

# Comparación de la prueba tridimensional con PCR múltiple, para detección de carbapenemasas

María Isabel Múnera-Jaramillo<sup>1,\*</sup>, Marlon Castrillón-Álvarez<sup>2</sup>, Xiomara Gutiérrez-Cadavid<sup>3</sup>,  
Mónica Cecilia Cuartas-Trujillo<sup>4</sup>, Blanca Susana Ramírez-Puerta<sup>5</sup>

## Resumen

**Objetivo:** Comparar la prueba fenotípica para la detección de carbapenemasas (Prueba Tridimensional -THT), con la prueba de biología molecular, reacción de polimerasa en cadena (PCR múltiple), para la detección de genes de resistencia.

**Materiales y métodos:** De un total de 118 aislamientos de cepas de bacterias Gram negativas, del programa de vigilancia de multirresistencia en un hospital de tercer nivel, fueron evaluadas para la detección de carbapenemasas por Test de Hodge tridimensional (THT) y PCR Múltiple. Se hicieron cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, índice de validez e índice de Youden (IY), con sus intervalos de confianza.

**Resultados:** Se observó que la prueba THT en comparación con PCR, presentó una sensibilidad de 98,41% (IC 95% 94,53 - 100), la especificidad fue de 83,64% (IC 95% 72,95 - 94,32) y los valores predictivos positivo y negativo fueron respectivamente 87,32 (IC 95% 78,88 - 95,77) y 97,87 (IC 95% 92,68 - 100). El índice de Youden fue 0,82 (IC 95% 0,72 - 0,92) y el índice de validez 91,53% (IC 95% 86,08 - 96,97)

**Conclusión:** La prueba tridimensional de Hodge (THT), para detección de resistencia a carbapenémicos, puede ser una prueba de rutina útil en el laboratorio para sugerir resistencia por carbapenemasas

**Palabras clave:** Carbapenémicos, beta-lactamasas, Reacción en Cadena de la Polimerasa, diagnóstico

## Comparison of tridimensional test with multiplex PCR for detection of carbapenemasas

### Abstract

**Objective:** To compare the phenotypic test for detection of carbapenemasas (Three-dimensional Test - THT), with molecular biology test (Multiplex PCR), for the detection of resistance genes.

**Methods:** A total of 118 isolates of Gram-negative bacteria strains from the multiresistant surveillance program at a third-level hospital were evaluated for the detection of carbapenemasas by three-dimensional test (THT) and the molecular biology PCR Multiple method. We calculated sensitivity, specificity, PPV, NPV, validity index and Youden index (IY), with their confidence intervals.

**Results:** THT test compared to the multiple PCR test had a sensitivity of 98.41% (95% CI 94.53 - 100), specificity was 83.64% (95% CI 72.95 - 94, 32) and positive and negative predictive values were respectively 87.32 (95% CI 78.88 - 95.77) and 97.87 (95% CI 92.68 - 100).

**Conclusion:** The Hodge three-dimensional test (THT), for detection of carbapenem resistance, may be a useful routine laboratory test to suggest resistance by carbapenemasas.

**Key words:** Carbapenems, beta-lactamases, Polymerase Chain Reaction, diagnostic test

## Introducción

En 2015 la Asamblea Mundial de la Salud aprobó el plan de acción global para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos (RAM), que tiene entre sus objetivos fortalecer los conocimientos y la base de evidencia científica a través de la vigilancia y la investigación.<sup>1</sup> Según la Organización Mundial de Salud (OMS), la resistencia a antibióticos es un problema

en aumento; y reporta que la resistencia de enterobacterias al tratamiento con carbapenémicos se ha diseminado mundialmente; lo que ha llevado a que en algunos países este grupo de antibióticos ya no sean eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *Klebsiella pneumoniae*.<sup>2</sup> Por ello, las infecciones bacterianas a causa de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, son de interés tanto desde el punto de vista clínico como en salud pública, debido

1 Médica Especialista en Microbiología y Parasitología, Especialista en Gerencia de la Salud Pública, Médica. microbióloga Hospital Pablo Tobón. Uribe, Calle 78B # 69 - 240. Medellín, Colombia.

