su rápida colonización por microorganismos multi-resistentes<sup>2,3,13</sup>.

## Objetivo

Evaluar tres diferentes metodologías para el tamizaje de EPC en muestras de hisopado rectal de pacientes admitidos en el servicio de hospitalización de la Fundación Clínica Shaio.

## Materiales y Métodos

Estudio prospectivo, de tipo transversal, en el cual se evaluaron 73 hisopados rectales de pacientes provenientes de los servicios de Urgencias, Unidad de Cuidado Inten-

Fundación Clínica Shaio-Bogotá, Colombia.

Departamento de Laboratorio Clínico y Patología, Área de Microbiología (DFJ, GB, ICT).

Programa de aseguramiento de la calidad PROASECAL SAS, Bogotá, Colombia (GES).

Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Colombia.

Cátedra Microbiología Clínica (GES).

Establecimiento de realización del estudio: Fundación Clínica Shaio, Bogotá, Colombia.

Los investigadores declaran no tener conflictos de interés. No hubo tipo alguno de financiación de entidad alguna para este estudio.

Recibido: 18 de febrero de 2017  
Aceptado: 16 de enero de 2018

## Correspondencia a:

Diego Fernando Josa Montero  
diego.josa@shaio.org  
diegoshao@gmail.com



sivo (UCI), Unidad de Cuidado Cardiovascular (UCC) y de hospitalización general.

**Criterios de inclusión:** Edad mayor a 18 años, pacientes remitidos de otra institución, paciente con aislamiento previo por microorganismos multi-resistentes, paciente de hogar geriátrico y quienes presentaron hospitalización, cirugía, y/o tratamiento antimicrobiano con carbapenémicos en los últimos tres meses.

**Muestras:** A cada uno de los pacientes se les realizó hisopado rectal por duplicado, utilizando dos hisopos plásticos de dacrón. Después de tomada la muestra rectal, estos hisopos se depositaron en un tubo de vidrio con 2 mL de solución salina estéril para su homogenización y transporte al laboratorio de microbiología.

### Métodos a evaluar

**Método 1:** *Agar ChromID CARBA*<sup>®</sup> (bioMérieux, Francia). Agar cromogénico que permite la recuperación de microorganismos resistentes a carbapenémicos directamente a partir de hisopados rectales, suplementado con antimicrobianos que inhiben la microbiota acompañante. Adicionalmente, contiene cromógenos que facilitan la identificación presuntiva del microorganismo. Requiere de un tiempo de incubación de 24 a 48 h.

**Método 2:** *HB&L Carbapenemase Kit*<sup>®</sup> (Alifax, Italia). Consiste de viales con caldo nutritivo, con aditivo de carbapenémicos y antifúngicos, los que son leídos por nefelometría laser en el equipo HB&L<sup>®</sup> (Alifax, Italia) arrojando un recuento bacteriano de las bacterias resistentes. Este kit nos permite la detección de microorganismos productores de carbapenemasas en muestras de hisopado rectal en un tiempo máximo de 6 h.

**Método 3:** *Xpert CARBA-R*<sup>®</sup> (Cepheid, E.U.A.): Es una técnica que utiliza reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RPC-TR) para la detección rápida (1 h) de microorganismos productores de carbapenemasas, a partir de muestra directa de hisopado rectal. El cartucho de prueba se ingresa al equipo GeneXpert (Cepheid, E.U.A.), que a través de sondas específicas revela la presencia de los genes productores de carbapenemasas, entre los cuales están: *KPC*, *VIM*, *IMP-1*, *NDM* y *OXA-48*.

**Método de referencia:** Para comparar los métodos en estudio, tomamos como referencia el "Protocolo para detección de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* productoras de carbapenemasas en hisopados rectales" del Centers for Disease Control and Prevention-CDC (Atlanta, E.U.A.)<sup>14</sup>. Además, se incluyó el método de tamizaje directo con discos de ertapenem y meropenem en agar MacConkey, como está ampliamente descrito en la literatura científica<sup>3,15</sup>.

### Procesamiento: Protocolo de montaje de pruebas

A cada muestra de hisopado rectal se les realizó los siguientes procedimientos, de manera controlada

y simultánea, para evitar variaciones e interferencias y poder así, obtener resultados confiables en el desarrollo del estudio.

Se tomaron 73 muestras de hisopado rectal de pacientes de los siguientes servicios: 39 del servicio de urgencias, 16 de UCI adultos, 9 de UCI cardiovascular y 9 pacientes de hospitalización general, quienes cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

Estos hisopados rectales contenidos en los tubos con solución salina estéril se homogenizaron utilizando vortex por un minuto y se examinó visualmente y por coloración de Gram la calidad de la muestra. (Figura 1).

