



ASESORÍA JURÍDICA.

ESM / MTC

1

APRUEBA EL DOCUMENTO "RECOMENDACIONES PARA DETECCIÓN CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*", ELABORADO POR EL DEPTO. LABORATORIO BIOMÉDICO NACIONAL Y DE REFERENCIA.

RESOLUCIÓN EXENTA N° 000823 04/04.2018

SANTIAGO,

VISTOS: Providencia Interna N° 2696, de fecha 28 de diciembre de 2017, del Jefe Asesoría Jurídica; Providencia N° 2922, de fecha 26 de diciembre de 2017, del Director de este Instituto; Memorándum N° 819, del 22 de diciembre de 2017 de la Jefa del Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia; el documento técnico "Recomendaciones para Detección Carbapenemasas en Enterobacterias y Pseudomonas"; y,

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que, conforme el inciso final del artículo 57 del Decreto con Fuerza de Ley N° 1, del año 2005, el Instituto de Salud Pública de Chile servirá de laboratorio nacional y de referencia en los campos de la microbiología, inmunología, bromatología, farmacología, imagenología, radioterapia, bancos de sangre, laboratorio clínico, contaminación ambiental y salud ocupacional y desempeñará las demás funciones que le asigna dicha ley.

SEGUNDO: Que, en razón de lo anterior, el Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia de este Instituto ha redactado un documento que entrega recomendaciones para la realización del estudio fenotípico para la búsqueda de Carbapenemasas en Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, en los laboratorios clínicos públicos y privados del país, incorporando el estudio susceptibilidad, interpretación, informe y control de calidad.

TERCERO: Que, estas recomendaciones están dirigidas a los laboratorios clínicos del país para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana de Enterobacterias a los Antibióticos Carbapenémicos, en el marco de la Circular N°11, del 28 mayo 2012, que "Establece el sistema de vigilancia de resistencia en bacterias que causan Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)" y complementado con Circular N° 1, del 25 enero de 2013, y Norma Técnica N° 175, del 7 Agosto 2015⁹". Estas instrucciones aplican a los agentes bacterianos de cualquier origen o tipo de muestra aislados en el contexto de las IAAS y fueron complementadas en los ordinarios: ORD C/N° 160 del 28 enero del 2014, ORD C/N°227, del 9 febrero del 2016, el cual incorpora a *Pseudomonas aeruginosa* y ORD N° 1156, del 14 julio del 2017¹⁰.

El objetivo de este documento es entregar a los laboratorios clínicos del país, las distintas metodologías que se encuentran disponibles, para

realizar el estudio de detección de Carbapenemasas y así poder dar cumplimiento, de acuerdo a las normativas vigentes, a esta vigilancia.

CUARTO: Que, es necesario que estas recomendaciones sean aprobadas administrativamente; y,

TENIENDO PRESENTE: lo dispuesto en la Ley Orgánica Constitucional N° 18.575, de Bases Generales de la Administración del Estado; en la Ley N° 19.880, de Base de los procedimientos administrativos que rigen los actos de los órganos de la Administración del Estado; en los artículos 57, 59 letra a) del Decreto con Fuerza de Ley N° 1 de 2005, del Ministerio de Salud que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del Decreto Ley N° 2763 de 1979 y de las Leyes N° 18.933 y N° 18.469; la Resolución N° 1.600 de 2008, de la Contraloría General de la República, y las facultades que me confiere el Decreto Supremo N° 54, de 2018, del Ministerio de Salud, dicto la siguiente:

R E S O L U C I Ó N.

APRUEBESE las “Recomendaciones para Detección Carbapenemasas en Enterobacterias y Pseudomonas Aeruginosa” cuyo texto es el siguiente:

“RECOMENDACIONES PARA DETECCIÓN CARBAPENEMASAS EN ENTEROBACTERIAS Y PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

I. INTRODUCCIÓN.

Distintas especies de Enterobacterias y Pseudomonas Aeruginosa son una causa importante de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) y se diseminan rápidamente en los pacientes adquiriendo y transmitiendo material genético a través de plásmidos, con información que codifica resistencia antimicrobiana.

Las Carbapenemasas son enzimas del tipo β lactamasas de amplio espectro que producen resistencia a los antibióticos carbapenémicos como imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem, teniendo un directo impacto en la disponibilidad de alternativas terapéuticas.

En estas bacterias se han descrito tres clases de carbapenemasas: serin carbapenemasas, metalo β lactamasas y la tipo OXA. Las de mayor preocupación por el importante patrón epidémico y capacidad de diseminación genética son: la carbapenemasa KPC (serin carbapenemasa), carbapenemasa NDM-1 (metalo beta lactamasa) en enterobacterias y en *Pseudomonas aeruginosa* la carbapenemasa tipo KPC ha ido en aumento, debido a su gran capacidad de transferencia, lo que implica un real problema de salud pública por la dificultad de tratamiento, tiempos y costo de hospitalización y los riesgos de brotes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, siendo un alarmante problema mundial, además esta especie presenta una metalo beta lactamasa, tipo VIM, la que en muchos centros es endémica.

Para la detección en Enterobacterias, en las circulares vigentes se señala, que los laboratorios de hospitales públicos y privados del país, que detecten halos de inhibición a imipenem o meropenem menor o igual a 22 mm o CIM mayor o igual a 2 µg/mL, deben realizar test de screening fenotípicos tales como las pruebas colorimétrico-enzimático rápidas: Blue Carba o Carba NP, Test de Ácido borónico, Test de Hodge. Todas aquellas cepas que den alguna de las pruebas positivas de probable carbapenemasas, deben ser enviadas al Laboratorio de Referencia del ISP para su confirmación microbiológica y caracterización desde el punto de vista fenotípico y molecular.

El laboratorio de referencia del Instituto de Salud Pública de Chile, realiza vigilancia de la presencia de Carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp y cualquiera otra Enterobacteria que cumpla los criterios definidos previamente.

En cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sospechosas de presentar carbapenemasa, el laboratorio de referencia del Instituto de Salud Pública de Chile realiza el estudio fenotípico y molecular para su confirmación.

II. ABREVIATURAS

ATCC[®]: American Type Culture Collection

BLEE: Beta Lactamasa de Espectro Extendido.

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.

MBL: Metallo Beta Lactamasa.

MF: Mac Farland.

MHT: Test de Hodge modificado.

NDM: Metallo beta lactamasa tipo Nueva Delhi.

TSB: Trypticase Soy Broth.

THT: Test de Hodge modificado con Triton

III. DESARROLLO

1. Criterios de sospecha en el antibiograma de cepa productora de Carbapenemasa:

1.1 Enterobacterias:

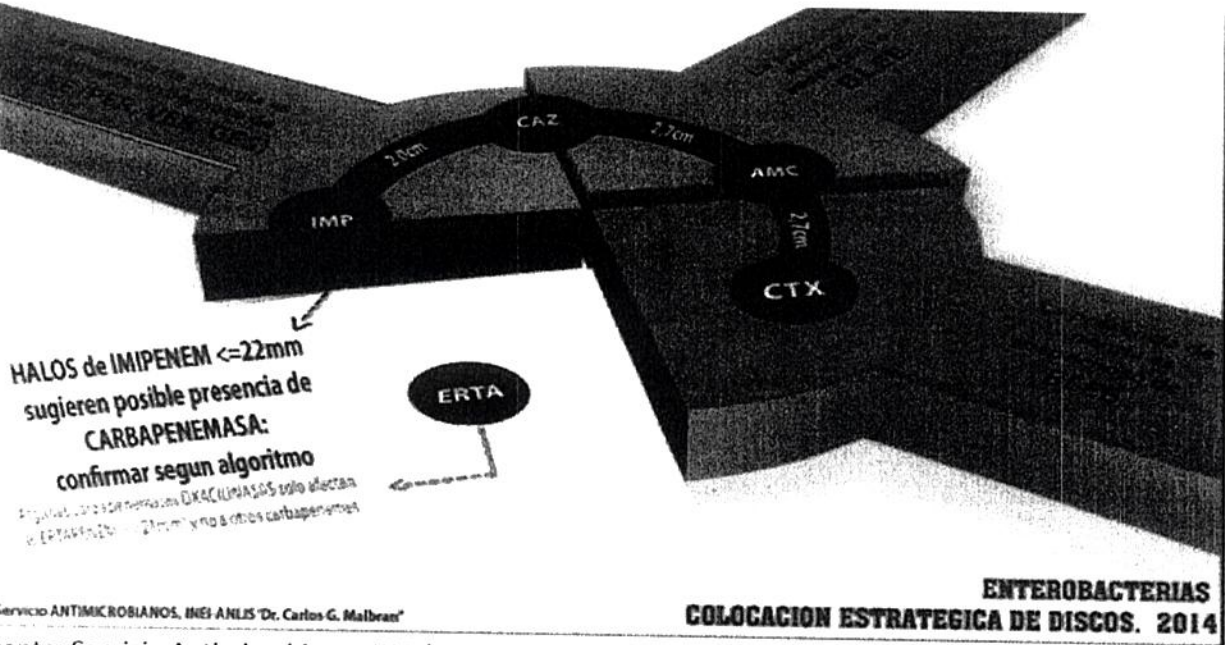
Método de Difusión: resultados de imipenem y/o meropenem intermedios o resistentes. La resistencia a ertapenem es menos específica para detección de carbapenemasas, puede ser

debida en gran medida a otros mecanismos, como impermeabilidad o por hiper producción de BLEE.