2 Microbiólogo y Bioanalista.

3 Microbióloga y Bioanalista.

4 Bacterióloga, Especialista en Microbiología, Hospital Pablo Tobón Uribe.

5 Odontóloga, Especialista en Gerencia de la Salud Pública, Magíster en Epidemiología, Docente Titular Universidad de Antioquia,

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmunera@hptu.org.co

Recibido: 29/12/2017; Aceptado: 31/03/2018

Cómo citar este artículo: M.I Múnera-Jaramillo, *et al.* Comparación de la prueba tridimensional con PCR múltiple, para detección de carbapenemasas. *Infectio* 2018; 22(3): 192-198

a que actualmente los carbapenémicos hacen parte de los antibióticos de primera línea de tratamiento para infecciones severas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEES).<sup>3</sup>

Dada la relevancia del problema para la salud pública, la vigilancia de la RAM es una prioridad a nivel mundial, puesto que permite establecer las medidas de intervención de manera oportuna, así como orientar el tratamiento de los pacientes y definir estrategias para el control de la resistencia; por lo tanto el aumento de infecciones por microorganismos multi-resistentes conlleva un reto en la rápida identificación de cepas resistentes, mediante métodos costo efectivos, como las pruebas fenotípicas; que permitan tomar decisiones seguras para los pacientes<sup>4</sup> y que sean una alternativa frente al mayor costo que demandan las pruebas de biología molecular.

Por ello, Colombia en el Plan Decenal de Salud Pública (PDSP), propone entre sus metas la disminución de la morbilidad, mortalidad y discapacidad general por enfermedades transmisibles, y entre sus objetivos plantea la vigilancia de las mismas, así como reducir la carga de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), y contener la resistencia a los antimicrobianos.<sup>5</sup>

En la Vigilancia de la RAM, el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó que en Colombia en el primer semestre de 2016 en los servicios de hospitalización diferentes a cuidados intensivos (no UCI), hubo aumento en la resistencia a carbapenémicos para *Klebsiella pneumoniae* en comparación con 2015; mientras que para *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* la resistencia aumentó tanto en los servicios no UCI como en los UCI. Con base en estos hallazgos, el INS recomienda realizar pruebas de tamizaje como el test de Hodge Modificado (MHT por su sigla en inglés), así como las pruebas de sinergismo con ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y ácido fenil-borónico (PBA), para fortalecer la capacidad de los laboratorios en la detección de mecanismos de resistencia.<sup>6</sup>

Aunque las pruebas de biología molecular son los métodos de referencia para la detección de genes de resistencia, las pruebas fenotípicas para el tamizaje como el Test de Hodge Modificado (MHT)<sup>7</sup> pueden ser útiles en lugares de recursos limitados, para la identificación de microorganismos productores de carbapenemasas (CPM), los cuales tienen capacidad de hidrolizar dichos antibióticos y casi todos los betalactámicos de uso clínico.<sup>8</sup> Entre las pruebas fenotípicas, se encuentra el THT, que permite la detección de bacterias Gram negativas (Enterobacterias y/o bacilos Gram negativos no fermentadores - BGNNF) productoras de carbapenemasas, y se ha utilizado en Colombia, por su bajo costo y facilidad de implementación.<sup>9,10</sup>

La prueba THT, es una variante del Test de Hodge, propuesta para la confirmación de betalactamasas de tipo AmpC en enterobacterias, con 2 variantes según la forma de obtención de las enzimas: En el método directo se aplica la suspensión

de bacterias mientras que en el método indirecto se hace previamente la extracción de las betalactamasas a partir de la cepa, mediante 5 a 7 ciclos de congelación-descongelación, seguido de centrifugación para obtener el sedimento.<sup>11,12</sup> En ambos casos se puede aplicar la preparación de las colonias o el extracto enzimático sobre la superficie del agar o en una zona de incisión a partir del disco con antibiótico.<sup>13,14,15</sup>

Con el tiempo se han incorporado otras variaciones para la detección de CPM, tales como la utilización de un carbapenémico en lugar de Cefoxitina y utilización de otros métodos de lisis bacteriana de tipo mecánico o físico, tales como sonicación, ciclos de congelación - descongelación o el uso de buffer de lisis. Diferentes autores han utilizado la prueba THT para la detección de CPM en BGNNF, con resultados de sensibilidad en *Acinetobacter baumannii* del 99,1% (IC 95% 94,6%-100,0%) en la detección de enzimas tipo OXA-23-like. Del mismo modo, en *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito resultados de sensibilidad del 75,0 al 100,0% y de especificidad desde 71,4% a 98,4%, además en este germen se ha reportado buena concordancia en comparación con PCR múltiple, para la detección de *bla*<sub>VIM</sub>.<sup>10</sup>

El objetivo de este trabajo fue comparar la prueba THT para detección de carbapenemasas, con la prueba PCR múltiple (prueba de referencia), en cepas de bacterias Gram negativas, del programa de vigilancia de multiresistencia en un hospital de tercer nivel, con el propósito de aportar evidencia de la posible utilidad de este método como prueba de tamizaje, en la detección de resistencia a carbapenémicos.

## Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo para comparar la pruebas THT y PCR múltiple en la detección de resistencia a antibióticos carbapenémicos, en bacterias Gram negativas de la colección de cepas del programa de vigilancia de multiresistencia bacteriana de un Hospital de tercer nivel de la ciudad de Medellín, aisladas de pacientes infectados entre 2012 y 2014. El estudio fue considerado sin riesgo, con base en lo establecido en la resolución 8430/1993 del Ministerio de salud.

Las cepas de bacterias fueron previamente caracterizadas por PCR múltiple, para detección de genes de resistencia *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-23</sub> y *bla*<sub>OXA-51</sub>; según la técnica descrita por Poirel.<sup>16</sup> En la reacción de amplificación se utilizó un termociclador C1000Touch™ (BIO-RAD Laboratories, Inc., Francia). Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio. El patrón de Bandas fue analizado con Fotodocumentador (BIO-RAD Laboratories, Inc., Francia).

**Procedimientos:** A partir de las cepas previamente caracterizadas por PCR múltiple, para detección de genes de resistencia a carbapenémicos (método de referencia), el personal del laboratorio sin conocimiento de dichos resultados y previamente estandarizados en la prueba THT (prueba a eva-

luar), procesó las cepas como se describe a continuación: Se preparó una suspensión 0,5 McFarland de la cepa indicadora (*Escherichia coli* ATCC® 25922™) y se sembró en una caja de Muller-Hinton Agar™ (Becton Dickinson®), se adicionó un disco de Imipenem con concentración de 10µg (bioMérieux Clinical Diagnostics<sup>MR</sup> - Marcy L'Etoile France) en el centro de la caja. A continuación se hizo una incisión de 5mm de profundidad a partir del disco, hasta el borde del medio de cultivo. De cada cepa en estudio, se tomaron 2 porciones de la colonia con asa calibrada de 10µL y re-suspendieron en un vial con 200 µL de buffer de lisis (B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent -Thermo Scientific Rockford, IL USA), la mezcla se agitó con vortex por 1 minuto y luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó a 13.000 g por cuatro minutos. A partir de la suspensión se dispensaron 15 a 20 µL en la incisión del agar y se incubó la caja a 37°C por 18 a 22 horas. Se utilizaron como controles de la prueba las siguientes cepas de referencia de la "American Type Culture Collection" (ATCC): *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ (expresa gen *bla<sub>KPC</sub>*), como control positivo, y *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC® 700603™ (expresa *bla<sub>SHV-18</sub>* no productora de carbapenemasas), como control negativo.

En la identificación de los aislamientos y las pruebas de sensibilidad a carbapenémicos, se utilizó el Sistema Automatizado Vitek® Compact 2 (bioMérieux Clinical Diagnostics™ - Marcy L'Etoile France), según las recomendaciones del fabricante y acorde con estándares internacionales de control de calidad, del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio - CLSI M100-S24.<sup>17</sup> En la interpretación de los resultados para el método de referencia, se consideraron positivos los aislamientos con presencia de al menos uno de los genes de resistencia evaluados; mientras que en la prueba THT, los resultados fueron positivos cuando se observó deformación del halo de inhibición en la intersección con la cepa en estudio y la observación del halo de inhibición sin deformidad fue interpretado como negativo.

En el análisis de los datos se utilizaron el programa SPSS® Statistics 19,0 para el análisis univariado, y el Programa EPI-DAT 3.1 para cálculos de sensibilidad y especificidad, el índice de Youden y los valores predictivos.

## Resultados

Las cepas evaluadas provenían de aislamientos de pacientes infectados o colonizados, identificados como sospechosos de resistencia a antibióticos betalactámicos del grupo de los carbapenémicos, con base en los criterios CLSI M100-S24. La mayoría de los aislamientos provenían de hombres (66,1%), y por tipo de ubicación del paciente al momento de toma de la muestra, el 44,8% estaban en servicios de hospitalización diferentes de UCI/UCE, el 28,4% en UCI/UCE y el 26,7% en urgencias. El tipo de muestra y la edad de los pacientes se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Distribución del grupo de estudio según procedencia de los aislamientos.

Variable	Categoría	n	%
Edad (años)	<15	17	14,4
	15 a 24	11	9,3
	25-44	23	19,5
	45-64	51	43,2
	65 y más	16	13,6
Tipo de muestra	Orina	27	22,9
	Sangre	21	17,8
	Abdominales	19	16,1
	Piel y tej blandos	19	16,1
	Tejido osteomuscular	14	11,9
	Respiratorias	10	8,5
	Frotis rectal	8	6,8
Total		118	100

Las cepas aisladas correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* en 53 casos (44,9%); *Pseudomonas aeruginosa*, en 46 (39,0%); *Enterobacter cloacae complex*, en 12 (10,2%); *Acinetobacter baumannii*, en 5 (4,2%) y de otros aislamientos se presentaron 2 (1,7%).