De esta suspensión se procedió a realizar cada uno de los métodos a comparar en el estudio, de la siguiente forma:

Para el *Método de referencia*, se colocó un disco de meropenem en 5 mL de caldo tripticosa soya y se inoculó 200 µL de la suspensión del hisopado rectal; se incubó a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se sub-cultivó 100 µL de este caldo en una placa de agar MacConkey, la que se incubó a 37 °C durante la noche. Al día 3 se examinaron las colonias fermentadoras de lactosa, las que se identificaron bioquímicamente por método automatizado y se les hizo pruebas confirmatorias para detección de carbapenemasas.

Adicionalmente, se inoculó de manera directa, 200 µL de la suspensión del hisopado rectal sobre una placa de agar MacConkey y se sembró de forma masiva utilizando un hisopo estéril, luego se colocó un disco de ertapenem de 10 µg y meropenem de 10 µg y se llevó a incubación a 37 °C.

Al día siguiente, se observó la presencia de colonias fermentadoras de lactosa alrededor de los discos en un halo de inhibición menor a 19 mm de diámetro. Estas colonias se identificaron por método automatizado y se les hizo pruebas confirmatorias para detección de carbapenemasas.

200 µL fueron inoculados en el cromoaagar *ChromID CARBA*<sup>®</sup> (Método 1) y se realizó siembra por agotamiento. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h. Los agaros fueron revisados para crecimiento a las 24, 36 y 48 h de incubación.

Para el *Método 2*, se tomó 200 µL de la suspensión inicial y se depositó en el vial del *kit HB&L Carbapenemase*<sup>®</sup> el que contenía el caldo de enriquecimiento y se le adicionó 200 µL del mix de carbapenémicos e inhibidores contenidos en el kit. Luego, se introdujo en el equipo automatizado HB&L Light durante 6 h. Se observó la curva de crecimiento y recuento expresado en ufc/mL, clasificándose como positivo cualquier recuento expresado, incluso hasta el valor mínimo detectado por el equipo correspondiente a < 50 ufc/mL. Cada vial positivo fue subcultivado en agar MacConkey, con el fin de obtener crecimiento de estas poblaciones multi-resistentes.

