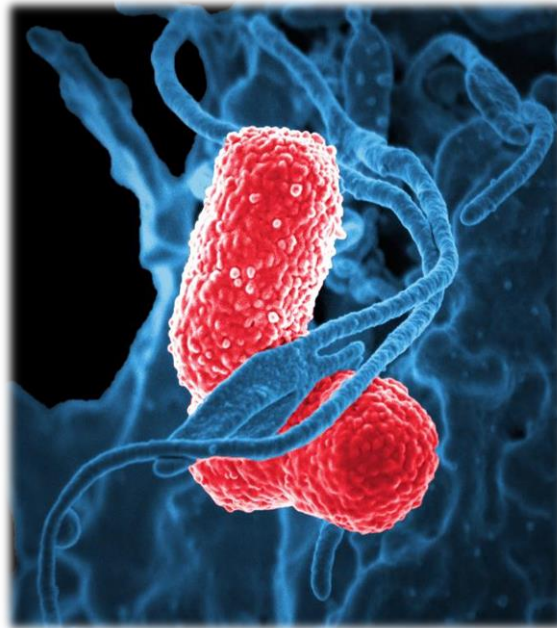


Métodos de detección rápida de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*

Rapid methods for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*



Microfotografía electrónica de barrido coloreada de *Klebsiella pneumoniae*.
Tomada de *Center for Disease Control and Prevention's Image Library*.

Trabajo de Fin de Grado

NOELIA CABRERA MONROY

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth y Diego García Martínez de Artola.

Grado en Biología. Septiembre 2020.

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. Resistencia a antibióticos en la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.2. Antibióticos carbapenémicos	2
1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos	3
1.3.1. Resistencia mediada por la producción de carbapenemasas	4
1.4. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPCs).....	6
1.4.1. Detección de carbapenemasas con métodos fenotípicos	8
1.4.2. Detección de carbapenemasas con métodos moleculares	8
1.4.3. Detección de carbapenemasas con métodos proteómicos	9
1.5. Necesidad de la detección rápida de carbapenemasas	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo General	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. Metodología	12
3.1. Estrategia de búsqueda y criterios de selección bibliográfica	12
4. Resultados y Discusión	13
4.1. Detección directa de carbapenemasas a partir de muestras biológicas	13
4.1.1. Métodos moleculares	14
4.1.1.1. PCR en tiempo real.	14
4.1.1.2. PCR múltiple en tiempo real.	15
4.1.1.3. Microarrays de ADN.....	17
4.1.2. Métodos fenotípicos.....	18
4.1.3. Métodos proteómicos.....	21
4.2. Limitaciones de la detección directa a partir de la muestra.....	21
4.3. Perspectivas futuras del diagnóstico rápido de EPCs.....	23
5. Conclusiones	25
Conclusions	25
6. Bibliografía	26

Resumen

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos en la familia *Enterobacteriaceae* supone uno de los mayores desafíos sanitarios. El principal mecanismo de resistencia es la producción de carbapenemasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de los carbapenémicos. Estas enzimas dan lugar a perfiles de resistencia muy dispares según la clase de carbapenemasa, siendo la detección y diferenciación temprana de cada una de ellas de vital importancia a la hora de proporcionar un tratamiento antibiótico adecuado. En la actualidad existe una gran variedad de métodos para la detección de carbapenemasas. La aplicación de la mayoría de dichos métodos depende del aislamiento en cultivo puro del microorganismo objeto de estudio. En este trabajo se llevó a cabo una extensa revisión bibliográfica sobre aquellos métodos centrados en la detección de carbapenemasas en enterobacterias directamente a partir de la muestra biológica. Aunque son necesarios estudios adicionales, la detección rápida de carbapenemasas, sin necesidad de aislar la bacteria, ofrece información clínica de gran utilidad que contribuye para la instauración de un tratamiento antibiótico adecuado.

Palabras clave: *Enterobacteriaceae*, carbapenemasas, detección rápida.

Abstract

Resistance to carbapenems antibiotics in the *Enterobacteriaceae* family poses one of the greatest microbiological challenges. The main mechanism of resistance is the production of carbapenemases that hydrolyze the β -lactam ring of carbapenems. These enzymes give rise to very different resistance profiles according to the class of carbapenemase, being the early detection and differentiation of each one of them of vital importance for providing an adequate antibiotic treatment. Currently there are a wide variety of methods for the detection of carbapenemases. The application of most of these methods depends on the isolation in pure culture of the microorganism under study. In this work, an extensive bibliographic review was carried out on those methods focused on the detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* directly from the biological sample. Although additional studies are necessary, the rapid detection of carbapenemases without the need to isolate the bacteria, offers highly useful clinical information that contributes to the establishment of an adequate antibiotic treatment.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, carbapenemases, rapid detection.

1. Introducción

1.1. Resistencia a antibióticos en la familia *Enterobacteriaceae*

El hallazgo casi fortuito de la penicilina dio paso a una nueva época revolucionaria en la que el desarrollo exponencial de nuevos antibióticos marcó un antes y un después en el ámbito sanitario (Suárez *et al.*, 2009). No obstante, como consecuencia del uso masivo y descontrolado de los antibióticos rápidamente aparecieron bacterias resistentes frente a los mismos. La resistencia bacteriana a los antibióticos supone una gran amenaza para la salud pública, y pone en peligro la supervivencia de la medicina moderna (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2016; WHO, 2017)

En la actualidad resulta especialmente preocupante la diseminación global de bacterias gram-negativas multirresistentes, es decir, que muestran resistencia a muchos de los antibióticos habitualmente empleados para combatirlas. Uno de los ejemplos más dramáticos se da en la familia *Enterobacteriaceae*, aunque también es frecuente en otras bacterias gram-negativas como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo heterogéneo de bacilos gram-negativos ampliamente distribuido en la naturaleza. Además de ser miembros de la microbiota intestinal, entre las enterobacterias se encuentran especies que son responsables de una gran proporción de infecciones graves que amenazan la vida y que han incorporado numerosos mecanismos de resistencia frente a la gran mayoría de antibióticos. La resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos empleados para tratar a las enterobacterias es un problema mundial (Cui *et al.*, 2019; Pascual *et al.*, 2014).

1.2. Antibióticos carbapenémicos

Los carbapenémicos son antibióticos que tienen amplio espectro y gran potencia frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas, siendo ampliamente utilizados para tratar infecciones causadas por las enterobacterias. Pertenecen a la familia de los antibióticos β -lactámicos que incluye a las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. Los carbapenémicos a menudo se usan como *antibióticos de último recurso* cuando los pacientes con infecciones se enferman gravemente o se sospecha que albergan una bacteria resistente (Nordmann *et al.*, 2012a).

La tienamicina fue el primer carbapenémico descubierto en 1976 como un producto natural de *Streptomyces catleya* (Kahan *et al.*, 1979). A partir de su estructura

se desarrollaron carbapenémicos sintéticos más estables como el meropenem, ertapenem y doripenem, que conservan la estructura básica y el mecanismo de acción (**Figura 1**).

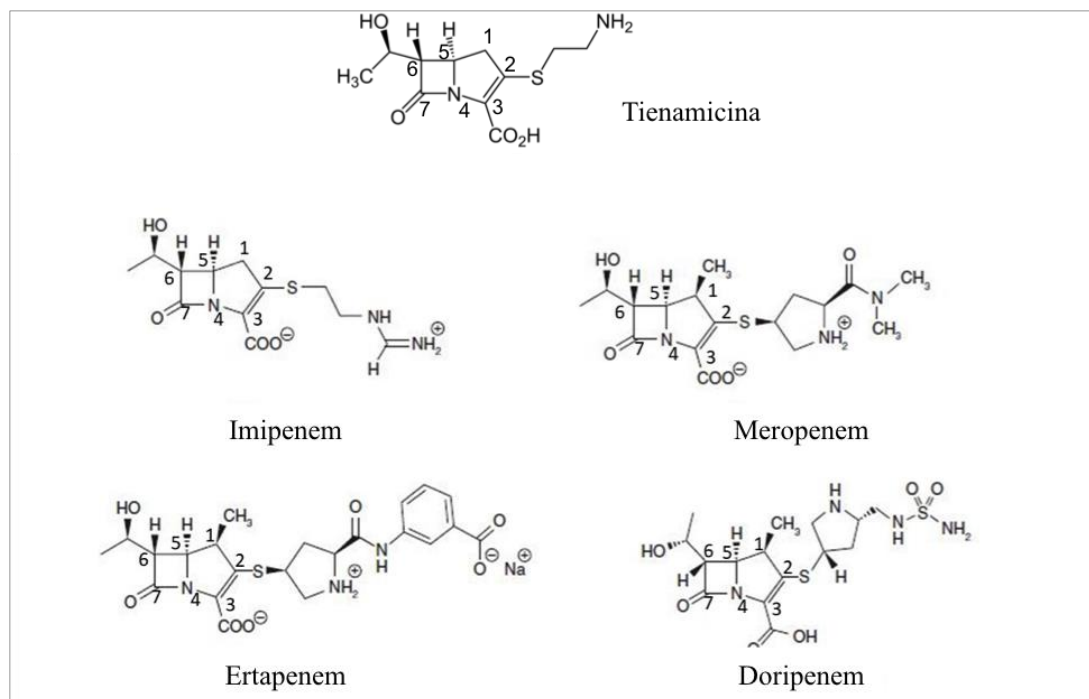


Figura 1. Representación de la estructura química de los principales tipos de carbapenémicos. Imagen adaptada de Fresnadillo Martínez *et al.*, 2010 y Kahan *et al.*, 1979.

Los carbapenémicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana durante la transpeptidación desestabilizando su estructura molecular. Se unen a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas Proteínas que Fijan Penicilinas (PBPs, del inglés, *Penicillin Binding Protein*). La pared celular se debilita dando lugar a la lisis bacteriana. Por ello, se consideran habitualmente como antibióticos bactericidas (Fresnadillo Martínez *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2009).