Métodos automatizados: un buen indicador de detección de carbapenemasas es un resultado de CIM en imipenem 2 - 4 y de meropenem 2-4 µg/mL.

Ante sospecha de presencia de Carbapenemasa en los resultados del antibiograma, se debe realizar pruebas fenotípicas específicas para su confirmación.

Un ejemplo de colocación de los sensidiscos en Enterobacterias, se observa en el siguiente esquema el cual permite la detección de probable carbapenemasa y también una BLEE



Fuente: Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Método de Difusión: para detección de carbapenemasas tipo KPC, es predictor un resultado de imipenem de 6 mm, resistencia de contacto.

Resistencia a imipenem y meropenem puede indicar la presencia de una carbapenemasa tipo KPC o una metalo Beta Lactamasa, la más común de las carbapenemasas identificadas en esta especie es la MBL tipo VIM.

Para confirmar la presencia de carbapenemasas, se requiere pruebas fenotípicas de detección de carbapenemasa, ya que la resistencia a carbapenémicos puede ser debida a otros mecanismos no enzimáticos como impermeabilidad, el cual afecta principalmente a imipenem.

1.3 Interpretación de la susceptibilidad a carbapenémicos:

Puntos de corte en antibióticos carbapenémicos para Enterobacterias (CLSI- 2017):

	DIFUSIÓN mm				CIM µg/mL		
	Concentración	S	I	R	S	I	R
Imipenem	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem	10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18	≤ 0,5	1	≥ 2

Puntos de corte en antibióticos carbapenémicos para *P. aeruginosa* (CLSI 2017):

	DIFUSIÓN				CIM		
	Concentración	S	I	R	S	I	R
Imipenem	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
Doripenem	10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8

2. Test fenotípicos adicionales para pesquisa de carbapenemasas:

En enero 2014 el hallazgo de una cepa de *Klebsiella oxytoca* KPC+ con un perfil de resistencia distinto a los descritos, presentando valores bajos de CIM para imipenem y meropenem, en el rango de categoría sensible (CLSI), lo cual dificulta su detección en el laboratorio de microbiología, porque no permite la sospecha de este mecanismo de resistencia, en especial en los sistemas automatizados. Basado en lo anterior, el Instituto de Salud Pública de Chile, mediante el ORD C/N° 160¹⁰, recomienda para unidades de pacientes críticos, quemados o trasplantados, la realización de tests de screening fenotípicos como Test de Hodge y/o Ácido borónico, en cultivos de *Klebsiella* spp. que presenten algún nivel de resistencia frente a cualquier carbapenémico, incluido ertapenem.

A partir del año 2012 se ha desarrollado una serie de test fenotípicos para la detección cada vez más rápida de las distintas carbapenemasas de importancia en clínica, lo que ha sido un buen aporte al diagnóstico, disminuyendo los tiempos y mejorando la sensibilidad y especificidad de las técnicas.

Se describe a continuación los distintos test fenotípicos disponibles, los que permiten la detección de las distintos tipos de carbapenemasas, indicando sus características generales, fundamento e interpretación.

Es importante recordar a los laboratorios que de acuerdo a ORD N° 01156 del 14 julio del 2017 ¹⁰, que aquellos que detecten la presencia de una carbapenemasa en Enterobacterias, mediante cualquiera de los test fenotípicos indicados, puede derivar la cepa al Instituto de Salud Pública para su confirmación.

El laboratorio debe informar los resultados de los carbapenémicos de acuerdo a las tablas CLSI vigentes¹, con los puntos de corte para difusión o CIM, según corresponda cuando no se ha confirmado la carbapenemasa en los test fenotípicos realizados.

La incorporación de nuevas técnicas fenotípicas más sensibles, específicas y en menor tiempo, permiten mejorar los tiempos de respuesta, con resultados que son un gran aporte para el control de infecciones, en los hospitales.

2.1 Pruebas fenotípicas rápidas para detección de producción de carbapenemasas:

Con el fin de poder realizar una detección rápida y específica de cepas productoras de carbapenemasas, se han desarrollado test de detección de la presencia de carbapenemasas del tipo serin carbapenemasas, metalo betalactamasa en un tiempo menor a las dos horas lo que es un gran aporte a los laboratorios para la toma de decisiones a nivel hospitalario. Para la detección de carbapenemasas tipo OXA estas pruebas presentan menor sensibilidad.

Estos métodos se basan en la hidrólisis de imipenem por parte de la bacteria, que es detectado por cambio de pH del indicador. Estos test han reportado cerca de un 100% de sensibilidad y especificidad.

Los laboratorios clínicos pueden preparar el test en forma completa siguiendo las instrucciones indicadas en las publicaciones de referencia. Actualmente para ambos test se dispone además de Kit comerciales.

El Laboratorio de Referencia realizó la verificación de las metodologías originales: Carba NP y Blue Carba, de acuerdo al protocolo indicado en las publicaciones originales, utilizando cepas de referencia como controles correspondientes a los distintos tipos de carbapenemasas.

Carba NP y Blue Carba son test para detección de los distintos tipos de carbapenemasas, métodos simple, confiable y útil para los laboratorios clínicos que permite detectar en forma rápida la presencia de estas enzimas.

En la siguiente tabla se muestra la comparación de ambos métodos rápidos que fueron verificados en el Instituto de Salud Pública de Chile para identificación de distintos tipos de carbapenemasas:

Categoría	CARBA NP 60 cepas	BLUE CARBA 41 cepas
Tiempo	Rápida < 2 horas	Rápida < 2 horas
Sensibilidad	100%	100%
Especificidad	100%	100%
Reproducible	SI	SI
Costo	Relativo (Buffer / imipenem)	Bajo (imipenem)
Complejidad	Relativa (Buffer)	Baja
Requisitos del Cultivo	Extracto colonias	Colonias directa
Interpretación	Rojo al amarillo/ naranja	Azul a amarillo
Capacidad detección	Todas las carbapenemasas, tipo OXA dan tardíamente o más débil	Todas las carbapenemasas tipo OXA dan tardíamente o más débil

Fuente: Laboratorio Referencia ISP.

2.1.1 Test Carba NP

En documento CLSI 2017 se encuentra descrito el Test Carba NP: “CARBA NP: Detección de Carbapenemasas en Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.”^{1, 4}.

Es un método colorimétrico que utiliza como indicador de pH: rojo fenol, cuando se produce la hidrólisis del imipenem, por presencia de la carbapenemasa, vira el indicador de rojo a amarillo.

El método comprende la aplicación de las tablas 3C, para casos en que se utiliza puntos de corte para carbapenemicos por CIM descritos en documento M100 – S20 (Enero 2010), el cual permite detectar la producción de carbapenemasa con fines de control de infecciones o epidemiológicos. No se modifica la interpretación de susceptibilidad cuando se obtiene resultados Carba NP positivos.

La tabla 3C-1 corresponde cuando el Laboratorio utiliza los puntos de corte para carbapenemicos anteriores a Enero 2010, con CIM de imipenem o meropenem de 2 a 4 µg/mL o

de ertapenem CIM de 2 µg/mL. Con resultados Carba NP positivos se informa los carbapenémicos como resistentes independiente del valor del CIM. Si el resultado es negativo, se utiliza los puntos de corte vigentes.

Reactivos:

Agua para laboratorio clínico

Imipenem, en polvo estándar de referencia

Buffer Tris HCl pH 7,4 para extracción de la proteína bacteriana

Sulfato de Zinc heptahidrato

Rojo fenol

Solución de NaOH 1 N

HCl al 10%

Tubos de microcentrifuga transparentes de 1,5 mL

Asas de inoculación 1µL

Preparación de soluciones:

Solución de sulfato de Zinc heptahidrato 10mM

Pesar 1.4 g de la $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y agregar 500 mL de agua (CLRW). Disolver y almacenar la solución a temperatura ambiente. Almacenar máximo por un año.