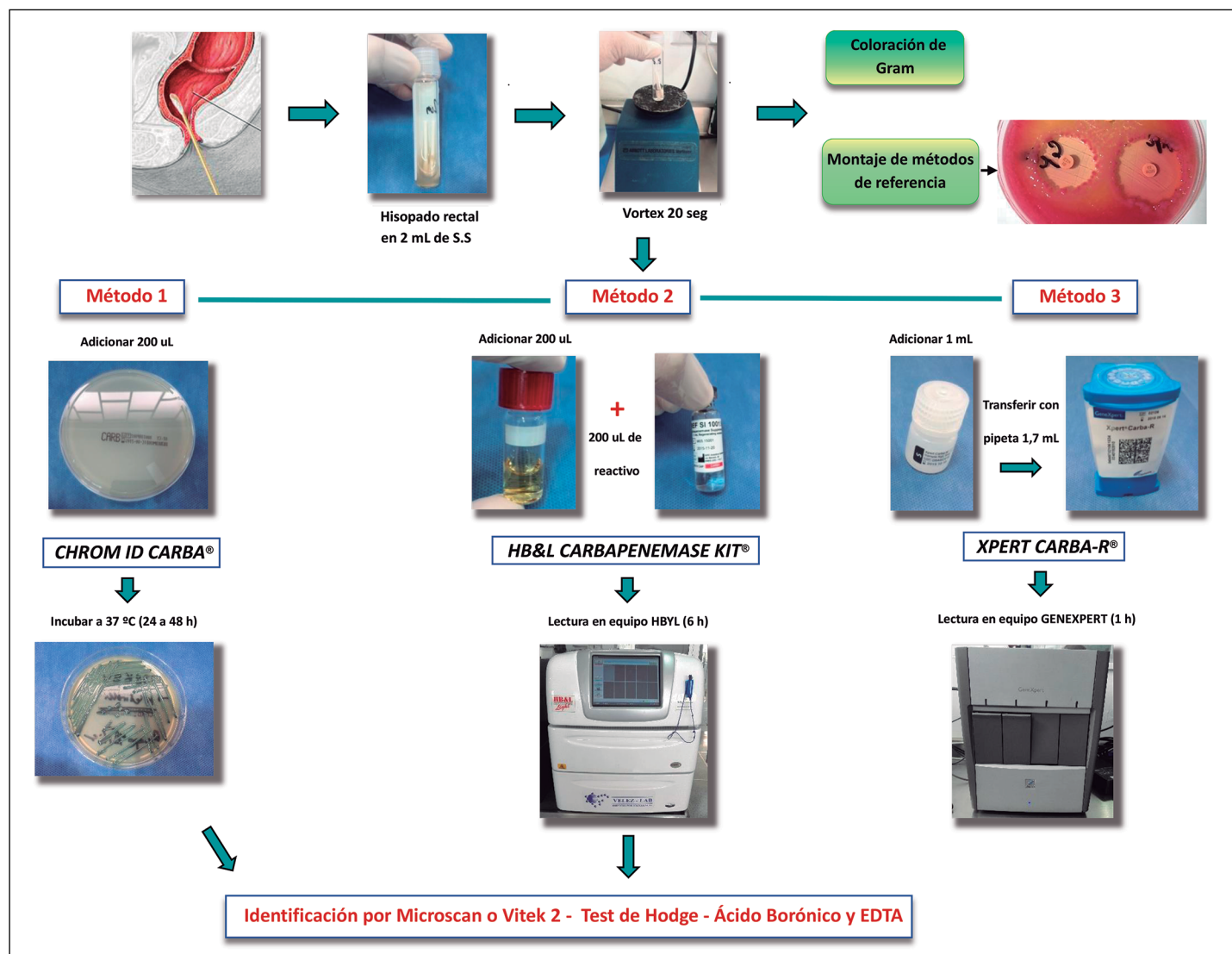


Figura 1. Protocolo de montaje de los tres métodos comparados.

Adicionalmente se extrajo 1 ml de cada vial positivo para preparar una suspensión con escala MacFarland de 0,5 con solución salina, para la realización de pruebas de identificación, perfil de susceptibilidad por sistema automatizado, test de Hodge, sinergia con ácido borónico y EDTA, de manera directa, y ver la concordancia con el método convencional (Figura 1).

Para realizar el Método 3, Xpert Carba-R® se seleccionaron 33 de los 73 hisopados rectales. Esta técnica se aplicó a todos los aislados positivos por los métodos 1 y 2 (20 en total) y se escogieron al azar muestras negativas (14 en total). Se tomó 1 mL de la suspensión del hisopado rectal, se colocó dentro del frasco de reactivo de preparación contenido en el kit y se dejó por un tiempo de 5

minutos. Después de este tiempo, se tomaron 1,7 mL y se inocularon dentro del cartucho del ensayo. Se programó en el equipo GeneXpert® y se dejó en proceso durante 1 h. Se tuvo en cuenta el inicio de ciclo de amplificación y los diferentes genes detectados.

#### Pruebas de identificación, susceptibilidad y pruebas confirmatorias

Todos los bacilos gramnegativos recuperados en los métodos 1 y 2, y del método de referencia, fueron procesados utilizando equipos automatizados de microbiología (5 con Microscan Walkaway® Beckman Coulter Inc y 68 con Vitek 2 Compact® bioMérieux Durham NC) para su identificación y perfil de susceptibilidad por método de



microdilución. Igualmente, se realizó Test de Hodge de acuerdo con las guías de Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) y pruebas de sinergia con ácido borónico y con EDTA en agar Mueller Hinton para la clasificación del tipo de carbapenemasa, según los protocolos del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS).

**Controles de prueba:** Como control positivo se utilizó *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (*blaKPC+*) y como control negativo *K. pneumoniae* ATCC 700603 que expresa una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Ambos controles fueron procesados por los tres métodos, de igual forma que las muestras de los pacientes.

A cada uno de los métodos se determinó su concordancia neta, sensibilidad, especificidad, valor predictor positivo (VPP) y valor predictor negativo (VPN).

## Resultados

Durante el período del estudio se recolectó un total de 73 muestras de hisopado rectal, de 73 pacientes de diferentes servicios de nuestra institución, 34 pacientes (46,5%) fueron del sexo femenino y 39 pacientes (53,5%) de sexo masculino. El rango de edad de los pacientes estuvo entre 35 y 80 años.

### Método 1: Agar ChromID CARBA®

De las 73 muestras de pacientes, se obtuvo un total de 20 hisopados rectales positivos (27,4%) y 48 hisopados negativos (65,7%). Cinco muestras correspondieron a falsos positivos (6,9%) (Figura 2). Los hisopados positivos tuvieron crecimiento de colonias en un tiempo de 24 a 36 h de incubación a 37 °C. Se recuperaron colonias de color morado sugestivas de *E. coli* y colonias color azul verdoso sugestivas de *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp, lo cual evidenció muy buena correlación con la identificación arrojada por los sistemas automatizados.

La mayoría de los cultivos en este cromóagar fueron monomicrobianos, es decir que sólo tenían una población multi-resistente, pero en sólo un caso se presentó el crecimiento de dos especies de bacterias con resistencia a carbapenémicos.