1.3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos

La resistencia a carbapenémicos en bacterias gram-negativas constituye un problema sanitario a nivel global que continúa en crecimiento (Nordmann *et al.*, 2019). Existen múltiples evidencias que sugieren que aquellos pacientes infectados o colonizados con patógenos resistentes a carbapenémicos tienen mayor probabilidad de morbi-mortalidad que los infectados por patógenos sensibles (van Duin *et al.*, 2013).

En el año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un listado de prioridad global donde se incluyen aquellos patógenos resistentes a los antibióticos frente a los cuales es urgente y necesario obtener nuevos antibióticos para su tratamiento. En la categoría de prioridad más alta se incluyeron a las enterobacterias

resistentes a carbapenémicos (ERC), *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (WHO, 2017).

Se han descrito 4 mecanismos principales que confieren resistencia a carbapenémicos: la producción de enzimas β -lactamasas (carbapenemasas), la sinergia entre otras β -lactamasas y modificaciones en las porinas, las bombas de eflujo y las modificaciones en las PBPs (Fresnadillo Martínez *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2009). En ocasiones, se pueden encontrar en una misma bacteria varios de estos mecanismos simultáneamente, incluso diversas carbapenemasas, dando lugar a perfiles de susceptibilidad que complican su detección e interpretación (Bonomo *et al.*, 2018).

1.3.1. Resistencia mediada por la producción de carbapenemasas

Actualmente, el mecanismo clave de resistencia a carbapenémicos es la hidrólisis mediada por enzimas carbapenemasas (**Figura 2**). Las carbapenemasas constituyen la familia más versátil y potente de β -lactamasas con la habilidad de hidrolizar los carbapenémicos. Son comúnmente producidas por los denominados “organismos productores de carbapenemasas” (CPO, del inglés *Carbapenemase Producing Organisms*), teniendo especial relevancia clínica en los últimos años las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE, del inglés *Carbapenemase Producing Enterobacteria*), que se han diseminado globalmente (Miriagou *et al.*, 2010).

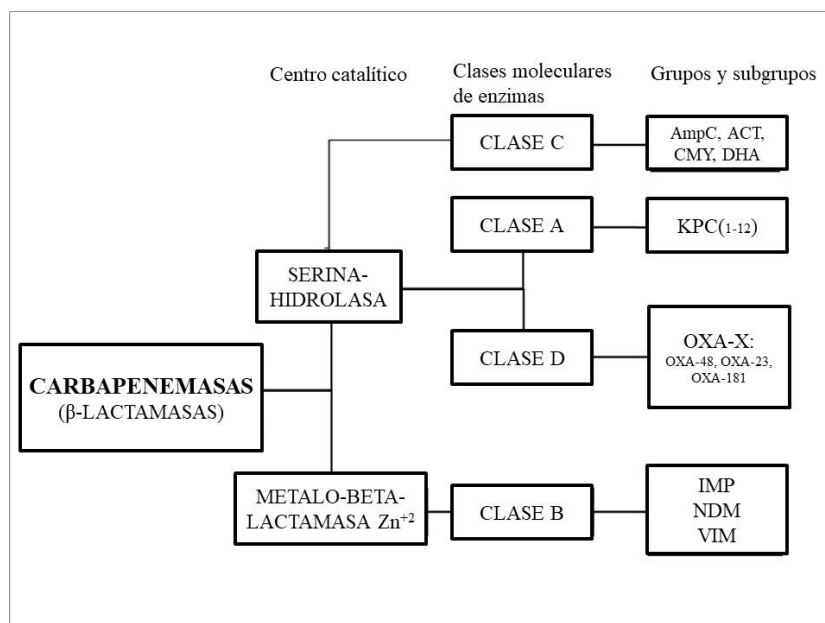


Figura 2. Clasificación resumida de los diferentes tipos de carbapenemasas según el dominio catalítico central y la preferencia de sustrato de cada una. Se muestran las 4 clases diferenciales de cada tipo y los grupos y subgrupos que conforman cada una de ellas. Dentro de cada subgrupo se contemplan las variantes alélicas de algunos genes como es el caso de *bla_{KPC}*, al cual se le asignan 12 variantes. Modificada de Peter *et al.*, 2012 y Richter *et al.*, 2012.

Los genes que codifican las carbapenemasas están ubicados principalmente en elementos genéticos que favorecen su persistencia (integrones) y transmisión (plásmidos, transposones) contribuyendo a su rápida dispersión (Suárez *et al.*, 2009).

Las carbapenemasas se clasifican por sus estructuras moleculares y pertenecen a 3 clases de β -lactamasas: las clases A, B y D del sistema de clasificación de Ambler (Meletis *et al.*, 2016). Las clases A y D requieren serina en el centro activo, mientras que la clase B, las metalo- β -lactamasas (MBLs) 1 o 2 iones de zinc para poder hidrolizar el anillo de lo β -lactámico (Ulyashova *et al.*, 2010).

Así, distintivamente se conocen:

1. La clase A o las *K. pneumoniae carbapenemasas* (KPCs) incluye enzimas que hidrolizan un amplio espectro de sustratos, que incluyen penicilinas, algunas cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos (Martínez-Martínez *et al.*, 2014).

2. La clase B o las metalo- β -lactamasas (MBLs), tales como la NDM (*New Delhi metallo- β -lactamasa*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) e IMP (*Imipenem metallo- β -lactamase*), (Nordmann *et al.*, 2012b). Poseen una amplia acción frente a casi todo el conjunto de los β -lactámicos, exceptuando monobactámicos. Además, pueden ser fácilmente diagnosticadas, ya que los quelantes como el EDTA inhiben la actividad de MBL al unirse al zinc (Martínez-Martínez *et al.*, 2014).

3. La clase D engloba a todas las oxacilinasas conocidas con nomenclatura OXA-X carbapenemasas (Martínez-Martínez *et al.*, 2014). Se trata de un grupo relevante a tenor de la distribución global de sus múltiples variantes reportadas en numerosas especies (Azizi *et al.*, 2015; Nordmann *et al.*, 2012b).

La clase C de β -lactamasas (AmpC) no es considerada intrínsecamente como un grupo de carbapenemasas, sin embargo, juega un papel determinante en la resistencia a los carbapenémicos al coexistir con mecanismos de impermeabilidad de la membrana y/o bombas de eflujo (Meletis *et al.*, 2016).

Las EPCs se encuentran actualmente diseminadas por todo el mundo. Cabe destacar la gran propagación internacional de las enterobacterias productoras de KPCs debido a la expansión clonal de cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes al clon ST258. Ha alcanzado un predominio casi global (Vera-Leiva *et al.*, 2017), estando distribuida en regiones como Europa, Medio Oriente, EEUU y Latinoamérica (**Figura 3A**).

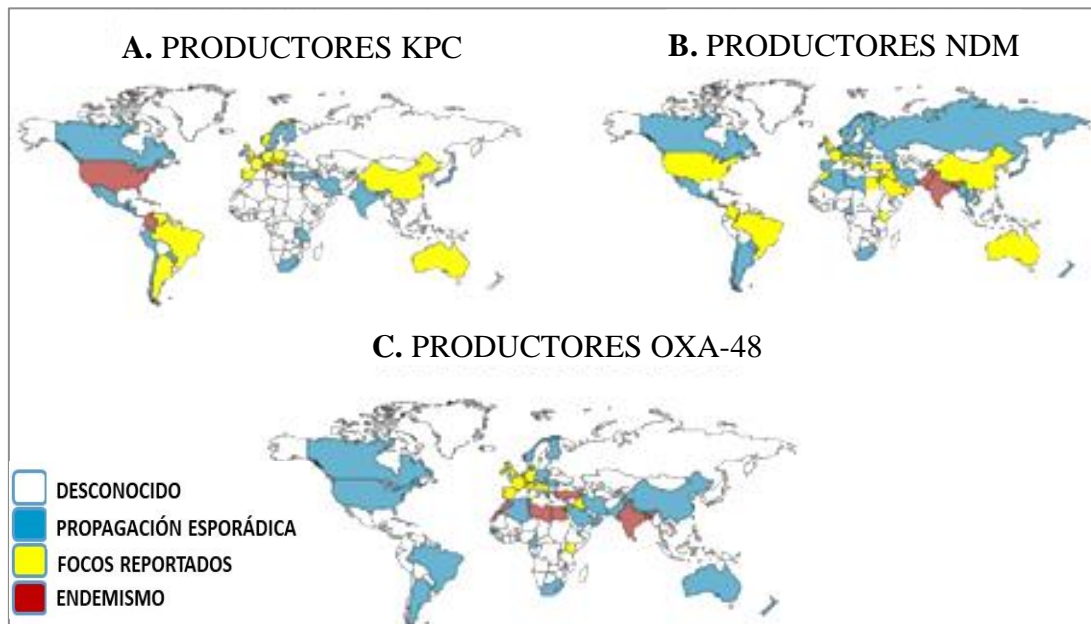


Figura 3. Distribución global de los productores de carbapenemasas más comunes. (A) Distribución de *Enterobacteriaceae* productoras de KPC. (B) Distribución de *Enterobacteriaceae* productoras de NDM. (C) Distribución de *Enterobacteriaceae* productoras de OXA-48. Adaptada de Bonomo *et al.*, 2018.

Las enterobacterias productoras de la carbapenemasas NDM fueron detectadas por primera vez en Nueva Delhi (India) en 2007, siendo consideradas endémicas (Chandola *et al.*, 2018), (**Figura 3B**). No obstante, actualmente se han encontrado por todo Reino Unido, Pakistán e Israel), siendo la mayor causa de brotes infecciosos clínicos de CPO en Estados Unidos (Nordmann *et al.*, 2011). Finalmente, la diseminación de las enterobacterias productoras de la carbapenemasa OXA-48, detectadas por primera vez a mediados de la década de 2000 en Turquía, y se actualmente se encuentra con frecuencia en varios países europeos, así como en el norte de África (Bonomo *et al.*, 2018) (**Figura 3C**).