Solución de rojo fenol 0,5%

Pesar 1.25 g de polvo y agregar sobre 250 mL de agua (CLRW). Disolver y mantener a temperatura ambiente. Mezclar bien antes de usar. Almacenar máximo por un año.

Solución NaOH 0,1 N

Agregar 20 ml de NaOH 1 N a 180 mL de agua (CLRW). Conservar a temperatura ambiente por máximo un año.

Carba NP solución A

En un vaso de precipitado de 25 – 50 mL, agregar 2 mL de la solución de rojo fenol a 16.6 mL de agua (CLRW).

Agregar 180 µL de solución de sulfato de zinc 10 mM

Ajustar pH 7.8 ± 0.1 con solución de NaOH 0.1 N o con HCl 10% si el pH es muy alto.

Mantener entre 4 – 8°C en pequeños viales protegiendo de la exposición prolongada a la luz.

Conservar no más de dos semanas. La solución debería permanecer roja o rojo anaranjado, no usar si vira a otro color.

Carba NP solución B (solución A + 6 mg / mL de imipenem)

Determine la cantidad de solución B necesario por paciente, considerando 100 µL por tubo considerando: 2 aislamientos por paciente, un control negativo, un control positivo y un control de reactivo no inoculado, total 500 µL.

Pesar aproximadamente 10 – 20 mg de imipenem. Es útil pesar al menos 10 mg de imipenem. El ejemplo de cálculo a realizar es el siguiente: $18 \text{ mg de imipenem} / 6 = 3 \text{ mL de solución A}$ que es suficiente para 30 tubos.

Conservar refrigerado 4 – 8°C máximo por días.

Procedimiento:

Etiquetar dos tubos de microcentrifuga por cada cepa en estudio: tubos “a” y “b”, control de calidad positivo y negativo, más control de reactivo no inoculado.

Agregar 100 µL del reactivo para extraer la proteína bacteriana a cada tubo.

Para cada aislamiento a testear, emulsionar una asada (1µL) de la cepa en estudio incubada toda la noche en placa de agar sangre en los tubos rotulados como “a” y “b”.

No usar cultivo bacteriano desde placas selectivas o placas con antibióticos.

Agitar cada tubo por 5 segundos.

Agregar 100 µL de **Solución A al tubo “a”**.

Agregar 100 µL de **Solución B al tubo “b”**.

Agitar ambos tubos. Incubar a 35°C ± 2 °C hasta por 2 horas.

Aislamientos que demuestren resultados positivos antes de 2 horas pueden ser informados como productores de carbapenemasa.

- Interpretación:
- Leer los tubos controles de “a” y “b” no inoculados: ambos tubos deben ser rojos o rojo anaranjado. Si el tubo tiene otro color debe ser invalidado el test.
 - Leer tubo “a”: debe ser rojo o rojo anaranjado, si el tubo tiene otro control se invalida el test.
 - Leer el tubo “b” si el color es rojo o rojo naranja se interpreta como negativo. Color naranja claro, amarillo oscuro o amarillo es positivo. Color naranja test inválido.
 - Un leve cambio de color se puede observar al agregar el imipenem a la solución A, siempre compare con los tubos controles.
 - Reactivos deteriorados pueden invalidar los resultados.
 - Chequear el pH de la Solución A, si es < 7,8 prepare solución fresca de solución A y B.

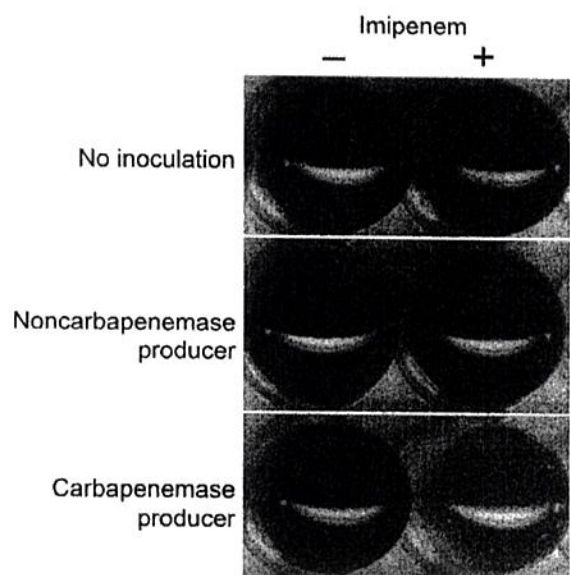
Resultados por cepa en estudio		
Tubo “a” Solución A Control Interno	Tubo “b” Solución B	Interpretación e informe
Rojo o rojo anaranjado	Rojo o rojo anaranjado	Negativo , no se detecta carbapenemasa
Rojo o rojo anaranjado	naranja claro, amarillo oscuro o amarillo	Positivo, producción de carbapenemasa
Rojo o rojo anaranjado	naranja	Invalidado
Naranja, naranja claro, amarillo oscuro o amarillo	Cualquier color	Invalidado

Control de Calidad:

Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 – Carbapenemasa positivo

Control negativo: *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706 – Carbapenemasa negativo

Interpretación de los colores del Test



Fuente: Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. J Clin Microbiol. 2012;50(11):3773-3776.

Este test se puede preparar en el laboratorio, además está disponible comercialmente como “Kit Rapid Carba NP” de Bio Merieux.

El Laboratorio Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) en un trabajo de tesis en conjunto con la Universidad de Chile, realizó la verificación de esta técnica utilizando cepas controles positivas de distintos grupos de carbapenemasas y cepas controles negativas que presentaban resistencia a carbapenémicos sin ser productoras de carbapenemasa, esta verificación se realizó siguiendo el protocolo original de Nordmann P. and cols.20124 ; en el punto 2.1 se muestra el estudio comparativo con el Test Blue Carba.

2.1.2 Test Blue Carba

Corresponde a un test para detección de Carbapenemasa, publicado por Pires y cols, Año 2013⁵.

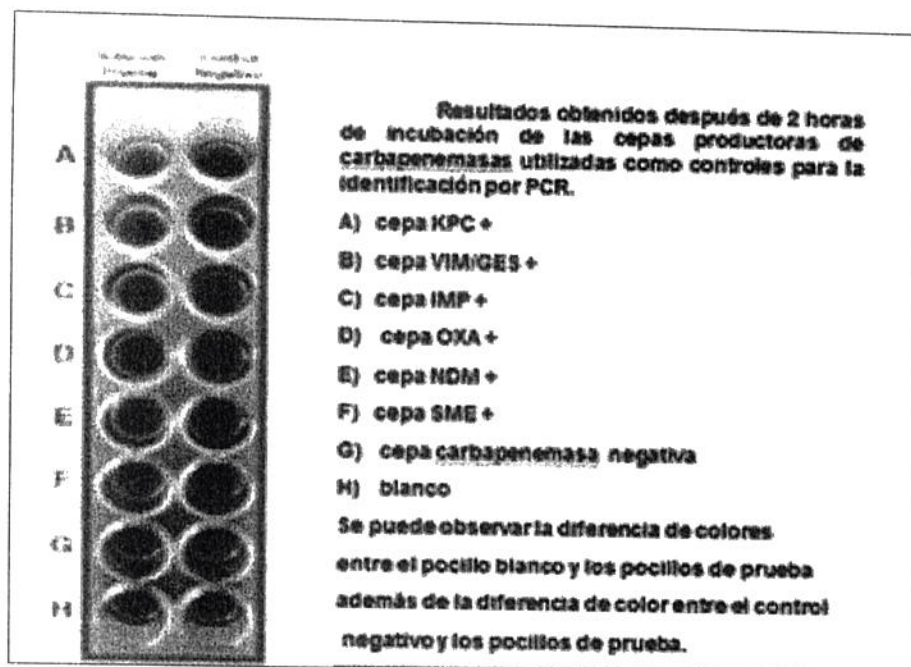
Permite la detección los distintos tipos de carbapenemasas, es una test simple y confiable para los laboratorios clínicos que pueden detectar en forma rápida la presencia de estas enzimas. Esta prueba es una modificación del Test Carba NP descrito en punto 4.1 de este documento.

La prueba se realiza directamente desde el cultivo bacteriano. Actualmente hay publicaciones donde validan el test para uso directo en muestras clínicas como desde el hemocultivo.

Utiliza como indicador de pH, azul de Bromotimol el cual ante la presencia de hidrólisis del imipenem vira de azul a amarillo.

En la figura se puede apreciar en la columna de la izquierda, columna 1, el cambio de color del indicador de azul a amarillo, en las distintas cepas de referencia utilizadas como controles, cepas productoras de distintos tipos de carbapenemasas, comparadas con la columna de la derecha, columna 2, utilizada para control negativo de la muestra la cual no contiene imipenem, además se utiliza un control de reactivo no inoculado (fila H).