De los 20 hisopados rectales positivos por este cromó-agar, se logró identificar a los siguientes microorganismos multi-resistentes: *K. pneumoniae* en 65%, con 13 aislamientos, *Citrobacter freundii* se recuperó en 3 muestras (15%), *E. coli* en 2 muestras (10%), *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, cada uno con un aislamiento (5% cada uno) (Figura 3). A estos microorganismos recuperados (excepto *P. aeruginosa*), se les realizó test de Hodge, pruebas de ácido borónico y EDTA para identificar el tipo de carbapenemasa presente, de las cuales sólo 16 fueron dieron test de Hodge y ácido borónico positivo y EDTA negativo, indicando que fenotípicamente correspondían a carbapenemasas de tipo serina (Tabla 1).

Respecto a los 5 falsos positivos (6,9%), correspondieron a colonias de color blanco y otras de color café, las que fueron identificadas por sistema automatizado como *Stenotrophomonas maltophilia* y *P. aeruginosa*, respectivamente, con perfiles de resistencia usual, las que forman parte de nuestra microbiota intestinal y no son tan relevantes epidemiológicamente como las especies fermentadoras.

Los cultivos de hisopados rectales negativos, fueron incubados hasta las 48 h para su reporte final, dado que se observó que algunas especies de *E. coli*, eran las más lentas en crecer en este agar.

El índice de concordancia de este método fue de 93,2%, sensibilidad de 100%, especificidad de 90%, VPP: 80% y VPN: 100% (Tabla 2).

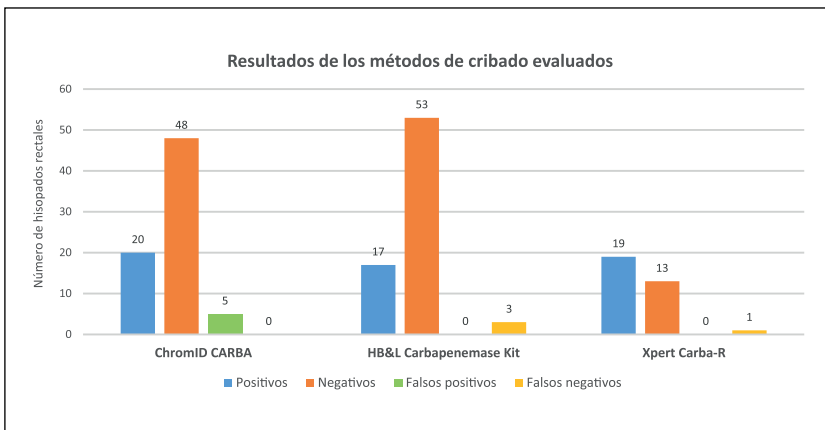


Figura 2. Resultados de los métodos de tamizaje evaluados.

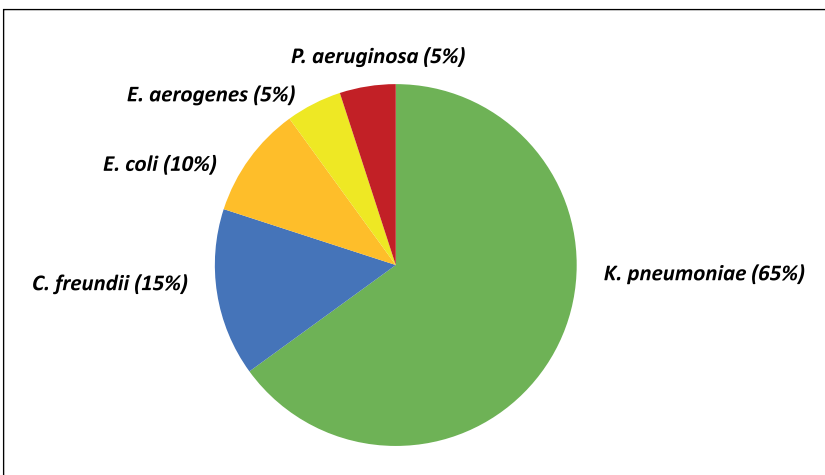


Figura 3. Distribución de los microorganismos productores de carbapenemasas detectados en los hisopados rectales positivos.



**Tabla 1. Resultados de los 20 hisopados rectales positivos por las tres metodologías, con su identificación por sistema automatizado, concentración mínima inhibitoria (CIM) de cada carbapenémico y pruebas fenotípicas**