1.4. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPCs)

Debido a su gran prevalencia y diseminación, la detección de los microorganismos productores de carbapenemasas (CPOs) y, concretamente de las EPCs, es un gran reto prioritario en los laboratorios de microbiología clínica de todo el mundo. Su detección correcta aporta información que permite la elección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de la infección, permitiendo instaurar las medidas adecuadas de aislamiento para evitar los posibles brotes de infección y/o colonización (Poirel *et al.*, 2015). Sin embargo, su detección incluye una serie de dificultades ya que no se puede basar simplemente en obtener el perfil de resistencia y actualmente no se ha estandarizado una metodología precisa de forma adecuada (Hammoudi *et al.*, 2014).

Especialmente, la detección de portadores fecales de EPCs es una práctica clínica rutinaria en muchos lugares del mundo y se recomienda por varias organizaciones de salud para contener la diseminación de dichos microorganismos.

Para la detección de EPCs se lleva a cabo un cribado inicial de susceptibilidad empleando habitualmente sistemas automatizados y ensayos de difusión con discos (**Figura 4**). La primera causa de sospecha de producción de carbapenemasas en un aislado clínico es un aumento en la CMI a los carbapenémicos, o una disminución en el diámetro de la zona de inhibición. Este resultado hace que un aislado bacteriano se seleccione posteriormente para un análisis confirmatorio de producción de carbapenemasas utilizando métodos más específicos (Miriagou *et al.*, 2010).

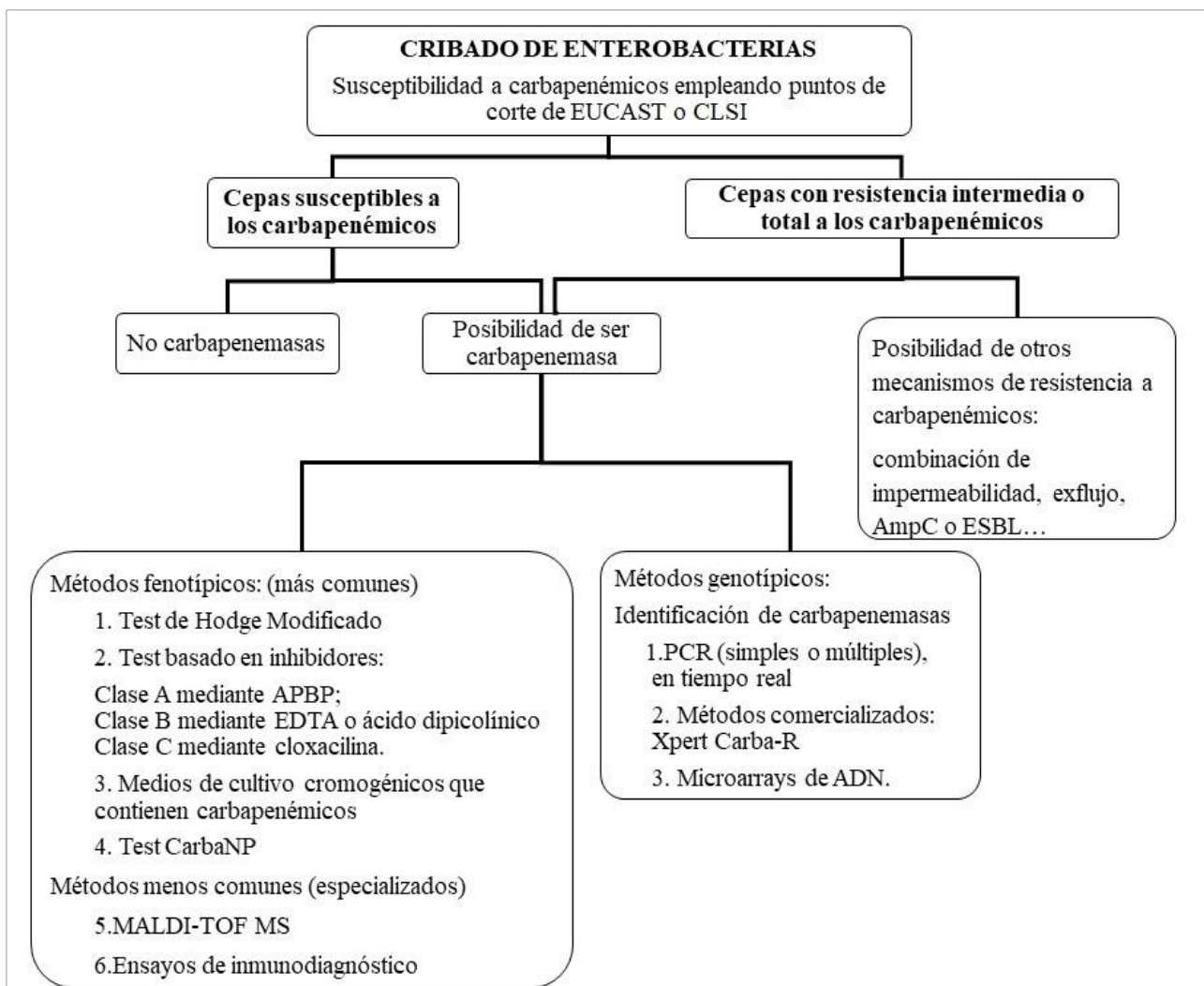


Figura 4. Esquema simplificado de la metodología utilizada para la detección de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*. APBP: ácido aminofenil borónico; EDTA: ácido etilendiaminatetraacético; MALDI-TOF MS: Espectrometría de masas (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz); PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Imagen adaptada de Hammoudi *et al.*, 2014.

Las técnicas para la detección de carbapenemasas son diversas y abundantes. Se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la detección de carbapenemasas, desde los ensayos fenotípicos convencionales hasta las técnicas moleculares novedosas.

1.4.1. Detección de carbapenemasas con métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos convencionales empleados para la detección de carbapenemasas se basan en la aplicación de test de susceptibilidad (hidrólisis del carbapenémico) o en la inhibición de las carbapenemasas usando inhibidores específicos (Hammoudi *et al.*, 2014; Nordmann *et al.*, 2012c) (**Figura 4**). El test de Hodge modificado (MHT, del inglés *Modified Hodge Test*) es un método fenotípico comúnmente empleado. También, los test basados en inhibidores cuyo fundamento es que la actividad de determinadas carbapenemasas disminuye en presencia de inhibidores específicos de carbapenemasas, y los productores de carbapenemasas se hacen más sensibles a los β -lactámicos. Adicionalmente se usan los métodos de detección con medios de cultivo que incluyen carbapenémicos, existiendo medios cromogénicos comerciales para la detección de aislados productores de carbapenemasas: CHROMagar KPC, Brilliance CRE, chromID Carba, SUPERCARBA, etc. (Hammoudi *et al.*, 2014).

Se han desarrollado nuevos métodos mejorados basados en técnicas bioquímicas siendo uno de los más novedosos y revolucionarios el test denominado Carba NP. Este método se basa en la hidrólisis del anillo β -lactámico del imipenem por el aislado estudiado, seguido de un cambio de color del indicador de pH, habitualmente el rojo fenol de rojo a amarillo/naranja (Poirel *et al.*, 2015; Shinde *et al.*, 2017). Este test ha mostrado buenos resultados de sensibilidad y especificidad, y elimina la necesidad de realizar otros test fenotípicos *in vitro* como el MHT o técnicas basadas en inhibidores.

Los ensayos fenotípicos son económicos y fáciles de realizar. Sin embargo, el tiempo necesario para obtener los resultados es grande, entre 24 y 48 horas. Asimismo, carecen de la sensibilidad y especificidad necesarias para poder diferenciar la naturaleza de las clases, grupos y subgrupos de carbapenemasas (Aguirre-Quñonero *et al.*, 2017).

1.4.2. Detección de carbapenemasas con métodos moleculares

Los métodos basados en técnicas moleculares o genotípicas se consideran los métodos de referencia para la identificación de genes que codifican las carbapenemasas (Nordmann *et al.*, 2011). La PCR es el método molecular tradicional más comúnmente empleado. Se han desarrollado sistemas de PCR múltiple en tiempo real para la

detección de la mayoría de carbapenemasas como KPC, OXA-48, VIM, IMP y NDM (Cui *et al.*, 2019; Hemarajata *et al.*, 2015). Algunos de esos métodos que actualmente se comercializan, como por ejemplo el Xpert Carba-R, un método de PCR en un formato de cartucho que se ejecuta en la plataforma GeneXpert (Tato *et al.*, 2016).

Se han desarrollado otros métodos moleculares novedosos y cuya tecnología es prometedora. Test de microarrays de oligonucleótidos (Dally *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2019; Ulyashova *et al.*, 2010), amplificación isotérmica mediada por lazo (Srisrattakarn *et al.*, 2017) y la secuenciación del genoma completo, entre otros (Patel *et al.*, 2016).

1.4.3. Detección de carbapenemasas con métodos proteómicos

Varios estudios han descrito la detección de actividad carbapenemasa usando una plataforma de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bou *et al.*, 2014). Se compara el espectro generado por el carbapenémico no hidrolizado (intacto) con el obtenido, después de la hidrólisis del anillo β -lactámico por la carbapenemasa. Esta técnica se ha mostrado como una herramienta útil para la detección de carbapenemasas.

1.5. Necesidad de la detección rápida de carbapenemasas

La rapidez en el diagnóstico puede jugar un papel determinante en la curación del paciente, ya que permite la administración de un tratamiento adecuado (Cantón *et al.*, 2015). Un aspecto que condiciona cada vez más la necesidad de disponer de un diagnóstico rápido, es el aumento de las tasas de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, como es el caso de las EPCs, lo que ocasiona una gran probabilidad de error en el tratamiento antibiótico empírico. Por tanto, un área en la que la innovación en microbiología ha tenido un gran auge ha sido la del diagnóstico rápido, muy superpuesto a la atención continuada en microbiología (Vila *et al.*, 2016).

Por definición, aquellos ensayos que para su realización requieren previamente la obtención de colonias bacterianas aisladas o aislados bacterianos se consideran test convencionales, no rápidos. Por otro lado, aquellos ensayos que pueden ser aplicados directamente a una muestra biológica, o aquellos que emplean microorganismos después de realizar algún paso previo de incubación de la muestra, se consideran test de diagnóstico rápido. Así, los test rápidos permiten obtener el resultado el mismo día en que se obtuvo la muestra, test que deben ser sensibles y específicos (Bou *et al.*, 2014).