Interpretación



Fuente: Laboratorio Referencia ISP.

Informe de resultados

Viraje de azul a amarillo resultado positivo, cepa productora de carbapenemasa

Sin viraje de color, resultado negativo, no se detecta carbapenemasa.

Cada vez que se realiza la prueba utilizar cepas controles.

Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705 – Carbapenemasa positivo

Control negativo: *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1706 – Carbapenemasa negativo

Este test se puede preparar en el laboratorio y además se encuentra disponible comercialmente en forma de kit, tabletas diagnósticas impregnadas con imipenem y azul de bromo timol: tabletas "Rapid Carba Blue[®]", Rosco.

Este método puede ser aplicado en Enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp.

2.2. Test de Hodge modificado (MHT):

Test fenotípico para confirmación de la producción de carbapenemasas en Enterobacterias, de acuerdo a CLSI vigente¹, tabla 2 A, Supl. Tabla 2 A.

El procedimiento indicado es el siguiente:

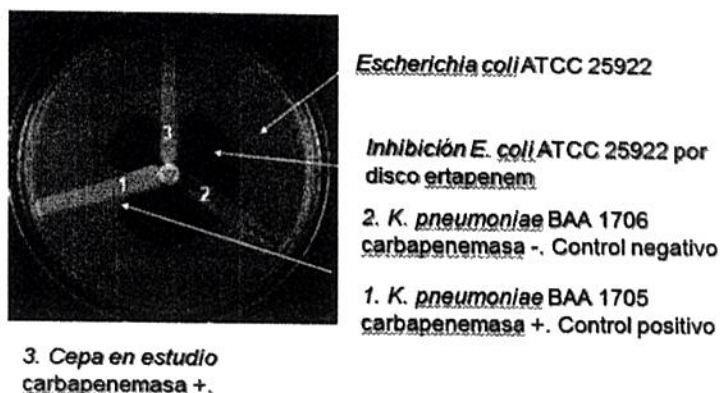
- Estandarizar 0,5 MF cepa *E. coli* ATCC[®] 25922. Esta cepa es utilizada como siembra base de la placa por su característica de ser sensible a los carbapenémicos. Diluir 1/10 en suero fisiológico.
- Sembrar 2 placas agar Mueller Hinton con la cepa *E. coli* ATCC[®] 25922 diluida 1/10.
- Dejar secar entre 3 -10 minutos.
- Colocar en una placa al centro el disco de meropenem 10µg y en la otra placa el disco de ertapenem 10 µg. No es recomendado el uso de discos de imipenem para esta prueba (CLSI).
- Con asa 10 µL sembrar en línea hacia el antimicrobiano las cepas en estudio y las cepas controles. Ver figura.
- Incubar 35 +/- 2°C por 16-20 horas.
- Control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] BAA 1705, la cual constituye una cepa productora de carbapenemasas tipo KPC.

- Control negativo *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1706 que corresponde a una cepa resistente a carbapenémicos por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas.

Interpretación de los resultados:

Resultado positivo, se observa formación de una punta de flecha por el crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC® 25922 en la intersección entre el halo de inhibición (generado por la difusión del antibiótico) y la estría de la cepa productora de carbapenemasa.

La carbapenemasa es liberada al medio, permitiendo el desarrollo de la *E. coli*, observándose una hendidura en la parte proximal al disco de meropenem y/o ertapenem



Fuente: Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS.

2.3 Test de Hodge Modificado con Tritón (THT)

Protocolo desarrollado por el Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS^{2,3}, utiliza la misma metodología original definida en CLSI, detallada en el punto anterior, e incorpora un detergente como Tritón a la placa de Mueller Hinton permitiendo una mayor sensibilidad y especificidad para la detección de los distintos tipos de carbapenemasas.

El test de Hodge original presenta resultados falsos positivos en presencia de cepas productoras de AmpC, BLEE y también por pérdidas de porinas, además resultados falsos negativos pueden presentarse ocasionalmente en aislamientos con carbapenemasa tipo NDM.

Este Test de Hodge puede ser utilizado para detección de carbapenemasas también en *P. aeruginosa*, en este caso se utiliza como indicador la cepa *K. pneumoniae* ATCC® 700603 en lugar de *E. coli* ATCC® 25922.

En la figura siguiente se grafica la preparación de las placas de agar Mueller Hinton con el detergente Tritón:

Se agrega 50 µL de Tritón X-100 a placas de Agar Mueller Hinton que se encuentran sin presencia de humedad, se distribuye con una tórula por toda la superficie de la placa, hasta que se observe absorción completa. Eliminar la humedad adicional a 35°C.

Sembrar la placa con la cepa *E. coli* ATCC® 25922 estandarizada a 0,5 MF.

Colocar el disco de ertapenem 10µg o de meropenem 10µg

Con asa 10µL sembrar en línea hacia el antimicrobiano las cepas en estudio y las cepas controles.

Incubar 35 ± 2°C por 16-20 horas.



Fuente: Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán". Adaptado por Dr. Fernando Pasterán y cols.

Las placas preparadas con Tritón tienen una estabilidad de 2 meses, mantenidas refrigeradas y selladas.

El procedimiento de siembra, interpretación y control es el mismo que el indicado para MHT en el punto 2.2.

2.4 Test de Ácido borónico

El ácido borónico es un inhibidor selectivo de las carbapenemasas tipo A – serin carbapenemasas (KPC, Sme, Nmc), IMI y GES) observándose una sinergia entre el disco de ácido borónico y el antibiótico carbapenémico.

La prueba se realiza de acuerdo a indicaciones de Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán"² utilizando discos impregnados con una concentración de 300 µg de ácido borónico. Estos discos pueden ser comerciales o preparados localmente en el laboratorio (impregnación de discos estériles). La duración de los discos si son preparados en el laboratorio, la dan los resultados del control de calidad con las cepas controles ATCC® positivas y negativas, si son comerciales de acuerdo a indicaciones del fabricante.

Consideraciones:

El ácido borónico tiene baja especificidad para detectar la presencia de carbapenemasas en cepas que presenten altos niveles de AmpC, como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y en *P. aeruginosa*.

El procedimiento de colocación de los discos ácido borónico, se realiza de la siguiente manera:

Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland y sembrar placa de agar Mueller Hinton.

Colocar los discos de imipenem 10µg y de meropenem 10 µg y ácido borónico de acuerdo a esquema; se deben depositar cuidadosamente a una distancia de centro a centro igual a la mitad

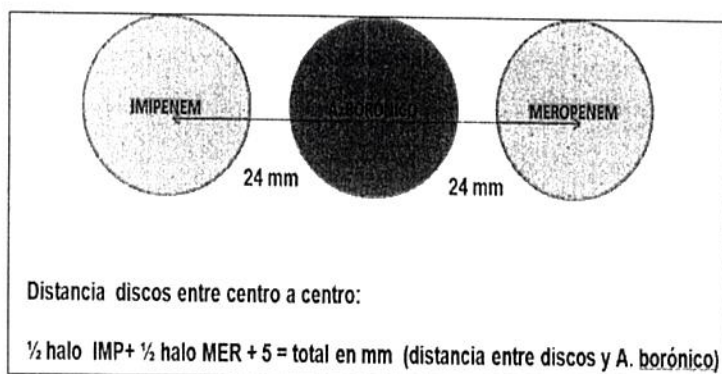
de la lectura obtenida con imipenem (radio en mm) más la mitad de la lectura obtenida con meropenem (radio en mm) más 5 mm.²

Ejemplo:

Imipenem: Halo 20 mm / 2 = 10 mm (radio)

Meropenem: Halo 18 mm / 2 = 9 mm (radio)

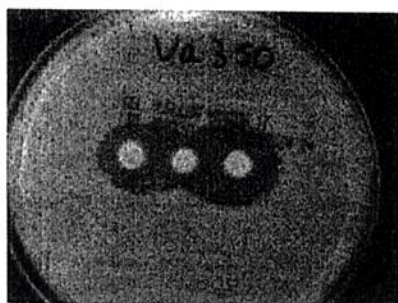
Por lo tanto: 10 + 9 + 5 = 24 mm (distancia a aplicar)



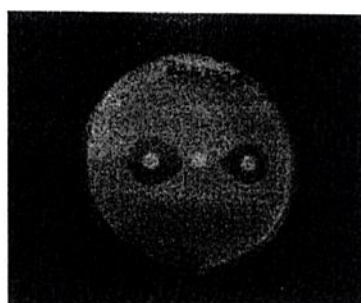
Control positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1705

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1706

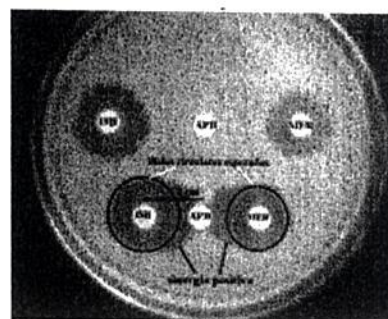
Interpretación: El test es positivo cuando se observa sinergia o ensanchamiento del halo de inhibición entre los discos de los carbapenémicos y el disco de ácido borónico, debe haber sinergia con ambos carbapenémicos, como se observa en las imágenes.