n	Identificación Microscan/Vitek	ERT	MER	IMI	TH	A.B	EDTA	CHROM ID CARBA®	Color de colonias	Tiempo (horas)	Resultado	Recuento (ufc/mL)	Tiempo (horas)	Ciclo de amplificación	Gen detectado*
	Control Positivo	> 4	> 8	-	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	20.000.000	4 h	24	KPC
1	<i>E. aerogenes</i>	> 4	8	-	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	20.000.000	2 h	24	KPC
2	<i>C. freundii</i>	2	> 1	> 1	-	-	-	Blancas	24	24	+	700.000	6 h	30	KPC
3	<i>K. pneumoniae</i>	> 2	> 8	8	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	10.000.000	4 h	27	KPC
4	<i>K. pneumoniae</i>	< 1	< 1	-	-	-	-	Azul verdoso	36	36	-	0	6 h	22	KPC
5	<i>C. freundii</i>	< 1	< 1	-	-	-	-	Azul verdoso	36	36	-	0	6 h	27	KPC
6	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	> 8	-	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	50.000	6 h	24	KPC
7	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	4	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	5.000.000	6 h	21	KPC
8	<i>P. aeruginosa</i>	N/A	> 16	> 16	N/A	N/A	-	Café	30	30	+	2.000.000	6 h	27	VIM, KPC
9	<i>K. pneumoniae</i>	> 8	> 16	8	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	3.000.000	6 h	28	KPC
10	<i>K. pneumoniae</i>	> 8	> 16	8	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	15.000.000	4 h	23	KPC
11	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	-	+	+	-	Azul verdoso (1 sola colonia)	24	24	-	0	6 h	-	No detectado
12	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	-	+	+	-	Azul verdoso	30	30	+	5.000.000	6 h	21	KPC
13	<i>E. coli</i>	> 8	4	-	+	+	-	Morado	30	30	+	7.000.000	6 h	35	KPC
14	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	-	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	20.000.000	6 h	21	KPC
15	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	-	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	5.000.000	6 h	16	KPC
16	<i>E. coli</i>	< 0,5	> 16	> 16	+	+	-	Morado	48	48	+	12.000.000	4 h	19	KPC
17	<i>K. pneumoniae</i>	4	> 16	8	+	+	-	Azul verdoso	24	24	+	5.000.000	6 h	21	KPC
18	<i>K. pneumoniae</i>	> 8	> 16	8	+	+	-	Azul verdoso	30	30	+	700.000	6 h	14	KPC
19	<i>C. freundii</i>	> 8	> 16	> 16	+	+	-	Azul verdoso	30	30	+	12.000.000	4 h	16	KPC
20	<i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i>	4/> 8	> 16/> 16	> 16/> 16	+	+	-	Azul verdoso y Morado	24	24	+	4.000.000	6 h	17	KPC
	Control negativo	-	-	-	-	-	-	Negativo	-	-	-	0	-	-	Negativo

(ERT: ertapenem, MER: meropenem, IMI: imipenem, TH: Test de Hodge, A.B: Test con ácido borónico, EDTA: Test con EDTA, N/A: no aplica. \*Tiempo de detección: 1 (hora). Puntos de corte CLSI 2016).



Tabla 2. Resultados de los índices de concordancia de los tres métodos evaluados

Método	Índice de concordancia (%)	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
ChromID CARBA	93,2	100	90	80	100
HB&L Carbapenemase Kit	95,9	85	100	100	94
Xpert CARBA-R	97	95	100	100	95

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

### Método 2: HB&L Carbapenemase Kit®

Por este método se procesaron los 73 hisopados rectales, obteniéndose positividad en 17 de ellos (23,3%) y 53 fueron negativos (72,6%). Se presentaron 3 falsos negativos (4,1%) y ningún falso positivo. El tiempo de detección por este método fue de 6 h, aunque en algunos casos se obtuvo recuentos a las 2 y 4 h de incubación.

Los recuentos bacterianos expresados en ufc/mL de los viales positivos fueron muy variados, estando entre rangos de 50.000 ufc/mL y 20.000.000 ufc/mL.

Se presentaron 3 falsos negativos (4,1%), en los que no hubo curva de crecimiento ni recuento alguno, a diferencia del ChromID CARBA donde sí se obtuvo crecimiento. Uno de estos casos fue debido a la baja carga bacteriana por el bajo inóculo de muestra que traían inicialmente y los otros dos casos correspondieron a dos microorganismos que tampoco los sistemas automatizados pudieron detectarlos, evidenciando CIM a ertapenem y meropenem  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ , y pruebas fenotípicas igualmente negativas (Tabla 1). Según los resultados obtenidos, el índice de concordancia fue de 95,9%, sensibilidad de 85%, especificidad del 100%, VPP: 100% y VPN: 94% (Tabla 2).

Tanto la identificación, perfil de susceptibilidad por sistema automatizado y pruebas fenotípicas como el test de Hodge, sinergia con ácido borónico y EDTA, realizadas a partir de la suspensión de la alícuota del vial positivo con solución salina fisiológica en escala MacFarland de 0,5, tuvieron 100% de concordancia con el método convencional.

### Método 3: Xpert Carba- R®

Del total de muestras (73) de hisopado rectal, se procesaron en total 33 muestras por este método de RPC-TR, siendo positivas 19 (57,5%) y 13 negativas (39,4). Solo se presentó 1 falso negativo que correspondió a 3,1% y ningún falso positivo (Figura 2).