La inmensa mayoría de los ensayos de detección de carbapenemasas desarrollados y disponibles en la actualidad, requieren la obtención de los microorganismos en cultivo puro previamente a la realización del test, siendo, por lo tanto, considerados como test convencionales. Esto lleva consigo que el tiempo de obtención del resultado desde la recepción de la muestra hasta el diagnóstico, sea de al menos 24-48 h (Gauthier *et al.*, 2017). Aunque su desarrollo está en auge, son menos los estudios que hasta la fecha han puesto a punto y comprobado la aplicabilidad de la detección de carbapenemasas directamente a partir de las muestras biológicas.

Actualmente estamos asistiendo a un cambio importante en los laboratorios de microbiología clínica en el que se incluyen avances tecnológicos tales como el diagnóstico molecular, la microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas (MALDI-ToF, ESI-ToF). Se están realizando grandes esfuerzos en el desarrollo de test rápidos de detección de carbapenemasas, principalmente moleculares, pero también proteómicos y fenotípicos, directamente a partir de diferentes tipos de muestras clínicas y de colonización (heces, sangre, orina, esputo, lavado bronquial, entre otras).

Existen diversos estudios que demuestran que dichos avances en el diagnóstico microbiológico reducen el tiempo de generación de los resultados de las pruebas, lo cual posee un impacto clínico evidente. Se trata de un campo de investigación en expansión, muy activo y prometedor. En este trabajo de revisión bibliográfica pretendemos revisar aquellos artículos de investigación que describen el desarrollo y la aplicación de métodos rápidos de detección de carbapenemasas en enterobacterias. Se contemplará cualquier ensayo, ya sea fenotípico, molecular o proteómico, que tenga como prioridad obtener los resultados directamente a partir de la muestra biológica y, preferentemente, el mismo día de recepción de la misma. Se trata de comprobar qué tipo de ensayos son y analizar la implementación de dichas técnicas en el diagnóstico microbiológico actual.

2. Objetivos.

Según los antecedentes descritos se plantean los siguientes objetivos:

2.1. Objetivo General

Conocer el estado actual en el que se encuentra el desarrollo y aplicación de los métodos rápidos de diagnóstico para detectar carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*.

2.2. Objetivos Específicos

1. Describir la base metodológica de los principales ensayos de detección directa de carbapenemasas a partir de muestras biológicas, clínicas y de colonización.

2. Comparar la sensibilidad, especificidad y rapidez de dichos métodos en relación con otros métodos convencionales generalmente empleados.

3. Metodología.

3.1. Estrategia de búsqueda y criterios de selección bibliográfica

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica se ha seleccionado como principal fuente de información la base de datos de acceso libre MEDLINE, utilizando como motor de búsqueda PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Inicialmente se consultaron una serie de artículos sobre la resistencia a los antibióticos carbapenémicos mediada por carbapenemasas en la familia *Enterobacteriaceae* y las diferentes metodologías habitualmente empleadas para la detección de las mismas. Estos artículos constituyeron la base de información con la que se redactó la introducción del trabajo.

Partiendo de esta base se realizó una segunda búsqueda, ésta orientada al objetivo principal del estudio, los métodos de detección molecular de carbapenemasas a partir de muestras biológicas de pacientes. Se consideraron una serie de criterios que incluyeron: términos clave de interés íntimamente relacionados, con un idioma predeterminado (el Inglés) y fecha de publicación de los artículos entre 2010 y 2020.

Las búsquedas se realizaron aplicando las siguientes combinaciones de palabras clave: “*Carbapenemase y rapid detection*”, “*Carbapenemase y molecular detection*”, “*Carbapenemase y Multiplex real-time PCR*”, “*carbapenemase y microarray*”, “*carbapenemase y real-time PCR*”, “*carbapenemase y whole-genome sequencing*”, “*carbapenemase y direct detection*”, “*carbapenemase y detection y VIM*”, “*carbapenemase y detection y KPC*”, “*carbapenemase y detection y OXA*” y “*Xpert Carba-R y carbapenemase*”. Se evaluaron los títulos de los artículos, y en ocasiones, los resúmenes, con el fin de identificar y seleccionar únicamente aquellos de libre acceso que trataran sobre métodos aplicados directamente a muestras biológicas. Adicionalmente, cuando se consideró necesario, se revisó la bibliografía incluida en los artículos seleccionados para analizar artículos complementarios de interés que no habían sido localizados en las búsquedas iniciales empleando los criterios antes comentados.

Finalmente, el contenido mayoritario del apartado de resultados y discusión de este trabajo se basó en un total de 21 artículos que fueron analizados en mayor detalle.

4. Resultados y Discusión

4.1. Detección directa de carbapenemasas a partir de muestras biológicas

El rápido diagnóstico de las EPCs se ha convertido en una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica. En los últimos años se han desarrollado y puesto a punto una gran diversidad de métodos fenotípicos, moleculares y proteómicos para la detección de carbapenemasas (Aguirre-Quñonero *et al.*, 2017). Adicionalmente a su detección en pacientes infectados, se ha establecido como una prioridad la detección y vigilancia de pacientes colonizados, ya que desempeñan un papel fundamental en la epidemiología de las EPCs (Nordmann *et al.*, 2011).

La mayoría de nuevos métodos descritos para la detección de carbapenemasas, aunque han mejorado en rapidez respecto a los anteriores, siguen dependiendo de la obtención en cultivo puro de las bacterias objeto de estudio (Bou *et al.*, 2014). Esto supone un retraso en el diagnóstico y dificultades para elegir el tratamiento antibiótico más adecuado sin demora. Por ello, la detección de carbapenemasas directamente a partir de la muestra biológica del paciente, ya sea muestra de infección o de colonización, supone un gran avance que permite contribuir a un diagnóstico rápido.

En este trabajo se ha revisado la bibliografía relacionada con el desarrollo de métodos de detección rápida directamente a partir de las muestras biológicas. La mayor parte de los ensayos se han aplicado usando muestras de heces (Saliba *et al.*, 2019), algo esperable debido a la gran importancia que tiene la colonización de los pacientes por EPCs. Sin embargo, se han desarrollado test con diferente rendimiento que se aplican a diversidad de muestras clínicas: orina, esputo, lavado bronquial, sangre, entre otras.

Se ha podido corroborar que las técnicas moleculares rápidas basadas en la detección de ácidos nucleicos son las que más ampliamente se han aplicado directamente sobre las muestras biológicas. Sin embargo, está en auge el desarrollo de diversos métodos proteómicos y fenotípicos muy prometedores. Además, en los últimos años la disponibilidad de ensayos comerciales estandarizados para la detección de carbapenemasas ha experimentado una gran explosión (Cantón *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2015; Nordmann *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2018).

A continuación, se presentan los principales métodos descritos en la bibliografía consultada. Se presentarán sus características, limitaciones y las perspectivas futuras.

4.1.1. Métodos moleculares

Diversos estudios han comprobado que es posible la identificación directa en muestras biológicas de muchos de los genes que codifican carbapenemasas empleando métodos moleculares. Hay que tener en cuenta que en el caso de aplicar estos métodos moleculares sigue siendo necesaria la identificación de la EPCs mediante cultivo.

La mayor parte de las técnicas moleculares descritas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Se han revisado trabajos que incluyen ensayos de PCR simple y múltiple, según se detecte un único gen o múltiples genes, principalmente basados en PCR en tiempo real. Adicionalmente, algunos de los estudios han desarrollado técnicas moleculares de detección directa usando microarrays de ADN y pirosecuenciación. Algunos ensayos se han adaptado con al formato comercial y unos pocos han conseguido ser aprobados para su uso clínico.

Debido a la gran importancia clínica y al papel epidemiológico que desempeñan los pacientes colonizados con EPCs, la gran mayoría de los métodos moleculares revisados en este trabajo se aplican directamente sobre muestras rectales o de heces.

4.1.1.1. PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR que permite amplificar y recopilar datos de manera simultánea durante el proceso en lugar de al finalizar el proceso. Se basa en diversas tecnologías como Taqman® o las sondas de hibridación.

Existen importantes estudios que han llevado a cabo la puesta a punto de ensayos usando la PCR en tiempo real sobre muestras clínicas. Asimismo, también se han aplicado directamente en muestras colonización relacionadas con la identificación rápida de pacientes colonizados con EPCs (Naas *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012).

En Naas *et al.*, 2011 desarrollan detalladamente una PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real empleando la tecnología TaqMan para detectar los genes *bla_{NDM-1}* tras la extracción del ADN directamente a partir de muestras de heces. El ensayo mostró una excelente sensibilidad y especificidad, con límites de detección inferiores a los de las técnicas de cultivo. Además, en relación a las técnicas de cultivo evaluadas, la qPCR de los genes *bla_{NDM-1}* permitió obtener los resultados más rápido (4 h frente a 48 h).

En Richter *et al.*, 2012, implementan una insólita y ultrarrápida PCR en tiempo real, diseñada para detectar las 12 variantes alélicas de la carbapenemasa KPC

(*bla_{KPC1/a}* *bla_{KPC12}*) a partir de muestras perirectales y nasales. Estas muestras se emulsionaron en placas de agar con medio PBS estéril como fase previa a la extracción del ADN y realización de la PCR. De la misma manera que en el estudio anteriormente descrito, los resultados se compararon con los obtenidos utilizando métodos fenotípicos convencionales para llevar a cabo la validación del ensayo.

La PCR en tiempo real también se ha empleado para detectar simultáneamente dos genes de carbapenemasas, denominándose como PCR dúplex en tiempo real. En el estudio de Vasoo *et al.*, 2013 se llevó a cabo la amplificación simultánea de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* directamente a partir de muestras clínicas de vigilancia, y de muestras contaminadas artificialmente perianales, perirectales y de heces. Una de las peculiaridades es que el método mostró una excelente sensibilidad en muestras perirectales y perianales de vigilancia tras un procedimiento simple de lisis (cuando los hisopos no están visiblemente sucios con heces), y se podría aplicar a las heces y a los hisopos sucios, después de llevar a cabo un paso previo de extracción de ácido nucleico.