Cepa en estudio: positiva



Control (+): *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1705



Fuente: Servicio Antimicrobianos, Inst. Malbrán / REDLAVRA/OPS

Reactivos para preparación de disco

Solución madre, 3 aminofenil Borónico 300 mg/mL. Puede utilizarse dependiendo de la presentación:

- APB hemisulfato
- APB monohidrato
- APB hidrocloreto

Diluir la Solución madre preparada en 1/10 en agua destilada estéril. Concentración final 30 mg/mL = 30 µg/µl

Discos estériles de papel de 6 mm de diámetro:

Depositar los discos en una placa estéril (no superponer). Agregar cuidadosamente 10 µl por disco (concentración final 300 µg/disco). Cerrar la placa, dejar impregnar y secar por 3 a 5 horas a 35°C. Registrar el lote preparado.

Guardar los discos impregnados en un frasco estéril de cierre hermético para evitar la humedad que puede afectar la estabilidad de los discos, se recomienda agregar un desecante. Mantener a -20° C.

En estas condiciones los discos pueden durar hasta 2 años.

Siempre se debe controlar cada lote preparado, con las cepas:

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1705

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 1706

2.5 Test EDTA:

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es una sustancia utilizada como agente quelante, debido a que tiene la capacidad de combinarse con iones metálicos para formar complejos cíclicos no iónicos, solubles en agua y no dissociables.

Los discos impregnados con este compuesto permite la detección de carbapenemasas del tipo Meta Beta lactamasa (MBL), solamente las carbapenemasas de este grupo son inhibidas por esta molécula.

La prueba de detección de MBL puede ser usada en Enterobacterias como en *Pseudomonas aeruginosa*.

Procedimiento:

Al realizar el antibiograma, colocar el disco de EDTA entre los discos de imipenem y de meropenem a una distancia de 15 mm. Estandarizar la cepa en estudio a 0,5 Mac Farland y sembrar placa de agar Mueller Hinton. Observar figura.

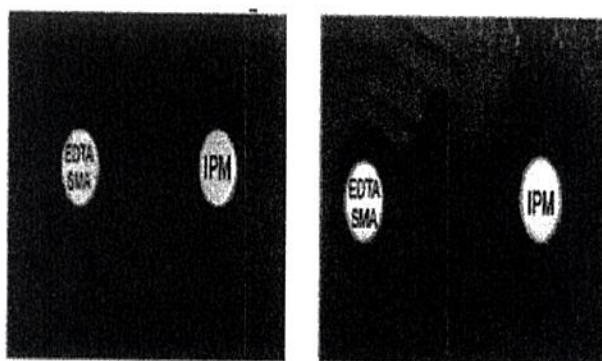


Figura Prueba del doble disco positiva para la detección de MBL.

Interpretación: Resultado positivo cuando se observa una sinergia entre los discos de carbapenémicos y el disco de EDTA, lo que es interpretado como probable presencia de carbapenemasa tipo MBL.

Los discos EDTA pueden ser adquiridos comercialmente o preparados en el laboratorio de acuerdo a protocolo del Servicio Antimicrobianos, Inst. Malbrán Argentina/ REDLAVRA/OPS².

Reactivos para preparación de discos:

Solución acuosa de EDTA

Solución de Mercaptoacético de Sodio o de Tioglicolato de Sodio

Discos estériles de papel de 6 mm de diámetro

Solución 1: Preparar una solución acuosa de EDTA: sal disódica dihidratada, 0,5 Molar pH 8: Llevar a pH 8 con NaOH 1 N o 0,1 N. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución 2: Preparar una solución acuosa de mercaptoacético de sodio o tioglicolato de sodio (SMA) de 300 mg/mL. Almacenar refrigerado.

Mezclar 2 volúmenes de solución 1 con 3 volúmenes de solución 2.

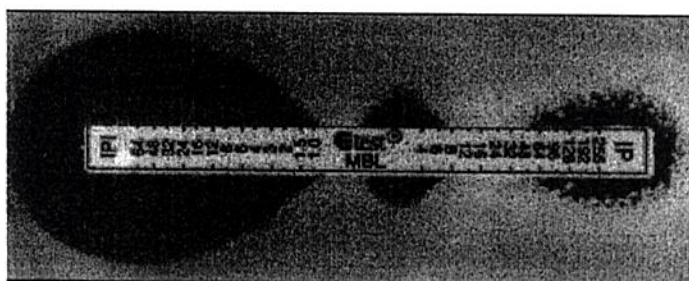
Agregar 10 µL a cada disco estéril. Concentración final 750 µg EDTA +1900 µg de SMA.

Cerrar la placa, dejar impregnar y secar por 3 a 5 horas a 35°C. Registrar el lote preparado.

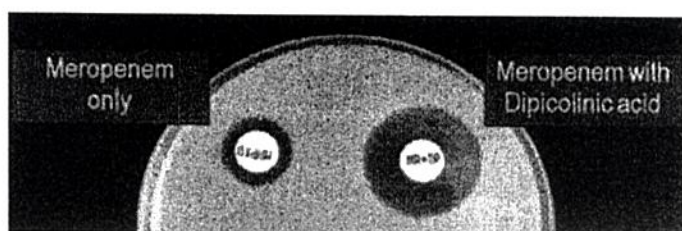
Guardar los discos impregnados en un frasco estéril de cierre hermético para evitar la humedad que puede afectar la estabilidad de los discos, se recomienda agregar un desecante. Mantener a -20° C.

Determinación de MBL por epsilometría: tiras comerciales, dobles, impregnadas con concentraciones seriadas de imipenem por uno de los extremos y por el otro con concentraciones seriadas de imipenem con EDTA.

La diferencia del valor de inhibición, evidenciado con la diferencia en las concentraciones entre ambos lados, permite identificar la presencia de una MBL. La interpretación de la lectura debe ser de acuerdo al inserto.



Determinación de MBL por uso de pastillas sensitabs: pastillas comerciales que se encuentran impregnadas con ácido dipicolínico el cual cumple la misma función que la molécula de EDTA anteriormente descrita y permite identificar carbapenemasas del tipo MBL. La interpretación de la lectura debe ser de acuerdo al inserto y se basa en la diferencia de valores de inhibición obtenidos, entre el carbapenémico y la combinación del carbapenémico con la molecular de ácido dipicolínico.



2.6 Tabletas diagnósticas:

- KPC+MBL Rosco Diagnostica®:kit confirmatorio:

Este kit contiene las siguientes tabletas diagnósticas:

- Meropenem de 10µg
- Meropenem/cloxacilina: para detección de AmpC, una diferencia ≥ 5 mm en la zona de inhibición entre meropenem y meropenem/cloxacilina indica actividad de AmpC.
- Meropenem/ ácido fenil borónico: para detección de carbapenemasa tipo KPC, una diferencia ≥ 4 mm en la zona de inhibición entre meropenem y meropenem/ ácido fenil borónico indica presencia de KPC.
- Meropenem/ácido dipicolínico: para detección de MBL, una diferencia ≥ 5 mm en la zona de inhibición entre meropenem y meropenem/cloxacilina indica presencia de una MBL.

- KPC + MBL y OXA 48 Rosco Diagnostica®:kit confirmatorio

Este Kit contiene las mismas tabletas diagnósticas que el kit anterior e incorpora las tabletas de temociclina de 30 µg.

Si una Enterobacteria da todos los test de sinergia negativos con las tabletas diagnósticas de: cloxacilina, a. fenil borónico, a. dipicolínico y no presenta zonas de inhibición con temociclina, es presuntivamente una bacteria productora de carbapenemasa tipo OXA-48 o similar y debe ser

estudiada. Una característica de este tipo de carbapenemasas es que presentan resistencia alta a piperacilina/tazobactam.

Este test es para ser aplicado en enterobacterias.

- KPC+ MBL en *P. aeruginosa* (*Acinetobacter*) Rosco Diagnostica®: kit confirmatorio

Este Kit contiene las combinaciones de tabletas diagnósticas, para detección de carbapenemasas tipo KPC y Metallo betalactamasa y puede ser usado en forma específica en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*.