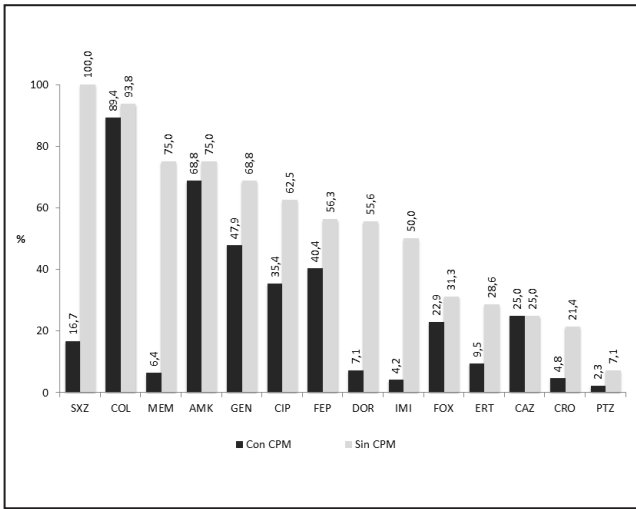
En la evaluación de resultados de sensibilidad antibiótica de los aislamientos de bacterias portadoras de genes de resistencia para carbapenémicos, se observó sensibilidad reducida en comparación con aquellas sin producción de CPM.

En general los porcentajes de sensibilidad fueron más altos en los aislamientos sin CPM, excepto en Ceftazidima (CAZ), cuyo comportamiento fue igual en aquellos con y sin CPM. La mayor diferencia en sensibilidad se observó en trimetoprim sulfametoxazol, con alta sensibilidad en enterobacterias no productoras de CPM; mientras que la menor diferencia se encontró en colistina, figura 1.

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de CPM no mostraron sensibilidad a ninguno de los betalactámicos evaluados, además en las otras clases de antibióticos la sensibilidad fue baja; excepto en el caso de colistina, figura 2.

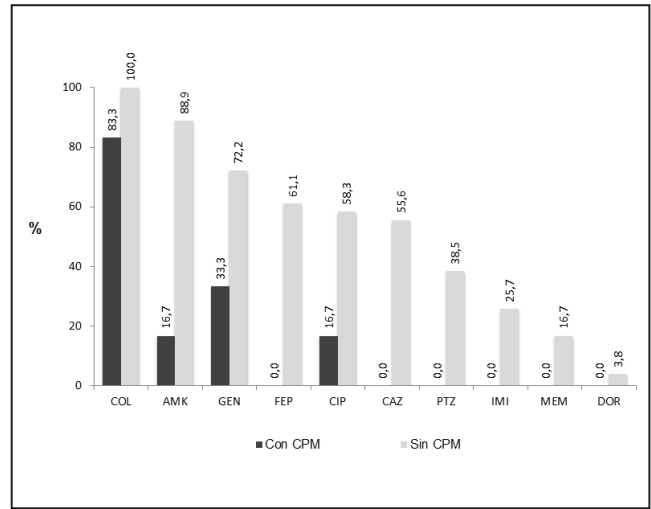
En la prueba PCR múltiple, se observó que en 55 de los aislamientos (46,6%) no estaban presentes los genes de resistencia evaluados y en 63 (53,4%) si se detectaron; de estos últimos, la mayoría fue *bla<sub>KPC</sub>* (79,4%), seguido de *bla<sub>VIM</sub>* (11,1%) y *bla<sub>OXA-23/+OXA-51</sub>* (7,9%). Se presentó un caso de *Pseudomonas aeruginosa* con genes tipo *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* simultáneamente (1,5%). No se detectaron genes de resistencia tipo *bla<sub>NDM</sub>* ni *bla<sub>OXA-48</sub>*.

Por otro lado, los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) más altos para imipenem y meropenem se encontraron en *Klebsiella pneumoniae* y en *Enterobacter cloacae*, en los portadores de genes *bla<sub>KPC</sub>*; mientras que en los negativos



**Figura 1.** Distribución de la sensibilidad a los antibióticos, en los aislamientos de enterobacterias con y sin carbapenemasas (CPM)

CPM: carbapenemasa, SZX: Trimetoprim Sulfametoxazol, COL: Colistina, MEM: Meropenem, AMK: Amikacina, GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, FEP: Cefepime, DOR: Doripenem, IMI: Imipenem, FOX: Cefoxitina, ERT: Ertapenem, CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxona, PTZ: Piperacilina-Tazobactam



**Figura 2.** Distribución de la sensibilidad a los antibióticos, en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* con y sin carbapenemasas