4.1.1.2. PCR múltiple en tiempo real.

La detección de múltiples genes de carbapenemasas simultáneamente mediante PCR en tiempo real a partir de muestras biológicas ha supuesto un gran avance en el diagnóstico. Un hecho interesante es que se han desarrollado diversos métodos que se han adaptado a un formato comercial: GenePOC (Baeza *et al.*, 2019) SpeedX Carba (beta) PCR (Bordin *et al.*, 2019) y el Xpert Carba-R entre otros (Tato *et al.*, 2016).

El Xpert Carba-R (Cepheid) merece especial atención debido a la rapidez en la obtención de los resultados y al número considerable de estudios en los que se ha evaluado su rendimiento. Se trata de un método aprobado por la FDA de diagnóstico cualitativo rápido en formato de cartucho (**Figura 5**). Inicialmente fue desarrollada para detectar los genes *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* y *bla_{VIM}* directamente en muestras rectales (Tato *et al.*, 2016). Posteriormente se perfeccionó incluyendo la detección de las dos variantes alélicas del gen *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-181}* y *bla_{OXA-232}*, ya que estas tienen un gran potencial de causar problemas en el ámbito clínico (Dortet *et al.*, 2016).

Utilizando como criterio de búsqueda el nombre del ensayo “Xpert Carba-R” en PubMed se obtuvieron 54 artículos, llevados a cabo desde 2015 hasta 2020. Once de dichos artículos estudiaban su aplicación directamente sobre diferentes muestras biológicas, 7 sobre muestras de heces y 4 en otras muestras clínicas: esputo,

hemocultivos positivos, lavados bronquiales y broncoalveolares (Cointe *et al.*, 2019; Cortegiani *et al.*, 2016). En general, los estudios realizados que han evaluado el rendimiento del Xpert Carba-R directamente sobre muestras clínicas han obtenido valores de sensibilidad y especificidad superiores al 95%. Este aspecto, unido a la rapidez de obtención de los resultados (< 1h), demuestra que se trata de un ensayo cualitativo robusto y preciso para detectar 5 familias de genes de carbapenemasas relevantes a partir de muestras biológicas, principalmente de muestras de colonización.

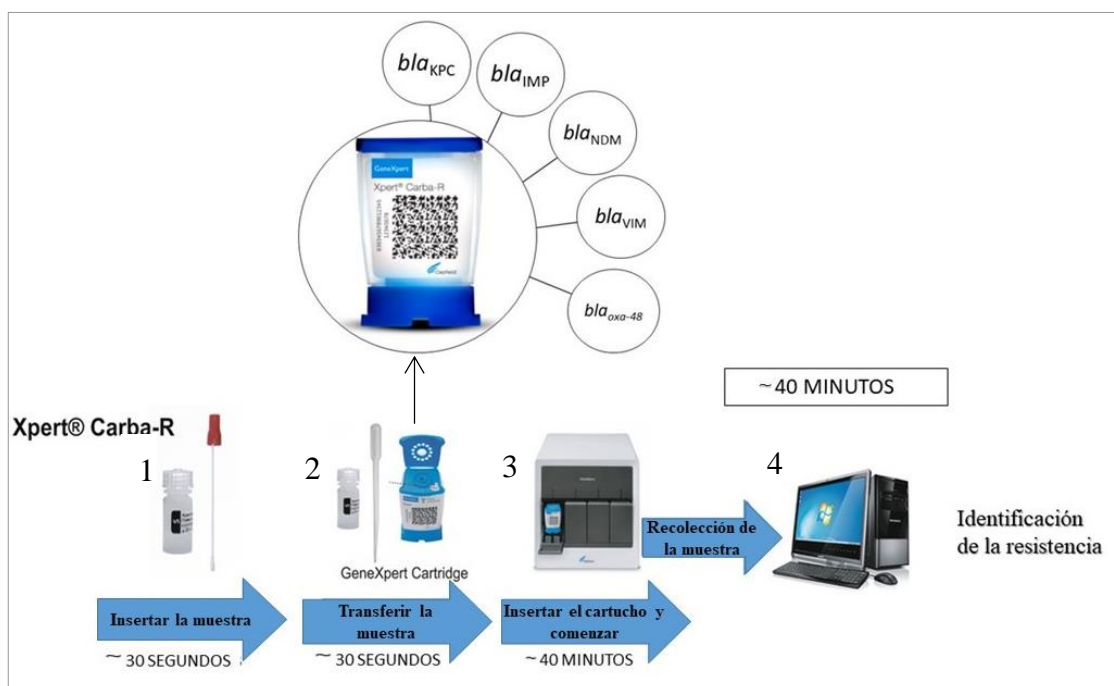


Figura 5: Protocolo de montaje del Xpert Carba-R. (1) En primer lugar, se inserta el hisopo en el interior del vial de elución y se corta por la ranura, quedando inserto en el bote durante 30 segundos. (2) En segundo lugar, la muestra se agita en el vórtex durante 30 segundos y, seguidamente, se inserta en el cartucho. (3) Por último, el cartucho se inserta en la plataforma GeneXpert y comienza el ensayo. (4) Tras aproximadamente 40 minutos, se procede a la recolección de datos e identificación de una o varias resistencias gracias al software informático especializado. Imagen adaptada de Tang & Stratton, 2018.

Otro ejemplo es un método no comercial de PCR múltiple usando una nueva sonda Taqman que permite detectar las variantes alélicas del gen bla_{KPC} de especímenes clínicos (muestras perirectales y nasales) en menos de 2 horas (Richter *et al.*, 2012).

Recientemente, se ha llevado a cabo un metaanálisis diagnóstico para revisar y evaluar el rendimiento general de todos los métodos de PCR descritos para la detección de carbapenemasas en hisopados rectales (Saliba *et al.*, 2020). Los resultados globales mostraron que los métodos descritos presentan una buena sensibilidad del 0.95 (IC: 0.902-0.989) y una excelente especificidad del 0.994 (IC: 0.965-1). Sin embargo, los

autores recalcan la necesidad de realizar estudios adicionales de evaluación del rendimiento de la PCR directamente en muestras rectales para confirmar sus hallazgos.

4.1.1.3. Microarrays de ADN

El microarray es una técnica desarrollada para estudiar múltiples genes al mismo tiempo. Se trata de un formato basado en la síntesis inicial de sondas de ADN, unidas a un soporte o base sólida (chip) y con una posición conocida sobre la que podemos hibridar una muestra marcada. El apareamiento de las bases complementarias entre la muestra y las secuencias de genes en el chip produce una cantidad de luz que se puede medir, identificando de esta manera los genes que se expresan en esa muestra.

Los microarrays de ADN permiten la detección de un número mucho mayor de genes que la PCR y, adicionalmente se pueden incluir dianas específicas para la identificación de las bacterias. Varios sistemas comerciales de microarrays están disponibles en la actualidad para la detección directamente a partir de muestras de sangre con alta especificidad. Por ejemplo, el Verigene y el BioFire Film Array se pueden aplicar directamente a las muestras de sangre (hemocultivos) sin necesidad de aislar las bacterias (Ledeboer *et al.*, 2015; Salimnia *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2014).

Una ventaja respecto a los métodos de PCR, es que el empleo de los microarrays de ADN permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*) en las secuencias diana de los genes de carbapenemasas (**Figura 6**). Esto es útil para la investigación detallada de brotes de infección y en los estudios epidemiológicos, permitiendo la detección y diferenciación de varios genes de resistencia, incluyendo distintas variantes alélicas.

En el estudio de Peter *et al.*, 2012, se desarrolló y evaluó un ensayo con un nuevo microarray de ADN capaz de identificar las variantes KPC-2 a KPC-11 directamente a partir de muestras de orina sin crecimiento previo del cultivo. La importancia de su diferenciación recae en las pequeñas diferencias en los perfiles de resistencia que otorga cada una, valores de MICs a carbapenémicos y eficacia de inhibidores de betalactámicos muy dispares. Se confeccionaron 4 sondas de oligonucleótidos diseñadas para identificar SNPs en las 4 posiciones responsables de las diferencias entre variantes (nucleótidos 147, 308, 716 y 814). Los resultados permitieron identificar de forma precisa las diferentes variantes de KPC en un periodo de aproximado de 5 h, dependiendo del método de extracción de ADN empleado.