2.7 Tiras Epsilométricas:

Las tiras epsilométricas, para detección de carbapenemasas, pueden ser obtenidas comercialmente de las marcas Liofilchem® y Biomerieux®, pueden presentarse en distintas combinaciones dependiendo de la marca.

Para su aplicación, interpretación y control de calidad, se debe seguir las instrucciones del fabricante.

- Tiras epsilométricas KPC Ertapenem /Ertapenem + ácido fenilborónico: para detección de carbapenemasas tipo KPC.
- Tiras epsilométricas KPC Meropenem /Meropenem + ácido fenilborónico: para detección de carbapenemasas tipo KPC.
- Tiras epsilométricas MBL Imipenem /Imipenem + EDTA: para detección de Metallo Beta lactamasas.
- Tiras epsilométricas MBL Meropenem /Meropenem + EDTA: para detección de Metallo Beta Lactamasa

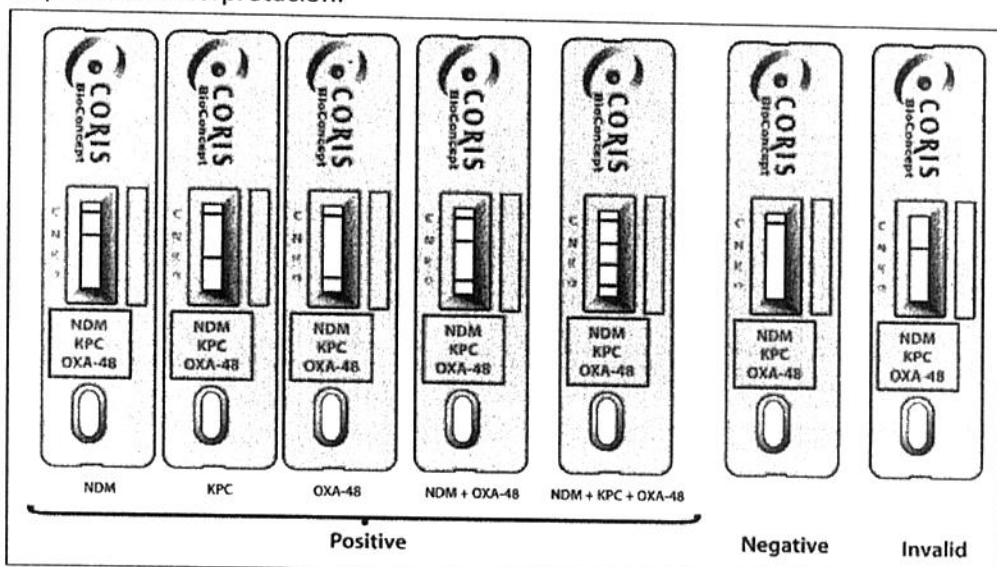
3. Test Confirmatorio Fenotípico Enzimático, Inmunocromatografía. CORIS®

Corresponde a un test para detección de Carbapenemasa, de los autores Daniele Meunier and cols., publicado el año 2016⁶. Este es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral que detecta epítomos, (determinante antigénico) específicos de carbapenemasas, tipo KPC, OXA 48 OXA 163 y NDM: Se realiza directamente desde la colonia bacteriana obteniéndose el resultado en un período de 15 minutos, con una sensibilidad y especificidad de 100% para ambas carbapenemasas. Se basa en una tecnología de membranas con nano partículas de oro coloidal.

Esta prueba está diseñada para detectar carbapenemasas en una sola colonia de aislados de enterobacterias desde una placa de agar.

Interpretación de resultados: en presencia de un resultado positivo se observa una banda rojiza en la línea de control (C) además de una banda púrpura rojiza en la posición de la línea de prueba (T). La intensidad de la línea de la prueba puede variar dependiendo de la cantidad de antígenos como también del tipo de variante de la KPC o de OXA-48 que esté presente en la muestra (según corresponda). Cualquier línea púrpura en la zona T, aunque sea débil debe ser considerada como resultado positivo.

Esquema de interpretación:



Fuente: Coris®

4. Método Modificado de Inactivación de carbapenémicos para detección de producción de Carbapenemasa en Enterobacterias, mCIM^{1,8}.

En la edición de CLSI 2017, tabla 3 D, se publica este nuevo método para detección de carbapenemasas el que se basa en la inactivación de meropenem, lo que lo diferencia de la mayor parte de los otros métodos que utilizan imipenem. Esto puede ser importante en la detección de carbapenemasas en algunas Enterobacterias como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Moraxella* spp. y *Morganella* spp., especies que pueden presentar un elevado CIM a imipenem por mecanismos distintos a la producción de carbapenemasas, pudiendo dar resultados falsos positivos o indeterminados con los otros test.

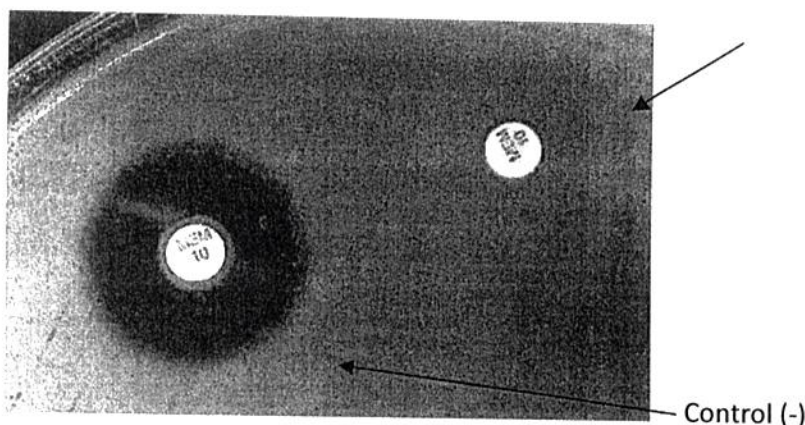
Este método está definido para ser utilizado en Enterobacterias. No requiere uso de reactivos o medios de cultivo especiales es necesario una incubación de toda la noche para leer la prueba.

Procedimiento:

1. Emulsionar la cepa en estudio con asa de 1µl, cultivo 24 horas en 2 ml de TSB.
2. Agite 10 a 15 segundos.
3. Agregue con un asa un disco 10 µg de meropenem, debe quedar inmerso en la suspensión
4. Incubar a 35°C por 4 horas.
5. Prepare cepa *E.coli* ATCC® 25922 a 0,5 MF e inocule una placa MHA con tórula. Dejar secar +- 15 min.
6. Una vez que se cumpla las 4 horas (punto4), retire con un asa el disco de meropenem del TSB de la o las cepas en estudio secando el exceso de líquido.
7. Colocar el disco en la placa ya seca, de agar Mueller Hinton sembrada.
8. Incubar 35°C toda la noche
9. Use siempre las cepas control: Control (+) *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1705 y control (-) *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1706.

Interpretación:

Control (+)



Fuente Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán / RELAVRA-OPS

Este método demostró una sensibilidad y especificidad superior al 99% para detección de carbapenemasas como: KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, y OXA. Estudios realizados en OXA- 232 en *K. pneumoniae* fueron negativos.

5.0 Detección de carbapenemasas en Medios de cultivo cromogénicos

Los métodos de screening para detectar carbapenemasas, son medios de tamizaje, permiten detectar en forma rápida muestras o cepas productoras de carbapenemasa sin embargo tienen la desventaja de la especificidad, ya que las cepas no productoras de carbapenemasas también pueden crecer al igual que las cepas de *P.aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Ante resultados de crecimiento en estos medios, el laboratorio debe incorporar pruebas de confirmación de carbapenemasas. En general no se usan para siembra primaria, pueden ser útiles para vigilancia. No son métodos confirmatorios.

5.1 CHROMID CARBA SMART (Carba/OXA 48[®]) Biomerieux:

Utiliza placas de agar que permiten identificar separadamente en las Enterobacterias, las carbapenemasas tipo KPC/MBL de OXA 48.

Es una placa de screening rápido para detección de carbapenemasas, para ser aplicado en muestras clínicas (heces o hisopados rectales). Presenta alta sensibilidad y especificidad.