CPM: carbapenemasa, COL: Colistina, AMK: Amikacina, GEN: Gentamicina, FEP: Cefepime, CIP: Ciprofloxacina, CAZ: Ceftazidima, PTZ: Piperacilina-Tazobactam, IMI: Imipenem, MEM: Meropenem, DOR: Doripenem

para carbapenemasas se observaron MICs más bajos, tabla 2. De los 118 aislamientos, 63 fueron positivos para los genes de resistencia evaluados con la prueba PCR múltiple, de los cuales 62 también fueron positivos por la prueba THT y uno resultó negativo (falso negativo), que correspondía a un aislamiento de hemocultivo identificado como *Pseudomonas aeruginosa* con carbapenemasa tipo VIM. Además, 9 casos que fueron negativos con prueba de biología molecular, presentaron resultado positivo con la prueba THT (probables falsos positivos), todos enterobacterias (6 *Enterobacter cloacae* complex y 3 de *Klebsiella pneumoniae*), figuras 3, 4 y tabla 2.

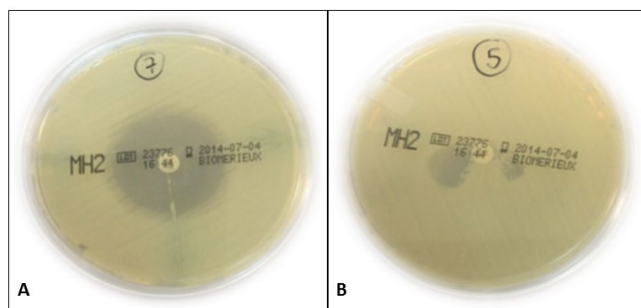
Los hallazgos de la prueba THT, en comparación con la prueba PCR múltiple, mostraron una sensibilidad de 98,41% (IC 95% 94,53% - 100,00%), y la especificidad fue del 83,64 % (IC 95 %: 72,95% - 94,32%). Adicionalmente el índice de validez fue 91,53 (IC 95 %: 86,08 - 96,97), el índice de Youden 0,82 (IC 95 %: 0,72 - 0,92) y el coeficiente de Kappa de Cohen 0,828 (IC 95 %: 0,727 - 0,929), tabla 3.

### Discusión

El mecanismo de acción de los carbapenémicos es similar al de otros betalactámicos, con algunas particularidades que les permiten un espectro más amplio y mayor estabilidad a la actividad hidrolítica en bacterias Gram negativas. En enterobacterias la resistencia se debe con más frecuencia a la producción de carbapenemasas y en menor proporción a la modificación en la afinidad de la BPPs, disminución de la permeabilidad de la membrana externa y/o la presencia de bombas de expulsión.<sup>18</sup> En *Pseudomonas aeruginosa* son más frecuentes los mecanismos intrínsecos por disminución de la permeabilidad, presencia de bombas de expulsión y sobre-expresión de enzimas modificadoras. La resistencia adquirida ocurre por carbapenemasas y/o betalactamasas de espectro extendido.<sup>19</sup> En *Acinetobacter baumannii* presenta con mayor frecuencia betalactamasas de la Clase D (oxacilinasas), seguido de bombas de expulsión y modificación de porinas.<sup>20</sup>

**Tabla 2.** Resultados de pruebas y concentración inhibitoria mínima (MIC) para Imipenem y Meropenem , según germen

Germen	THT		PCR Tipo de resistencia	n	%	Rango MIC	
	Positiva	Negativa				Imipenem (µg/mL)	Meropenem (µg/mL)
KPN	46	7	KPC	43	36,4	≤0.25 a >8	≤0.25 a >8
			Sin CPM	10	8,5	0.5 a 2	≤0.25 a >4
ECL	10	2	KPC	5	4,2	8 a >8	>8
			Sin CPM	7	5,9	≤0.25 a 4	≤0.25 a >8
PAE	8	38	KPC y/o VIM	9	7,6	>8	>8
			Sin CPM	37	31,4	<1 a >8	1 a >8
ABA	5	0	OXA-23/OXA-51	5	4,2	8 a >8	>8
			Sin CPM	0	0,0	0	0
Otros	2	0	KPC	1	0,8	4	1
			Sin CPM	1	0,8	≤0.25	≤0.25



**Figura 3.** Hallazgos de la prueba Tridimensional en procedimientos de laboratorio en hospital de tercer nivel

**A) Prueba THT con Resultado negativo:** sin producción de carbapenemasas, no se observa deformación del halo de inhibición

**B) Prueba THT con Resultado positivo:** con producción de carbapenemasas, se observa deformación del halo de inhibición