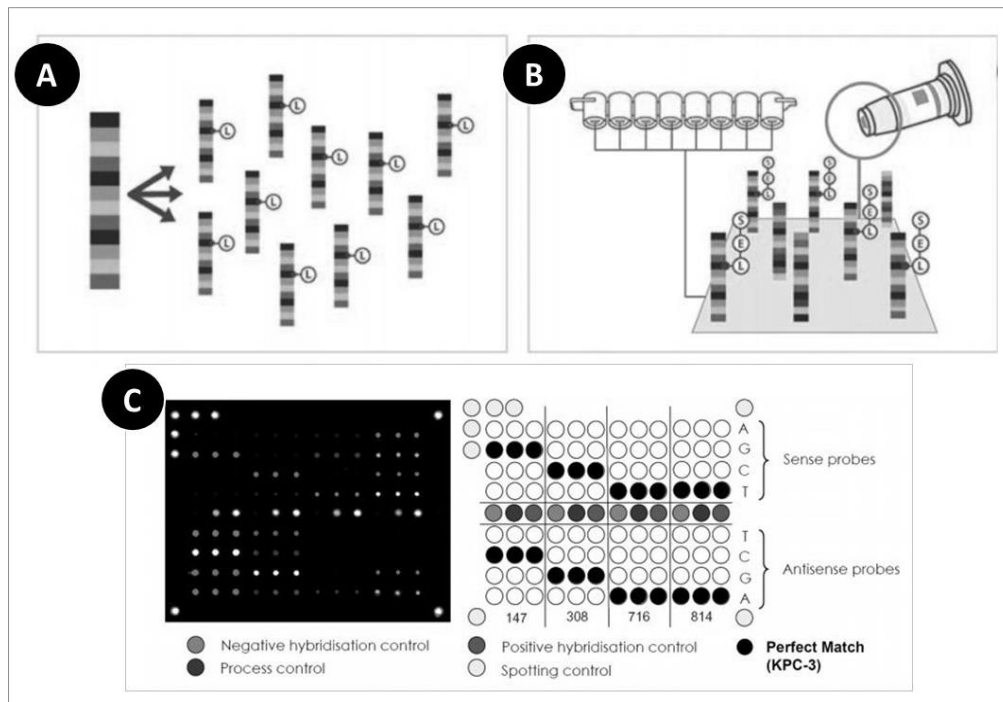


Figura 6: Procedimiento del ensayo con microarray para detectar genes codificadores de carbapenemasas en enterobacterias. (A) Amplificación por PCR y marcado del ADN diana. (B) Hibridación: el producto de ADN monocatenario diana se hibrida específicamente en condiciones rigurosas con las sondas correspondientes. En concreto, se diseñaron 32 sondas, sentido y antisentido, para identificar los SNPs en cuatro puntos calientes de mutación (posiciones 147, 308, 716 y 814 del gen *bla_{KPC}*). (C) Detección: Visualización y, posteriormente, análisis automatizado de la imagen de la matriz. La intensidad de la señal de cada sonda determina qué alelos están presentes en la muestra por medio de un algoritmo específico del ensayo. Modificada de Braun *et al.*, 2014 y de Peter *et al.*, 2012.

En otros estudios se ha empleado la tecnología de microarrays de ADN para detectar CPE directamente a partir de botellas de hemocultivo positivos con un 100% de concordancia respecto a otros métodos evaluados y mayor rapidez (Juiz *et al.*, 2014)

De manera general, cabe destacar que para los test moleculares realizados a partir de sangre se requiere que esta sea cultivada en un sistema de cultivo de sangre (hemocultivo) automatizado de laboratorio estándar antes de la realización de la prueba.

4.1.2. Métodos fenotípicos.

Los test fenotípicos se basan en la detección de la actividad carbapenemasa y hasta la fecha la inmensa mayoría únicamente pueden ser llevados a cabo después de que se ha obtenido un cultivo puro a partir de la muestra obtenida del paciente. El proceso requiere de un tiempo considerable que puede ser de 2-3 días (Hammoudi *et al.*, 2014). Recientemente se han descrito ensayos fenotípicos novedosos que permiten la detección de carbapenemasas directamente de muestras biológicas en un tiempo inferior (Hogan *et al.*, 2019; Jonasson *et al.*, 2020; Sfeir *et al.*, 2020; Takissian *et al.*, 2019).

Los ensayos más recientes, por lo general, se han perfeccionado conforme a la necesidad urgente que existe en la obtención de resultados rápidos que aporten datos consistentes en cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana de aquellos microorganismos que causan infecciones invasivas, como las infecciones del torrente sanguíneo. Por ello, estos suelen testarse a partir de muestras directas de hemocultivos positivos. Al igual que la detección directa en hemocultivos positivos empleando métodos moleculares, es necesario que la sangre se cultive en un sistema de cultivo de sangre automatizado de laboratorio estándar antes de la prueba. Para la mayoría de las bacterias Gram negativas, este paso toma 8-24 h desde la carga del instrumento hasta obtener un cultivo positivo.

En un estudio reciente llevado a cabo por Sfeir *et al.*, 2020 llevan a cabo la adaptación del método de inactivación de carbapenémicos modificado (mCIM, del inglés *Modified Carbapenem Inactivation Method*) para su aplicación en la detección de carbapenemasas directamente en hemocultivos positivos, denominando a dicho método *Blood-mCIM*. Los resultados están disponibles entre 22 y 28 h después del hemocultivo positivo, lo que supone un avance de un día respecto a los resultados convencionales de susceptibilidad antibiótica. Además, muestra una sensibilidad y especificidad del 100%. Al contrario que otros métodos fenotípicos para la detección directa de hemocultivos positivos como Carba NP, β -CARBA, Y NeoRapid CARB test (Dortet *et al.*, 2014; Meier *et al.*, 2019), el ensayo Blood-mCIM no requiere un procesamiento adicional.

Otra prueba de diagnóstico fenotípico rápido es la evaluada en Takissian *et al.*, 2019 denominada NG-Test Carba 5. Aplicando este ensayo inmunocromatográfico a hemocultivos positivos consiguieron una detección sensible (97.7%) y específica (96.1%) de las cinco familias de carbapenemasas más extendidas (KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48-like) en menos de 30 minutos desde la señal positiva del hemocultivo. Sin embargo, se trata de una prueba de concepto y debe validarse en muestras clínicas ya que emplearon hemocultivos contaminados artificialmente con bacterias de interés.

Uno de las principales necesidades en microbiología clínica es disponer de pruebas rápidas estandarizadas de susceptibilidad antimicrobiana, especialmente en pacientes con infecciones de la sangre. A continuación comentaremos algunos de los trabajos realizados en esa dirección empleando detección directa en hemocultivos positivos. Se trata de métodos que permiten la detección de susceptibilidad antibiótica, incluida a los carbapenémicos. Por tanto, aunque no son métodos diseñados

específicamente para la detección de carbapenemasas, consideramos que es interesante su inclusión aquí ya que suponen un gran avance de los métodos de detección directa.

El trabajo de Jonasson *et al.*, 2020 se basa en la detección de la susceptibilidad antimicrobiana, mediante la difusión en disco de EUCAST directamente a partir de frascos de hemocultivo positivos. Este ensayo denominado prueba rápida de susceptibilidad antimicrobiana (RAST, del inglés *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*) proporciona resultados en menos de 8 h en comparación con las 16-24 h del método EUCAST estandarizado. Esto supone un impacto bastante significativo haciendo que los resultados de susceptibilidad sean de utilidad de manera temprana.

Un estudio reciente desarrollado por Hogan *et al.*, 2019 se presenta un novedoso ensayo de RAST empleando el sistema VITEK[®]2, un nuevo uso del mismo (**Figura 7**).

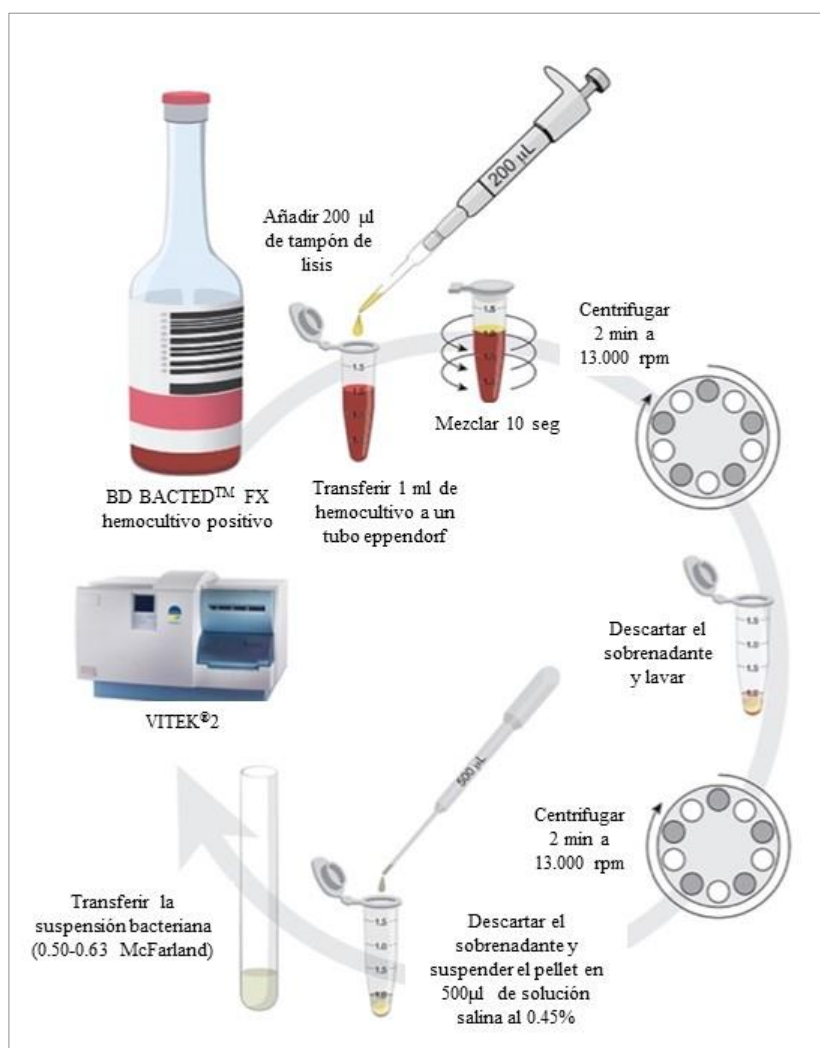


Figura 7. Preparación del inóculo a partir de frascos de hemocultivo BD BACTECTM FX positivos para la prueba VITEK[®]2 AST basada en un método de lisis de glóbulos rojos y centrifugación bacteriana.

Este método consiste en un ensayo rápido de susceptibilidad antibiótica directamente a partir de cultivos de sangre positivos. Los autores demuestran que el sistema VITEK[®]2 se puede utilizar para proporcionar resultados altamente precisos directamente de hemocultivos positivos para *Enterobacteriaceae* en un tiempo promedio de 9h. Se trata de una estrategia innovadora, pragmática y con un bajo costo.

4.1.3. Métodos proteómicos

Hasta el momento los métodos proteómicos se aplican o bien sobre aislados bacterianos, o sobre cultivos de sangre positivos. Algunos estudios se han encaminado a detectar la actividad carbapenemasa empleando una plataforma de espectrometría de masas basada en ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) o MALDI-TOF. Esta estrategia compara el espectro MALDI-TOF generado por el carbapenémico intacto (no hidrolizado) con el obtenido tras hidrólisis del anillo β -lactámico por la carbapenemasa.