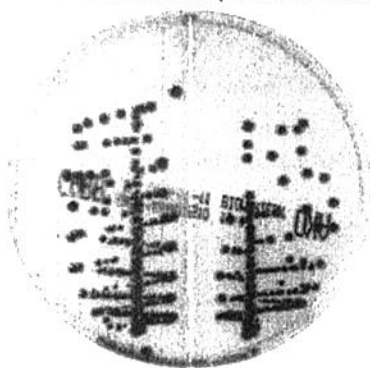
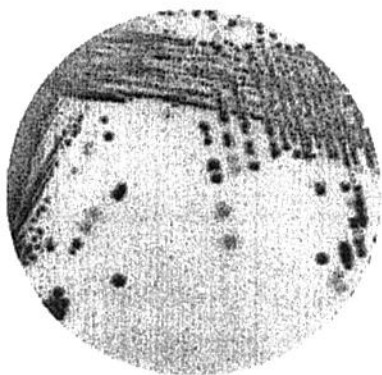


Imagen: Biomerieux[®]

5.2 CHROMagar: mSuper Carba:



Es un medio de cultivo cromogénico que permite la detección de una variedad de carbapenemasas como: KPC, NDM, VIM, IMP y OXA.

Imagen: Medica Tec®

6.0 Tabla Detección Carbapenemasas
Enterobacterias

Difusión: Imipenem ≤ 22 mm o Meropenem ≤ 22 mm CIM: Imipenem ≥ 2 μ g/ml o Meropenem ≥ 2 μ g/ml						
Carba NP	+	+	+	-	-	Oxa48:++/-
Blue Carba						Oxa163:-/+
mCIM	+	+	+	-	-	Oxa48:+
			(*)			Oxa163:-
Test de Hodge MHT	+	+	+	- / +	- / +	+
Sinergia A. Borónico	+	+	-	+	-	-
Sinergia EDTA	-	-	+	-	-	-
Cloxacilina	-	-	-	+	-	-
Tipo de β lactamasa	Sme, IMI (**)	KPC GES	MB L	AmpC +impermeabilidad (***)	CTX – M +impermeabilidad	OXA
Observación	S cefalosp. 3°g.	R cefalosp. 3°g.				S cefalosp. 3°g.
Confirmación Lab. Referencia	Si	Si	Si	No	No	Si

Fuente:
Servicio Antimicrobianos ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”/ RELAVRA-OPS. Adaptación Lab. Referencia ISP.

Abreviaturas:
mCIM: Método modificado de inactivación, **EDTA**: ácido etilendiaminotetra acético.
Notas al pie:

(*) *Proteus* spp: ++ / - Otras enterobacterias +
(**) Sme, IMI: (Sensible a Cefalosporinas de 3° generación) en *Serratia marcescens* (Sma) y *Enterobacter* spp.
(***) AmpC + impermeabilidad: *Enterobacter* y *Citrobacter*

Pseudomonas aeruginosa:

	Cepa productora de Carbapenemasa		Cepa sospechosa de Carbapenemasa	
Imipenem (mm)	6	6 - >6	>6	>6
Carba NP Blue Carba	+	+	-	GES + OXA +/-
Aztreonam (mm)	6	>10	>6	>6
EDTA	-	+	-	- (o Meropenem / EDTA)
Test de Hodge THT / <i>P. aeruginosa</i> (*)	+	+	-	+
Tipo de β lactamasa	KPC	MBL	No Carbapenemasa	Carbapenemasa OXA / GES
Sinergia Meropenem / Ac. Borónico	++/-	-	+ - AmpC No Carba	- +
Remitir a Lab. Referencia	Si	Según criterio hospital	No No	Si Si

Fuente: Servicio Antimicrobianos ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”/ RELAVRA-OPS. Adaptación Lab. Referencia ISP.

(*) THT/ PAE-MHT: Test Hodge Triton modificado para *P. aeruginosa*.

7.0 Pruebas fenotípicas para estudio de otras beta lactamasas:

En el estudio de carbapenemasa es importante que el laboratorio realice la detección de otras beta lactamasasa como Beta lactamasa de espectro extendido (BLEE) y cuando sea necesario la determinación de beta lactamasa tipo AmpC, ya que una sobre expresión de estas enzimas, puede producir resistencia a alguno de los antibióticos carbapenémicos y no significa necesariamente que se esté ante la presencia de una carbapenemasa. El estudio de BLEE es un aporte para el estudio de carbapenemasas, principalmente cuando la resistencia es por una serin carbapenemasa como lo es la KPC, las que por definición son BLEE positiva.

7.1 Detección de BLEE:

Se utilizan los criterios definidos para estudio de BLEE en Enterobacterias por un documento CLSI vigente, tabla 3 A¹. Se realiza la confirmación con el uso de cefalosporinas de tercera generación y con los discos que contienen las combinaciones de la cefalosporinas con ácido clavulánico. Pueden ser también detectadas, probando discos de cefalosporinas de tercera generación con el disco amoxicilina/ácido clavulánico, en una distancia de +- 20 mm entre los discos y observando la presencia de sinergia. Ante resultados positivos, interpretar todas las penicilinas, cefalosporinas de 1°, 2°, 3° y 4° generación además de aztreonam, como resistentes. En los casos de obtener resultados BLEE negativos, interpretar los resultados del antibiograma de acuerdos a los puntos de cortes CLSI vigentes.

En la lámina se observa la prueba de detección de BLEE observando la sinergia y la confirmatoria.

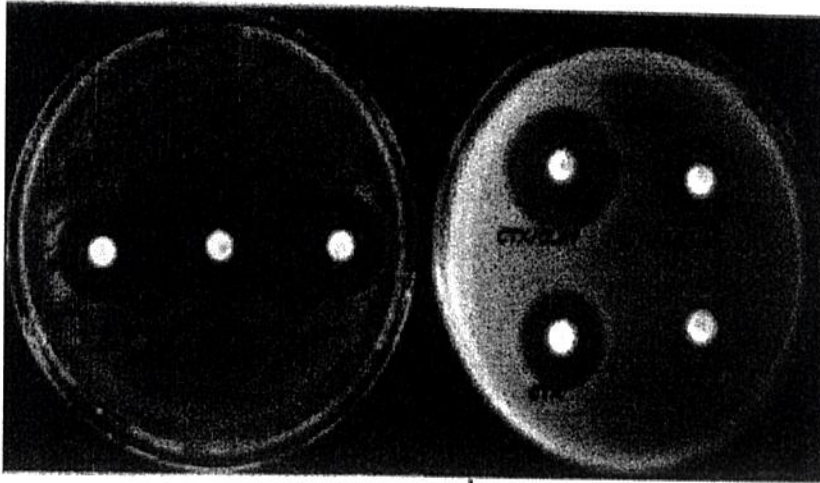


Imagen: Laboratorio Referencia ISP.

7.2 Detección de AmpC:

Es importante diferenciar si la resistencia observada en las cefalosporinas de tercera generación es por la presencia de BLEE o por una a cefalosporinas, en el caso Amp C, cuando se encuentra desreprimida, que en esos casos podría alcanzar resistencia a cefalosporinas 3°, 4° generación. La detección de AmpC no modifica la interpretación de las cefalosporinas, su interpretación se realiza de acuerdo a las tablas CLSI según los halos de inhibición obtenidos, sin embargo en el caso de BLEE si debería modificarse la interpretación.

El estudio se puede realizar usando discos de cloxacilina 300 µg o de ácido borónico entre discos de cefalosporinas de 3° generación separados de 1,5 mm de distancia y observando la presencia de sinergia², también puede ser colocando un disco de cefoxitin al lado de un inductor de AmpC como por ejemplo ceftazidima observando achatamiento del halo, otra alternativa es usar pastillas comerciales que incluye detección de BLEE y AmpC.

La cloxacilina es un inhibidor específico de AmpC por lo tanto es una prueba diferencial útil ante resultados positivos en las pruebas de detección de carbapenemasas como el test de Hodge y/o en la prueba de ácido borónico, ambos test pueden dar positivo en forma inespecífica cuando está presente la enzima AmpC, esto se observa frecuentemente en las especies que presentan AmpC inducible: *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.

En la figura se puede apreciar el achatamiento entre discos de ceftazidima e imipenem y de imipenem y cefoxitin, ante la presencia de AmpC.