El ciclo de amplificación en el que se empezó a ver positividad por esta prueba fue, en promedio, el ciclo 20-25, aunque en algunas muestras empezó a observarse la amplificación del gen alrededor del ciclo 30 a 35. El tiempo promedio de detección de esta prueba fue 56 min. No se presentaron errores de prueba, ni inhibidores de

RPC, pues todas las muestras positivas por los otros dos métodos fueron también positivas por este ensayo.

Cabe aclarar que esta metodología sólo detecta el gen presente en la muestra, pero no identifica el microorganismo. Para lo cual debemos disponer de una siembra alterna para luego poder realizar la identificación de género y especie. De esta identificación bacteriana pudo relacionarse los diferentes microorganismos y el tipo de gen presente: 13 *K. pneumoniae* con gen *blaKPC*, 3 *C. freundii* con gen *blaKPC*, 2 *E. coli* con gen *blaKPC*, 1 *E. aerogenes* con gen *blaKPC* y sólo un aislamiento de *P. aeruginosa* que presentó los genes *blaVIM* y *blaKPC* simultáneamente (Tabla 1).

Se obtuvo una sensibilidad de 95%, especificidad de 100%, VPP: 100% y VPN: 94%, con un índice de concordancia de 97%, siendo el valor más alto, en comparación con los otros métodos (Tabla 2).

Los controles de prueba, tanto positivo como negativo, fueron acertados para cada uno de los métodos. La cepa ATCC *K. pneumoniae* BAA 1.705 obtuvo un buen crecimiento en el agar ChromID CARBA con tiempo promedio de crecimiento a las 24 h de incubación. En el vial de HB&L Carbapenemase tuvo positividad a las 4 h de incubación, con un recuento de 20.000.000 ufc y por el cartucho de prueba de Xpert Carba-R detectó la presencia del gen *blaKPC*. El control negativo fue negativo por las tres metodologías.

## Discusión

Las EPC siguen en aumento considerable, asociándose a altas tasas de mortalidad y morbilidad, particularmente en pacientes con estancia hospitalaria prolongada o pacientes críticamente enfermos<sup>1,4,7-9,13</sup>.

Por su fácil diseminación, se requiere contar con un adecuado programa de medidas preventivas y de aislamiento, involucrando una vigilancia activa como se encuentra recomendado en guías internacionales<sup>1-7,16-19</sup>.

La implementación de toma de muestras de hisopados rectales es uno de los métodos más sencillos para lograr acciones eficientes en el aislamiento hospitalario y una eficaz participación de los programas de control de infecciones. Diferentes estudios han demostrado la efectividad de las muestras de hisopado rectal para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas, a través de diferentes métodos fenotípicos convencionales y moleculares de RPC-TR<sup>2,3,6,9,13,16-19</sup>.

En nuestra investigación, de los 73 pacientes estudiados, se encontró un total de 20 pacientes colonizados con microorganismos productores de carbapenemasas (27,4%), con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) elevadas a ertapenem entre 4 - > 8  $\mu\text{g/mL}$ , meropenem entre 8 - > 16  $\mu\text{g/mL}$  y en algunos casos, elevadas tam-



bién para imipenem; a excepción de dos aislados (*K. pneumoniae* y *C. freundii*) que no fueron detectados por el sistema automatizado, expresando CIM  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  para ertapenem y meropenem (Tabla 1).

Sólo se presentó un caso donde la cantidad de muestra era insuficiente y sólo fue posible detectar la presencia de *K. pneumoniae* KPC en el agar ChromID CARBA, observándose el crecimiento de 1 ufc), lo que fue interpretado como un falso negativo en los métodos HB&L Carbapenemase y Xpert - Carba-R. Por lo anterior, la adecuada toma del hisopado rectal se convierte en un parámetro relevante al momento de hacer este tipo de tamizaje.

El uso del agar cromogénico tiene como ventajas su fácil implementación, nos brinda una identificación presuntiva del microorganismo, es de bajo costo y no se requiere elementos o equipos adicionales<sup>2,9,12,18</sup>. Su mayor desventaja es el tiempo de respuesta (24 a 36 h), pues no permite tomar medidas preventivas de forma temprana comparativamente con los métodos 2 y 3 (6 h y 1 h, respectivamente). Se observó que las especies de *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*, crecieron más rápidamente (24 h) que las especies de *E. coli*, las que requirieron alrededor de 30 h de incubación. Cabe mencionar que hubo excelente correlación entre los colores de las colonias en el cromoagar y la identificación arrojada por los sistemas automatizados.

Relativo al método 2, HB&L Carbapenemase Kit, se logró también una alta recuperación de microorganismos multi-resistentes. Esta metodología, por estar basada en medio líquido, permite obtener resultados muy rápidos (6 h) en comparación con el agar cromogénico, lo que lo convierte en uno de los métodos más rápidos y económicos disponibles en el mercado.