En un amplio y exhaustivo estudio los autores desarrollaron un ensayo basado en MALDI-TOF MS para la detección rápida de la resistencia a varios antibióticos β -lactámicos, entre ellos el ertapenem y meropenem. Aparte de aplicarse a las bacterias aisladas en cultivo, se obtuvieron excelentes resultados cuando se aplicó directamente hemocultivos positivos (Sparbier *et al.*, 2012). Este y otros resultados sugieren que el MALDI-TOF puede ser una herramienta de gran utilidad para la detección rápida y fiable de carbapenemasas en muestras biológicas. Se deben estandarizar varios parámetros del ensayo para facilitar su reproducibilidad y su empleo generalizado.

4.2. Limitaciones de la detección directa a partir de la muestra

Como se ha comentado previamente, la gran ventaja de los métodos de diagnóstico rápidos es la reducción significativa del tiempo de respuesta. Además, si son métodos precisos, proporcionan información de gran utilidad en un tiempo record. No solamente ayudarían a la selección del antibiótico más adecuado, sino que contribuirían a la activación temprana de los protocolos y medidas de control de infecciones con las que intentar frenar la diseminación de las EPCs evitando los brotes.

Concretamente, muchos ensayos han detectado e identificado satisfactoriamente EPCs en muestras rectales para el control la colonización e infección por estos microorganismos. Por ello, en estudios futuros convendría conocer su utilidad como

método de cribado en pacientes de reciente hospitalización posiblemente infectados por EPCs, y en aquellos individuos en los que se tengan altas sospechas de ser portadores .

Sin embargo, la detección directamente a partir de muestras biológicas presenta ciertas dificultades técnicas, que en ocasiones van a depender del tipo de muestra. Estas dificultades plantean ciertas limitaciones y existen retos a los que se deben enfrentar:

◆ Uno de los problemas difíciles de resolver en el caso de la detección directa (por ejemplo, en la detección a partir de muestras de heces) por métodos moleculares es la imposibilidad de asignar el/los marcador/es de resistencia detectados a un patógeno particular. Por lo tanto, es necesario procesar la muestra para aislar la bacteria, aunque el cultivo se podría realizar sólo en aquellas muestras que dieran resultado positivo aplicando el método molecular. De cualquier manera, algunas aproximaciones han conseguido avanzar en la detección simultánea directa en la muestra de la especie bacteriana y de los genes de resistencia (Stefan *et al.*, 2018). Los autores desarrollaron con éxito un ensayo pionero donde realizan una secuenciación dirigida empleando el principio de secuenciación masiva de nueva generación, con el fin de diagnosticar enfermedades infecciosas. Para ello, se incluyeron sondas dirigidas al gen de la carbapenemasa KPC y una sonda de inversión molecular optimizada dirigida a múltiples regiones variables dentro del gen de ARN ribosómico 16S, para demostrar la capacidad de identificar simultáneamente el agente responsable de la infección.

◆ Un ejemplo que sirve para mostrar algunas de las limitaciones de estos métodos es la detección directa en muestras de sangre. La detección de microorganismos mediante métodos moleculares directamente en la sangre del paciente, sin necesidad de incubación previa, tiene el interés de acelerar la identificación tanto del microorganismo como de algunos genes asociados a resistencia al no requerir el cultivo. Sin embargo, la mayor parte de los métodos desarrollados, como los descritos en este trabajo, se aplican sobre frascos de hemocultivo positivos. La aplicación directa de estas técnicas en sangre esta mucho menos validada y, por tanto, se utilizan menos en la práctica clínica habitual. Esto es debido a que el diseño de métodos moleculares que utilizan la sangre periférica plantea varios problemas: la baja carga de microorganismos en sangre (hasta 1-10 bacterias/ml de sangre), la variedad de microorganismos diferentes que pueden causar esta patología y la presencia de inhibidores en las muestras de sangre (por ejemplo, la elevada proporción de ADN humano respecto al ADN

microbiano). Estas limitaciones condicionan que la sensibilidad de estos métodos no sea óptima y no permita descartar la infección en caso de resultados negativos. Además, la cantidad de muestra que se analiza en estos métodos es mucho menor (entre 1-5 ml) que la inoculada en los hemocultivos lo que contribuye a la baja sensibilidad. Otra limitación importante es la elevada cantidad de genoma humano que puede interferir con los cebadores y la existencia de sustancias inhibitorias del proceso de amplificación como hierro, inmunoglobulinas, hemoglobina y heparina.

◆ En cuanto a la limitación impuesta por la baja carga de microorganismos en las muestras biológicas, en muchos de los ensayos descritos, el escaso número de muestras portadoras de EPCs disponibles y/o el reducido número de EPCs presentes en algunas muestras biológicas, por ejemplo en la orina, fue insuficiente para poder detectar resistencia a carbapenemasas. Por lo tanto, a la hora de ejecutar el ensayo satisfactoriamente fue necesaria la manipulación de las muestras añadiendo artificialmente cantidades conocidas de EPCs con perfiles de resistencia conocidos.

◆ Otra limitación observada tiene que ver con la viabilidad de los microorganismos en las muestras biológicas. En algunos de los estudios revisados el factor principal por el que aparecían falsos positivos era la viabilidad de las enterobacterias presentes en las muestras biológicas. El efecto de un débil crecimiento puede ser consecuencia de que el paciente haya sido tratado recientemente con antimicrobianos. De esta observación se concluye que disponer del historial clínico de aquellos individuos que se incluyan en el ensayo debe ser un aspecto a tener en cuenta (Cortegiani *et al.*, 2016; Richter *et al.*, 2012; Tato *et al.*, 2016; Vasoo *et al.*, 2013).

4.3. Perspectivas futuras del diagnóstico rápido de EPCs

Los métodos de diagnóstico rápidos, concretamente aquellos de aplicación directa a las muestras de los pacientes, tienen el potencial de mejorar la vigilancia, el diagnóstico y el tratamiento de las enterobacterias resistentes a los carbapenémicos.

Actualmente se encuentran disponibles o en desarrollo varios métodos basados en la detección rápida de EPCs. Aunque ninguna plataforma molecular puede contener todos los genes de carbapenemasas o mecanismos de resistencia posibles que confieren resistencia a los carbapenémicos, uno puede imaginar que las pruebas futuras podrían incorporar tantos métodos rápidos para la detección molecular de las carbapenemasas comunes y la determinación mediante métodos no moleculares de la susceptibilidad

antimicrobiana general. Sin duda esto permite la rápida identificación de EPCs y el inicio de una terapia antibiótica efectiva, así como iniciar la toma de medidas para el control de la infección en pocas horas, en lugar de días, tras obtener un resultado positivo en el cultivo. Sin duda, esto daría lugar a mejores resultados, menor transmisión de EPCs y aparición de resistencias, y menores costos de atención médica.

Además, probablemente, la caracterización molecular de los genes que codifican las carbapenemasas ofrece la oportunidad de dirigir la terapia con antibióticos frente a mecanismos de resistencia específicos. Esto es especialmente de interés a medida que se desarrollan nuevas combinaciones de inhibidores de antibióticos β -lactámicos/ β -lactamasa, aunque sin duda se requieren más investigaciones para demostrarlo.

Para tener un impacto óptimo en los pacientes, se deben implementar pruebas rápidas de detección de EPCs junto con intervenciones en la administración de antimicrobianos u otras formas de apoyo a la toma de decisiones clínicas. El impacto clínico y económico de los métodos de diagnóstico rápido para la identificación de EPCs probablemente dependerá de la prevalencia local de EPCs, siendo áreas de gran interés para futuras investigaciones.

5. Conclusiones

1. Los métodos moleculares son los que se han aplicado con mayor éxito para la detección directa de carbapenemasas a partir de muestras biológicas. Sin embargo, se han desarrollado ensayos prometedores basados en otras metodologías.

2. La caída en la comercialización de nuevos antibióticos hace que el diagnóstico rápido haya adquirido una importancia clave para el control de las infecciones causadas por enterobacterias multirresistentes. En este sentido, los métodos de detección directa de carbapenemasas a partir de las muestras biológicas suponen un gran avance clínico.

3. Debido a las limitaciones que presentan en la actualidad los métodos moleculares, incluidos los de aplicación directa en muestras clínicas, estos no sustituyen a los métodos de detección fenotípicos de carbapenemasas, sino que los complementan.

4. El desarrollo de métodos de detección rápida está en auge y se han descrito múltiples métodos novedosos. Es necesario llevar a cabo estudios adicionales que evalúen su rendimiento en diferentes laboratorios y situaciones clínicas, para tratar de conseguir su implementación generalizada en los laboratorios de microbiología clínica.

Conclusions

1. Molecular methods have been the most successfully applied for the direct detection of carbapenemases from biological samples. However, promising trials have been developed based on other methodologies.

2. The decline in the commercialization of new antibiotics means that rapid diagnosis has acquired a key importance for the control of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. In this sense, the methods for the direct detection of carbapenemases from biological samples represent a great clinical advance.

3. Due to the current limitations of molecular methods, including those for direct application to clinical samples, they do not replace phenotypic carbapenemase detection methods, but rather complement them.

4. The development of rapid detection methods is booming and many novel methods have been described. Additional studies evaluating its performance in different laboratories and clinical situations are necessary to try to achieve its widespread implementation in clinical microbiology laboratories.