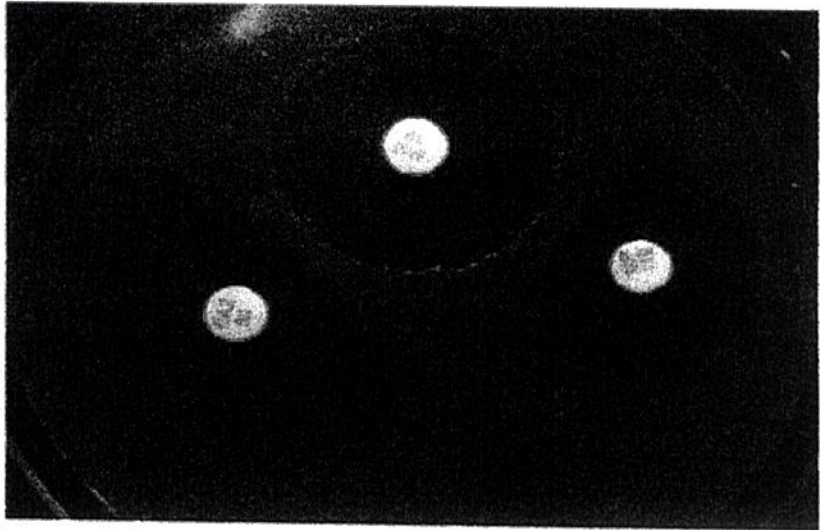


Imagen: Laboratorio Referencia ISP

8.0. Control de Calidad Interno.

El control de calidad del Método de Susceptibilidad por Difusión o por CIM se debe realizar periódicamente utilizando las cepas ATCC® e interpretar de acuerdo a las tablas CLSI vigentes¹.

El control de calidad interno del método de susceptibilidad permite verificar todas las variables que pueden afectar en la obtención de resultados confiables incluyendo la competencia del personal, permitiendo la detección de los errores.

Las cepas que permiten el control de calidad de los antibióticos carbapenémicos para uso en Enterobacterias es *Escherichia coli* ATCC® 25922, y para *Pseudomonas aeruginosa* se debe utilizar *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

Rangos Control de Calidad, CLSI 2017.

Antimicrobiano	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	
	Difusión mm	CIM µg/mL
Imipenem 10 µg	26-32	0,06-0,25
Meropenem 10 µg	28-35	0,008-0,06
Ertapenem 10 µg	29-36	0,004-0,015

Rangos Control de Calidad, CLSI 2017.

Antimicrobiano	<i>P. aeruginosa</i> ® 27853	
	Difusión mm	CIM µg/mL
Imipenem	20-28	1-4
Meropenem	27-33	0,12- 1

9. Control de Calidad Externo

Los laboratorios locales deben estar adscritos a un programa de evaluación externa de la calidad como el PEEC del ISP.

10. Condiciones de Bioseguridad

Durante la obtención y procesamientos de las muestras, al igual que para otros exámenes de fluidos corporales, se debe guardar las precauciones contenidas en el Manual de Bioseguridad del laboratorio y seguir las buenas prácticas microbiológicas que permita proteger al paciente, operador y al medio ambiente⁷.

Las Enterobacterias y Bacilos No Fermentadores están clasificados en el grupo de riesgo 2 de acuerdo a la clasificación Internacional de Riesgo, por lo que corresponde aplicar medidas de contención de nivel 2.

11. Envío de cepas al ISP y confirmación de resistencia:

De acuerdo a las disposiciones vigentes ORD. N° 01156 del 14-07-2017 “Recomendaciones para inclusión de pruebas de Screening para carbapenemasas en Enterobacterias”¹⁰, los laboratorios deberán enviar para confirmación, las cepas de Enterobacterias que presenten un resultado positivo en cualquiera de los test fenotípicos definidos para detección de carbapenemasas, independiente de los resultados de susceptibilidad obtenidos a imipenem y/o meropenem.

Se debe utilizar el formulario B3, de envío de cepas del Instituto de Salud Pública de Chile a Sección Bacteriología, dispuesto en página web (www.ispch.cl). En el formulario debe indicar el test fenotípico utilizado con su resultado. El nombre de la prestación es “Carbapenemasas en

Enterobacterias Vigilancia”, código 2127046. Es importante señalar que sólo se debe enviar una cepa por paciente.

El laboratorio referencia de Agentes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud de la Sección Bacteriología, realizará la confirmación de la resistencia reportada por el nivel local, a través de:

- Confirmación de susceptibilidad a carbapenémicos.
- Test fenotípicos para detección de carbapenemasas.
- Estudio molecular por PCR, reacción en cadena de la polimerasa, a las cepas que den resultados fenotípicos positivos.
- Determinación de genes:
 - Serin carbapenemasas: blaKPC, blaGES, blaSme, blaNMC
 - Metallo Beta Lactamasas: blaIMP, blaVIM, blaNDM, blaSPM
 - Carbapenemasas tipo OXA: bla OXA: 23, 51, 24, 48, 181 y 370.
- Estudio genético en el subdepartamento de Genética Molecular, a las cepas en las que se identifique molecularmente la presencia de carbapenemasa, donde se les realiza:
 - Determinación del tipo blaKPC por amplificación y secuenciación.
 - Subtipificación genética, por electroforesis de campo pulsado (PFGE), para determinar relación clonal entre las cepas y en casos de cepas notificadas como brote de IAAS.
 - Determinación de linaje genético por Secuenciación de Multilocus (MLST), según protocolo y base de datos internacional.

Una vez que el laboratorio de referencia confirma una cepa como carbapenemasa positiva, es informada al laboratorio de origen vía telefónica y por correo electrónico.

Información de la vigilancia de carbapenemasas en Enterobacterias, es enviada mensualmente al departamento de calidad del MINSAL y se encuentra disponible en la página web del ISP: www.ispch.cl, tanto en boletines con información consolidada como en el link interactivo de IAAS.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. M100-S27. 2017.
2. Servicio Antimicrobianos INEI/ANLIS Dr. C. Malbrán/RELAVRA-OPS: Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS-Dr. Carlos Malbrán y Red Latinoamericano de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA-OPS).
3. Test de Hodge Modificado: Protocolo Servicio Antimicrobianos, INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán. Adaptación F. Pasterán y cols. Journal clinical microbiology. 2016 Mar; 54 (3): 640-9.
4. Nordmann P. and cols. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin. Microbiol Infect 2012; 18: 432-438.
5. J. Pires and cols. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J. Clinical Microbiol. 2013; 51: 4281-4283.
6. Daniele Meunier and cols. Evaluation of the K-Set RESIST immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48 like carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published April 26, 2016.
7. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC, 5° Ed. 2007.
8. Tijet N, Patel SNMelano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. J. Antimicrob. Chemother. 2016; 71 (1):274-276.

9. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3773-3776.
10. Circulares:
- Circular N° 11 del 12 Mayo 2012. Norma Técnica sobre prevención y control de infecciones: vigilancia nacional de resistencia a los antimicrobianos en bacterias que pueden producir infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).
 - Circular N° 1 del 25 Enero 2013. Instrucciones para la vigilancia nacional de la resistencia a los antimicrobianos de importancia epidemiológica en bacterias que pueden producir Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS).
 - Norma Técnica N° 00175 del 7 Agosto 2015. Exento N° 329. Vigilancia nacional de la resistencia a los antimicrobianos en agentes que pueden producir IAAS.
11. Ordinarios:
- Ordinario C/N° 160 del 28 Enero 2014. Recomendaciones para inclusión de pruebas de Screening para carbapenemasas en *Klebsiella* spp.
 - Ordinario C/N° 227 del 9 Febrero 2016. Recomendaciones screening para carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Ordinario N° 01156 del 14 Julio 2017. Recomendaciones para inclusión de pruebas de Screening para carbapenemasas en Enterobacterias.

V. AUTORES

TM M. Soledad Prat Miranda.

Encargada Laboratorio IAAS.

Sección Bacteriología.

Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

VI. REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

BQ. Pamela Araya Rodríguez

Jefe Sección Bacteriología.

Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

Dr. Juan Carlos Hormazábal

Jefe Subdepartamento Enfermedades Infecciosas

Departamento de Laboratorio Biomédico

Instituto de Salud Pública de Chile

Dra. Verónica Ramírez

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

VII. REVISORES EXTERNOS *incluir nombre completo, profesión especialidad, cargo e institución.*

Dra. Paola Pidal

Laboratorio Microbiología

Clínica Indisa.

Dr. Francisco Silva Jefe Unidad de Microbiología

Servicio de Laboratorio Clínico

Hospital Clínico Universidad de Chile

Dra. Francisca Valdivieso R.
DT Laboratorio Microbiología
Hospital Luis Calvo Mackenna

**ANÓTESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE EN EXTRACTO EN EL DIARIO OFICIAL Y EL TEXTO
COMPLETO EN LA PÁGINA WEB INSTITUCIONAL www.ispch.cl**






Transcrito Fielmente
Ministro de FÉ

29/03/2018
ID N° 382823
Resol.A1/N°326

Distribución:

- Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia;
- Unidad de Comunicaciones e Imagen Institucional. ✓
- Asesoría Jurídica.
- Oficina de Partes.

Avda. Marathon N° 1000, Ñuñoa - Casilla 48 - Fono 5755100 - Fax 56-2-5755