La característica de ser un medio líquido le da la ventaja de permitir la identificación, perfil de susceptibilidad en los sistemas automatizados y montaje de pruebas fenotípicas, a partir de una alícuota del vial positivo, suspendida en solución salina, lo que demostró que no hay variaciones con el método convencional, ya que obtuvimos una buena concordancia en nuestro estudio. Cabe aclarar que se requieren más estudios con un N superior para recomendar el uso directo en protocolos institucionales.

Existe también la posibilidad de realizar ensayos para la identificación del microorganismo multi-resistente directamente del vial positivo a través de metodologías de proteómica, como Maldi-TOF, lo cual permitiría resultados rápidos en cuanto a confirmación de especie.

Es importante mencionar, que, por esta metodología, es posible recuperar crecimiento de *P. aeruginosa* de perfil usual, por lo cual, se debe seguir la recomendación del inserto de esta prueba, de hacer una prueba de oxidasa al vial positivo, para evitar falsos positivos. En nuestro

estudio, viales que dieron oxidasa positiva se sembraron igualmente en agar MacConkey con el fin de corroborar que se trataban de *P. aeruginosa* con perfiles usuales de resistencia.

En cuanto al método molecular Xpert CARBA-R, en nuestro estudio se procesaron todas las muestras que fueron positivas por los dos métodos anteriores con el fin de confirmar la presencia del gen expresado y se escogió cierto número de muestras negativas al azar. Este método, comparado con el de referencia, (microdilución y fenotípico), obtuvo el mayor índice de concordancia (97%). Sólo presentó un error en una muestra, lo que se interpretó como un falso negativo; como ya se mencionó anteriormente, esta muestra presentó bajo inóculo bacteriano al momento de su obtención. Igualmente se consideró que el resultado negativo por Xpert CARBA-R y positivo por los otros métodos, pudo deberse a un tipo o variante genético de carbapenemasa diferente a los incluidos en el kit.

Su mayor ventaja es la rapidez, al obtener resultados en aproximadamente una hora. Es un método de fácil montaje y lectura en el equipo, no requiere de áreas especializadas y es capaz de detectar los principales genes de expresión de carbapenemasas como KPC, VIM, IMP-1, NDM y OXA-48; incluso es capaz de evidenciar la presencia de varios genes en una misma muestra, como fue en nuestro caso la detección simultánea de genes *blaVIM* y *blaKPC* en un aislado de *P. aeruginosa*. Las guías internacionales para la detección y contención de carbapenemasas recomiendan principalmente la búsqueda en *Enterobacteriaceae*; sin embargo, algunos pacientes pueden estar colonizados de forma transitoria o intermitente por bacilos gramnegativos no fermentadores productores de carbapenemasas como se evidenció en el presente trabajo. Sugerimos implementar barreras de contacto para estos pacientes en el contexto específico comentado aquí.

La mayor desventaja de este método molecular es el elevado costo de las pruebas, lo que dificulta en algunos casos su implementación.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio ofrecen información valiosa de las diferentes metodologías disponibles en el mercado para la búsqueda y detección rápida de microorganismos productores de carbapenemasas en hisopados rectales, que podrían implementarse de rutina en las instituciones de salud como medida de vigilancia activa.

Concluimos que ningún método es completo y perfecto, muchos de ellos muestran variaciones; el agar ChromID CARBA presentó la mayor sensibilidad pero una baja especificidad, el método molecular Xpert Carba-R® evidenció excelente especificidad y una sensibilidad de 95%, pero los costos de su implementación son elevados; mientras que el método HB&L Carbapenemase® que aunque presentó menor sensibilidad (ya discutido ante-



riormente), tuvo igualmente una excelente especificidad y siendo una prueba no molecular, es un método muy rápido, de menor costo, con buen desempeño y concordancia. Finalmente, podríamos considerar la combinación o uso de dos métodos si queremos aumentar el rendimiento y efectividad en el tamizaje, y cabe aclarar que el uso de pruebas moleculares si bien detecta la más impactantes clínicamente, puede perder nuevas variantes y otros mecanismos de resistencia cuya relevancia epidemiológica es desconocida aún.

La elección del método para cada una de las instituciones de salud debe tener como requisito un balance entre sensibilidad, especificidad, rapidez y costo efectividad.

*Agradecimientos.* Agradecemos a las diferentes casas comerciales *BioMérieux*, *Rochem Biocare* y *Velez Lab* quienes apoyaron la realización de esta investigación.