Los métodos fenotípicos para detección de resistencia son los más utilizados de rutina en los laboratorios, entre ellos el test de Hodge modificado (THM), debido a su bajo costo y fácil montaje, además posee buena concordancia en enterobacterias, aunque presenta falsos positivos en aislamientos con enzimas tipo BLEES y AmpC; sin embargo no ha sido recomendado para BGNNF.<sup>17</sup> En los últimos años la atención se ha centrado en las pruebas de hidrólisis de carbapenémicos tales como Carba NP y su versión comercial más reciente: Rapidec Carba NP™ (bioMérieux Clinical Diagnostics - Marcy L'Étoile France), cuyos resultados dependientes del cambio de color de la reacción, pueden generar dificultades en la interpretación, además se han reportado limitaciones para detección de enzimas tipo OXA y GES.<sup>21</sup>

El mayor potencial para pruebas como THT puede estar en la detección de carbapenemasas en BGNNF. Este tipo de bacterias representan una creciente amenaza en la región, en especial *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. En el primero el INS reportó una alta proporción de aislamientos no sensibles a carbapenémicos, de los cuales en 185 de 189 (98,4%) se detectaron genes de resistencia, identificados en su mayoría: 155 (82,8%) como productores de enzimas del grupo D de Ambler, y en alta proporción (75,5%) mediadas por genes tipo  $bla_{OXA-23+OXA-51}$ .<sup>22</sup> En este estudio el 100% de los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* presentó resistencia a carbapenémicos, mediada por carbapenemasas tipo  $bla_{OXA-23+OXA-51}$ . Desde el 2000 se ha reportado la producción de oxacilinasas (enzimas del grupo D de Ambler) como principal responsable de la resistencia a los carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii*, desafortunadamente una limitación de diferentes métodos fenotípicos es su baja sensibilidad para la detección de enzimas de este tipo,<sup>23</sup> lo cual aumenta el riesgo de diseminación y presentación de brotes. En el presente estudio en método THT detectó todos los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* que eran portadores de genes tipo  $bla_{OXA-23+OXA-51}$ .

La presencia de carbapenemasas en Colombia, en *Pseudomonas aeruginosa*, según los resultados de diferentes estudios se debe en primer lugar a genes tipo  $bla_{VIM}$ . El INS reportó

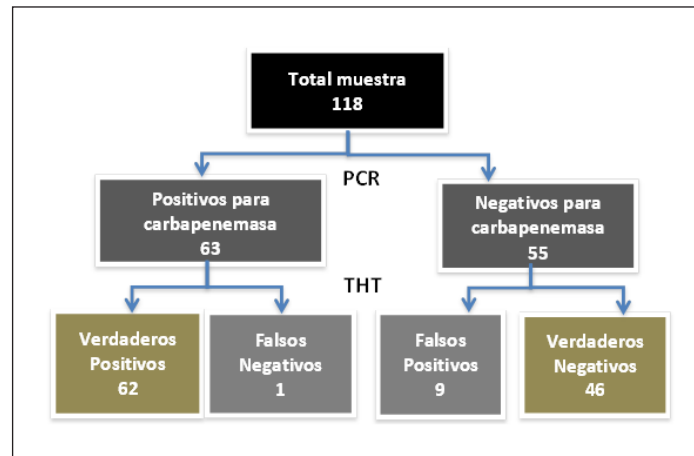
este mecanismo en 527 de 1274 (41,4%), seguido de KPC en 276 (21,7%) y en tercer lugar la combinación de VIM+KPC en 81 (6,4%) y en un estudio de Ocampo y col encontraron  $bla_{VIM}$  en 14 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de los cuales 9 fueron positivos por THT, con 5 resultados falsos negativos. En este estudio, la prueba THT presentó concordancia del 0,91 (IC95% 0,78 a 1,00) frente a PCR múltiple en BGNNF al detectar 13 de 14 cepas productoras de CPM y un resultado falso negativo. En contraste en el estudio de Ocampo-Rios, realizado en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: de 20 productoras de CPM confirmadas por PCR múltiple, la prueba THT fue positiva en 15, con resultados de concordancia moderada. En otro estudio realizado en aislamientos clínicos provenientes de 14 hospitales de Colombia, Correa A y colaboradores, de un total de 151 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* detectaron genes de resistencia  $bla_{KPC}$  o  $bla_{VIM}$  en 28, de los cuales 26 fueron positivos con la prueba THT, con resultados de Sensibilidad del 100% (IC95% 84-100), y Especificidad del 98,4 (IC95%: 93,8 a 99,7).<sup>9,10,22</sup>

Aunque en la literatura se han evaluado diferentes métodos fenotípicos en comparación con la detección de genes de resistencia y técnicas de secuenciación (métodos moleculares) para BGN, tanto enterobacterias como BGNNF, con el propósito de formular recomendaciones; los resultados sugieren que no existe un método fenotípico con potencial para detectar todos los tipos de CPM documentadas hasta el momento.<sup>24,25</sup>