6. Bibliografía

- Aguirre-Quiñonero, A., Martínez-Martínez, L.** (2017). Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 23(1), 1-11.
- Azizi, O., Shakibaie, M. R., Modarresi, F., & Shahcheraghi, F.** (2015). Molecular Detection of Class-D OXA Carbapenemase Genes in Biofilm and Non-Biofilm Forming Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(1), e21042.
- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F.** (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(8), 1290–1297.
- Bordin, A., Trembizki, E., Windsor, M., Wee, R., Tan, L. Y., Buckley, C., Syrmis, M., Bergh, H., Cottrell, K., Zowawi, H. M., Sidjabat, H. E., Harris, P., Nimmo, G. R., Paterson, D. L., & Whiley, D. M.** (2019). Evaluation of the Speedx Carba (beta) multiplex real-time PCR assay for detection of NDM, KPC, OXA-48-like, IMP-4-like and VIM carbapenemase genes. *BMC infectious diseases*, 19(1), 571.
- Bou, G., Vila, J., Seral, C., & Castillo, F. J.** (2014). Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in various scenarios and health settings. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32 Suppl 4, 24–32.
- Braun, S. D., Monecke, S., Thürmer, A., Ruppelt, A., Makarewicz, O., Pletz, M., Reißig, A., Slickers, P., Ehricht, R.** (2014). Rapid Identification of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria with an Oligonucleotide Microarray-Based Assay. *PLOS ONE*, 9(7), e102232.
- Cantón, R., Loza, E., & Romero, J.** (2015). Aplicabilidad de las nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico; innovación tecnológica [Applicability of new diagnostic techniques in microbiology; technological innovation]. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 28 Suppl 1, 5–7.
- Chandola, P., Gupta, R. M., Lall, M., Sen, S., Shergill, S., & Dutta, V.** (2018). Molecular detection of *bla_{NDM-1}* (New Delhi metalloβ-lactamase-1) in nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates by nested, multiplex polymerase chain reaction. *Medical journal, Armed Forces India*, 74(2), 108–115.
- Cointe, A., Walewski, V., Hobson, C. A., Doit, C., Bidet, P., Dortet, L., Bonacorsi, S., & Birgy, A.** (2019). Rapid Carbapenemase Detection With Xpert Carba-R V2 Directly On Positive Blood Vials. *Infection and drug resistance*, 12, 3311–3316.
- Cortegiani, A., Russotto, V., Graziano, G., Geraci, D., Saporito, L., Cocorullo, G., Raineri, S. M., Mammina, C., Giarratano, A.** (2016). Use of Cepheid Xpert Carba-R1 for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Bacteria in Abdominal Septic Patients Admitted to Intensive Care Unit. *PLOS ONE*, 11(8), e0160643.
- Cui, X., Zhang, H., & Du, H.** (2019). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and Antimicrobial Therapy. *Frontiers in microbiology*, 10, 1823.
- Dally, S., Lemuth, K., Kaase, M., Rupp, S., Knabbe, C., & Weile, J.** (2013). DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10), 4761–4768.
- Dortet, L., Bréchard, L., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2014). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(4), 340–344.
- Dortet, L., Fusaro, M., Naas, T.** (2016). Improvement of the Xpert Carba-R kit for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 60, 3832–3837.
- Fresnadillo Martínez, M. J., García García, M. I., García Sánchez, E., & García & Sánchez, J. E.** (2010). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias [Available carbapenems: Properties and differences]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 28(2), 53–64.
- Gauthier, L., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T.** (2017). Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PIOS ONE*, 12(2), e0170769.
- Hammoudi, D., Ayoub Moubareck, C., & Karam Sarkis, D.** (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 106-118.
- Hemarajata, P., Yang, S., Hindler, J. A., Humphries, R. M.** (2015). Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-like β-lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 59, 5574–5580.
- Hogan, C. A., Watz, N., Budvytiene, I., Banaei, N.** (2019). Rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from blood cultures in patients with Gram-negative rod bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 94(2), 116-121.
- Jonasson, E., Matuschek, E., & Kahlmeter, G.** (2020). The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(4), 968–978.

- Juiz, P., Solé, M., Pitart, C., Marco, F., Almela, M., & Vila, J.** (2014). Detection of extended-spectrum β -lactamase- and/or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* directly from positive blood culture using a commercialised microarray technique. *International journal of antimicrobial agents*, 44(1), 88–89.
- Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Miller, T. W., Miller, A. K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H. B., & Birnbaum, J.** (1979). Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics*, 32(1), 1–12.
- Lau, A. F., Fahle, G. A., Kemp, M. A., Jassem, A. N., Dekker, J. P., & Frank, K. M.** (2015). Clinical Performance of Check-Direct CPE, a Multiplex PCR for Direct Detection of *bla*(KPC), *bla*(NDM) and/or *bla*(VIM), and *bla*(OXA)-48 from Perirectal Swabs. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3729–3737.
- Lucena Baeza, L., Pfennigwerth, N., & Hamprecht, A.** (2019). Rapid and Easy Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriales* in the Routine Laboratory Using the New GenePOC Carba/Revogene Carba C Assay. *Journal of clinical microbiology*, 57(9), e00597-19.
- Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J.** (2014). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(4), 4-9.
- Meier, M., & Hamprecht, A.** (2019). Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriales* Directly from Blood Cultures. *Journal of clinical microbiology*, 57(11), e00709-19.
- Meletis G.** (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, 3(1), 15–21.
- Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., Gniadkowski, M., Malamou-Lada, E., Martínez-Martínez, L., Navarro, F., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G. M., Tsakris, A., Vatopoulos, A., & Cantón, R.** (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 112–122.
- Naas, T., Ergani, A., Carrère, A., & Nordmann, P.** (2011). Real-Time PCR for Detection of NDM-1 Carbapenemase Genes from Spiked Stool Samples. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9), 4038–4043.
- Nordmann, P., & Poirel, L.** (2012a). Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 487–489.
- Nordmann, P., & Poirel, L.** (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gramnegative Bacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(7), S521–S528.
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C.G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V.** (2012c) Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 432-438.
- Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L.** (2012b). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1503–1507.
- Nordmann, P., Poirel, L., Carrère, A., Toleman, M. A., & Walsh, T. R.** (2011). How to detect NDM-1 producers. *Journal of clinical microbiology*, 49(2), 718–721.
- Pascual, A., Pintado, V., Rodríguez-Baño, J., & Miró, J. M.** (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: The end of the antibiotic era? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(4), 1-3.
- Patel R.** (2016). New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories. *Mayo Clinic proceedings*, 91(10), 1448–1459.
- Peter, H., Berggrav, K., Thomas, P., Pfeifer, Y., Witte, W., Templeton, K., & Bachmann, T. T.** (2012). Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *Journal of clinical microbiology*, 50(12), 3990–3998.
- Poirel, L., & Nordmann, P.** (2015). Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *Journal of clinical microbiology*, 53(9), 3003–3008.
- Richter, S. N., Frasson, I., Biasolo, M. A., Bartolini, A., Cavallaro, A., & Palù, G.** (2012). Ultrarapid detection of *bla*_{KPC1/2-12} from perirectal and nasal swabs by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1718–1720.
- Ruiz-Garbajosa, P., & Cantón, R.** (2016). Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Quimioterapia*, 29(1), 21-25.
- Saliba, R., Aho-Glélé, L. S., Karam-Sarkis, D., & Zahar, J. R.** (2020). Evaluation of polymerase chain reaction assays for direct screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from rectal swabs: a diagnostic meta-analysis. *The Journal of hospital infection*, 104(3), 381–389.
- Sfeir, M. M., Satlin, M. J., Fautleroy, K. A., Jenkins, S. G., Westblade, L. F.** (2020). Blood-modified carbapenem inactivation method: a phenotypic method for detecting carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae* directly from positive blood culture broths. *Journal of clinical microbiology*, 58, e01377-19.
- Shinde, S., Gupta, R., Raut, S. S., Nataraj, G., & Mehta, P. R.** (2017). Carba NP as a simpler, rapid, cost-effective, and a more sensitive alternative to other phenotypic tests for detection of carbapenem resistance in routine diagnostic laboratories. *Journal of laboratory physicians*, 9(2), 100–103.
- Singh, K., Mangold, K. A., Wyant, K., Schora, D. M., Voss, B., Kaul, K. L., Hayden, M. K., Chundi, V., & Peterson, L. R.** (2012). Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2596–2600.
- Song, Y., Dou, F., He, S., Zhou, Y., & Liu, Q.** (2019). Laboratory and Clinical Evaluation of DNA Microarray for the Detection of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria from Hospitalized Patients. *BioMed research international*, 2019, 8219748.
- Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M.** (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *Journal of clinical microbiology*, 50(3), 927–937.
- Srisrattakarn, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Wonglakorn, L., Saenjamla, P., Chaimanee, P., Daduang, J., & Chanawong, A.** (2017). Rapid and simple identification of carbapenemase genes, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP-14} and *bla*_{KPC} groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(7), 130.
- Stefan, C. P., Hall, A. T., & Minogue, T. D.** (2018). Detection of 16S rRNA and KPC Genes from Complex Matrix Utilizing a Molecular Inversion Probe Assay for Next-Generation Sequencing. *Scientific reports*, 8(1), 2028.
- Suárez, C., & Gudiol, F.** (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129.
- Takissian, J., Bonnin, R. A., Naas, T., Dortet, L.** (2019). NG-Test Carba 5 for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacterales from positive blood cultures. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63, e00011-19.
- Tang, Y.-W., & Stratton, C. W.** (2018). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (3.a ed., Vol. 2). Springer Nature Switzerland AG.
- Tato, M., Ruiz-Garbajosa, P., Traczewski, M., Dodgson, A., McEwan, A., Humphries, R., Hindler, J., Veltman, J., Wang, H., Cantón, R.** (2016). Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs *Journal of clinical microbiology*, 54, 1814–1819.
- Ulyashova, C. E., Khalilova, Y. I., Rubtsova, C. E., Edelstein, C. E., Alexandrova, I. A., & Egorov, C. A.** (2010). Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes a, B, and d. *Acta naturae*, 2(3), 101–109.
- van Duin, D., Kaye, K. S., Neuner, E. A., & Bonomo, R. A.** (2013). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(2), 115–120.
- Vasoo, S., Cunningham, S. A., Kohner, P. C., Mandrekar, J. N., Lolans, K., Hayden, M. K., & Patel, R.** (2013). Rapid and direct real-time detection of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} from surveillance samples. *Journal of clinical microbiology*, 51(11), 3609–3615.
- Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G.** (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias [KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in *Enterobacteriaceae*]. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484.
- Vila, J., Gómez, M. D., Salavert, M., & Bosch, J.** (2017). Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas [Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(1), 41–46.
- World Health Organization.** Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (WHO, 2017).