## Resumen

*Introducción:* Las *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas (EPC) han tomado gran importancia en salud pública a una escala global, haciendo necesario

implementar test rápidos para su detección oportuna. *Objetivo:* Evaluar tres metodologías para el tamizaje de EPC en hisopados rectales. *Materiales y Métodos:* Estudio prospectivo transversal. Se evaluaron 73 hisopados rectales por tres metodologías. Se realizó identificación y evaluación de susceptibilidad por sistemas automatizados y la producción de carbapenemasas se confirmó por test de Hodge modificado, sinergia con ácido borónico y EDTA. *Resultados:* *Método 1 (ChromID CARBA®):* detectó 20 muestras positivas (27,4%), 5 falsos positivos (6,9%), con índice de concordancia de 93,2%, sensibilidad 100% y especificidad de 90%. *Método 2 (HB&L Carbapenemase®):* detectó 17 muestras positivas (23,3%) y 3 falsos negativos (4,1%). La sensibilidad y especificidad fue 85 y 100% respectivamente, con concordancia de 95,9%. *Método 3 (Xpert Carba-R®):* detectó 19 muestras positivas (57,5%) y 1 falso negativo (3,1%), sensibilidad 95%, especificidad 100% e índice de concordancia de 97%. *Discusión:* Existe amplia variedad de metodologías para búsqueda y detección rápida de microorganismos productores de carbapenemasas. La elección del método debe tener como requisito una buena sensibilidad y especificidad, rapidez y costo efectividad.

## Referencias bibliográficas

- 1.- Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, Zwet A. Evaluation of a new real time PCR assay (Check Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemasas using spiked rectal swab. *Microbiol Infect Dis* 2013; 77 (4): 316-20. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.007. Epub 2013 Oct 14.
- 2.- Papadimitriou M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Zambardi G, Spiliopoulou I. Performance of chromID CARBA médium for carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 35-40 doi: 10.1007/s10096-013-1925-6. Epub 2013 Aug 4.
- 3.- Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden M. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (3): 836-41.
- 4.- Singh K, Mangold K, Wyant K, Schora D, vos B, Kaul K, et al. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas: comparison of real time PCR and culture using two selective screening agar plate. *J. Clin. Microbiol* 2012; 50 (8): 2596-600. doi: 10.1128/JCM.00654-12. Epub 2012 May 23.
- 5.- Hoenigl M, Valentin T, Zarfel G, Wuerstl B, Leitner E, Slazer H, et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56 (4): 2158-61. doi: 10.1128/AAC.05440-11.
- 6.- Lerner A, Romano J, Chmelnitsky I, Navon S, Edgar R, Carmeli Y. Rectal swab are suitable for quantifying the carriage load of KPC producing carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (3): 1474-9. doi: 10.1128/AAC.01275-12. Epub 2013 Jan 7.
- 7.- Schechner V, Kotlovsky T, Hazma M, Mishali H, Schwartz D, Carmeli Y, et al. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 451-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03888.x. Epub 2012 May 7.
- 8.- Correa L, Valle M, Siqueira I, Pasternak J, Gales A, Silva C, et al. A hospital based matched case control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infect Dis* 2013; 13 (80). doi: 10.1186/1471-2334-13-80.
- 9.- Panagea T, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar KPC for the detection of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37 (2): 124-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.010. Epub 2010 Dec 21.
- 10.- Córdova E, Lespada M, Gómez N, Pasteran F, Oviedo V, Rodríguez C. Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30 (7): 376-9. doi:10.1016/j.eimc.2011.12.003.
- 11.- Villegas M, Lolans K, Correa A, Suárez C, López J, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (8): 2880-2.
- 12.- Errecalde L, Cogut S, Erbin M, Jorda L, Cattani E, Posse T, et al. CHROMagar KPC. Comparación con el método opuesto por los Centros para el Control y Prevención de enfermedades (CDC, E.U.A.) para el estudio de portación rectal y evaluación de falsos positivos. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44: 89-93.
- 13.- Giani T, Tascini C, Arena F, Ciullo I, Conte V, Leonildi A, et al. Rapid detection of intestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase during an outbreak. *J Hosp Infect* 2012; 81 (2): 119-22 doi: 10.1016/j.jhin.2012.04.004.
- 14.- Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from



- rectal swabs. CDC. [https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella\\_or\\_ecoli.pdf](https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf).
- 15.- Blackburn J, Tsimiklis C, Lavergne V, Pilotte J, Grenier S, Gilbert A, et al. Carbapenem disks on MacConkey agar in screening methods for detection of carbapenem-resistant gram-negative rods in stools. *J. Clin. Microbiol* 2013; 51 (1): 331-3. doi: 10.1128/JCM.02878-12.
- 16.- Rizek C, Cavalcanti L, Leite G, Ramos J, Rossi F, Guimaraes T, et al. Characterization of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 43. doi: 10.1186/s12941-014-0043-3.
- 17.- Vrioni G, Daniil L, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swab. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (6): 1841-6. doi: 10.1128/JCM.06848-11.
- 18.- Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (6): 1841-6. doi: 10.1128/JCM.02566-10. Epub 2011 Apr 6.
- 19.- Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo L, Vrioni G, Tsakris A, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (9): 2986-90. doi: 10.1128/JCM.00901-13.