En el caso particular de las enterobacterias el reto más importante es el riesgo de presencia de carbapenemasas en cepas con MICs en los rangos de sensibilidad con los puntos de corte actuales; en este estudio en 6 de 42 (9,5%) los MICs para meropenem en *Klebsiella pneumoniae* fueron menores o iguales a 2, este tipo de germen podría pasar inadvertido en los programas de vigilancia y ser la fuente de diseminación, incluso si se contara con pruebas moleculares en formato de PCR múltiple, cuya limitación es la incapacidad de detectar bacterias con nuevas mutaciones.<sup>26</sup> Este hallazgo también se ha observado en *Escherichia coli* productora de KPC y OXA-48, según lo reportado por investigadores del Laboratorio de Salud Pública de Ontario (Canadá), entre 14 a 20% de enterobacterias productoras de carbapenemasas se observan resultados con MIC clínico en el rango sensible.<sup>27</sup>

**Tabla 3.** Resultados de la comparación entre prueba tridimensional (THT) y PCR múltiple

Parámetro	Valor (%)	Intervalo de confianza 95%
Sensibilidad	98,41	94,53 – 100,00
Especificidad	83,64	72,95 – 94,32
VPP	87,32	78,88 – 95,77
VPN	97,87	92,68 – 100,00



**Figura 4.** Resultados de la prueba de biología molecular (PCR múltiple) y la prueba Tridimensional (THT)

El panorama de la detección de resistencia en los bacilos Gram negativos no fermentadores presenta dificultades aún no resueltas, en primer lugar porque la mayoría de métodos fenotípicos disponibles no han sido recomendados en forma explícita en las guías CLSI para detección de carbapenemasas, en segundo lugar porque incluso métodos comerciales más recientes, tales como Rapidec-Carba pueden presentar falsos negativos en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con enzimas tipo OXA-48, OXA-23 y OXA-24,<sup>28</sup> o el método Carba NP, en el que también se reportan falsos negativos en carbapenemasas tipo VIM y KPC en cepas con fenotipo hipermucoide de *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>29</sup> En este último germen se ha documentado también la amplia diversidad de mecanismos de resistencia diferentes a la producción de carbapenemasas como causa de resultados discrepantes frente a pruebas moleculares.

Lo antes expuesto, sugiere falta de acuerdo en los métodos de rutina a implementar en los laboratorios, especialmente en países como Colombia, en los que se dispone de pruebas moleculares para confirmación de carbapenemasas solo en laboratorios especializados, debido a su mayor costo y a las dificultades del sistema de salud vigente. En este contexto las pruebas fenotípicas con buen desempeño frente a los métodos moleculares, y con características como el costo menor e implementación simple, pueden ser una opción para la contención de la diseminación de resistencia.

En conclusión, dado que la prueba THT presentó buen desempeño para detección de CPM, tanto en enterobacterias como en BGNNF, en comparación con la prueba PCR múltiple; puede ser una alternativa en laboratorios de microbiología no especializados, dado su bajo costo y fácil implementación por la similitud técnica con el test de Hodge modificado utilizado de rutina por la mayoría de laboratorios, con la diferencia de la inoculación del extracto bacteriano en vez de la siembra directa de las colonias. En el presente estudio se preparó el extracto con el mismo buffer de extracción recomendado por CLSI para la prueba Carba NP, pero se pueden utilizar otros métodos, de tipo mecánico y/o físicos seguidos de centrifugación, utilizados en otras pruebas de

rutina en microbiología. Los medios de cultivo, los materiales e instrumentos necesarios para esta prueba hacen parte de los elementos mínimos requeridos para implementación de Laboratorios de Microbiología en Colombia y como todo procedimiento de laboratorio, se requiere entrenamiento y estandarización de la técnica.

### Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de sus centros de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés en el presente estudio. La financiación ha sido hecha por los propios autores

### Referencias

1. World Health Organization (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO Document Production Services. Geneva, Switzerland, 2015. Disponible en: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>. Consultado en mayo de 2017
2. Organización Mundial de la Salud OMS. Centro de prensa. Resistencia a los antimicrobianos. Septiembre de 2016. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Consultado en junio de 2017.
3. Delgado M, Sojo J, Pascual A, Rodríguez J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Therapeutic Advances in Infectious Disease. Ther Adv Infect Dis 2013; 1:49-69 <https://doi.org/10.1177/2049936113476284>
4. República de Colombia. Ministerio de Salud. Grupo Enfermedades Transmisibles. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Equipo de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Infecciones asociadas a dispositivos (PRO-R02.046). Instituto Nacional de Salud, 2014. Disponible

- en: <https://www.google.com.co/#q=PRO+Infecciones+asociadas+a+dispositivos.pdf>. Consultado en marzo de 2017.
5. República de Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1841, por la cual se adopta el Plan Decenal de Salud Pública 2012 - 2021. Bogotá, 2013. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1841-de-2013.pdf> <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1841-de-2013.pdf>. Consultado en marzo de 2017
  6. República de Colombia. Instituto Nacional de Salud (INS). Resultados de la Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana primer semestre 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Microbiologa/Informe%20resistencia%20Antimicrobiana%20Whonet%20primer%20semestre%202016.pdf>. Consultado en marzo de 2017.
  7. Bley VB, Rostirola AR, Zavascki AP, Barth AL. Performance of Quantification of Modified Hodge Test: An Evaluation with *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates. *Biomed Res Int*. 2014;2014:139305. doi: 10.1155/2014/139305. Epub 2014 Mar 26. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/139305/doi.org/10.1155/2014/139305>
  8. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 487–489. <https://doi.org/10.1093/jac/dks426>.
  9. Ocampo A, Giraldo L, Melo K, Obando A, Jimenez J. Variaciones al Test de Hodge modificado para detección de Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* Medicina y Laboratorio 2015; 21:551-561
  10. Correa A, Guzman A, Ospina D, Quinn J, Tafur J, Torres J, et al. Evaluation of the three-Dimensional (3D) Test as a Screening Tool for the detection of Carbapenemases in *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and *Acinetobacter baumannii* (Ab) D290. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267530935\\_Evaluation\\_of\\_the\\_Three-Dimensional\\_3D\\_Test\\_as\\_a\\_Screening\\_Tool\\_for\\_the\\_Detection\\_of\\_Carbapenemases\\_in\\_Pseudomonas\\_aeruginosa\\_Pa\\_and\\_Acinetobacter\\_baumannii\\_Ab](https://www.researchgate.net/publication/267530935_Evaluation_of_the_Three-Dimensional_3D_Test_as_a_Screening_Tool_for_the_Detection_of_Carbapenemases_in_Pseudomonas_aeruginosa_Pa_and_Acinetobacter_baumannii_Ab) [accessed Jul 9, 2017].
  11. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum B-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877–82
  12. Jacoby G AmpC B-Lactamases *Clin. Microbiol Rev* Jan 2009;22:161-182 <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
  13. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *J Clin Microbiol* 2000;38:1791-6
  14. Manchanda V, Singh NP. Occurrence and detection of AmpC B-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:415-18
  15. Shahid M, Malik A, Agrawal M and Singhal S Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC b-lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:684-687 <https://doi.org/10.1093/jac/dkh389>
  16. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(1):119-23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
  17. Clinical and Laboratory Standard Institute. CLSI M100-S24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth. Informational Supplement, January 2014.
  18. Doi Y, Chambers H F. Other  $\beta$ -Lactam Antibiotics In: Bennett JE, Dolin R. Mandell, Blaser M. Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases 8a. Ed, 2015. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. p.293-296
  19. D'Agata E. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas Species* In: Bennett JE y Dolin R. Mandell, Blaser M. Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases 8a. Ed, 2015. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. Cap 221 p 2518-2531.
  20. Phillips M. *Acinetobacter Species* In: Bennett JE y Dolin R. Mandell, Blaser M. Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases 8a. Ed, 2015. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. cap 224 p 2553-2557
  21. Hrabá J, Chudackova E, Papagiannitsis C. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 839–853
  22. Instituto Nacional de Salud (INS). Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IAAS), 2015.
  23. Sun K , Xu X, Yan J and Zhang L. Evaluation of Six Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemases in Gram negative Bacteria With Characterized Resistance Mechanisms *Ann Lab Med* 2017;37:305-312 <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.4.305>
  24. Lutgring JD, Limbago BM. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant- *Enterobacteriaceae* Detection. *J Clin Microbiol* 2016; 54:529–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.02771-15>
  25. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging B-lactamases in Gram negative bacilli. *Intern J Antimicrob Agents* 2013;41:99-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.006>
  26. Aguirre A, Martínez L Non-molecular detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates *J Infect Chemother* 2017;23:1-11 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2016.09.008>
  27. Fattouh R, Tijet N, McGeer A, Poutanen SM, Melano RG, Patel SN. What is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in low-prevalence settings? *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:1556–1559. <https://doi.org/10.1128/AAC.02304-15>.
  28. Hombach M, von Gunten B, Castelberg C, Bloemberg GV. Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2015;53:3828–3833. <https://doi.org/10.1128/JCM.02327-15>.
  29. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4578-80. <https://doi.org/10.1128/AAC.00878-13>.