

PROTOCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS
RESISTENTES (RedLabRA)

**Detección fenotípica de enterobacterias productoras de
carbapenemasas y pruebas de hidrólisis antibiótica (carbapenémico)
e inmunocromatográficas**

Aprobado por:	Código:	RedLabRa-I-003
Fecha: 15/02/2021 Firma:	Ed.:	01
	Fecha edición:	15/02/2021

OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo describe la metodología para la **detección fenotípica** de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CBPs) con combinación de discos con inhibidores, E-test (para metalo- β -lactamasas) y ensayos colorimétricos.

Además, se incluye la descripción de pruebas de detección de hidrólisis de antibiótico carbapenémico por espectrofotometría de masas y ensayos de inmunocromatografía lateral para la captura inmunológica de epítomos de las diferentes carbapenemasas.

Este protocolo es aplicable a cepas aisladas procedentes de muestras clínicas de la familia *Enterobacteriaceae* que presenten un patrón fenotípico compatible con la producción de carbapenemasas (sensibilidad disminuida a antibióticos carbapenémicos).

Los principales documentos que se han utilizado para la elaboración de este protocolo son:

- Procedimiento DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS AA-PT-016 del Laboratorio de Referencia de Resistencia a Antibióticos.
- *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.01, July 2017* (1).
- Procedimiento nº 38 en Microbiología Clínica de la SEIMC: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos (2).

1. Cribado fenotípico de la producción de carbapenemasas: puntos de corte

El antibiótico **meropenem** ofrece los mejores valores de sensibilidad y especificidad para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. Ertapenem es el carbapenémico más sensible, pero tiene baja especificidad, especialmente en especies como *Enterobacter* spp., debido a la presencia combinada de beta-lactamasas de espectro ampliado (BLEEs) y beta-lactamasas AmpC con pérdida de porinas (3-6). En la **Tabla 1** se muestran los puntos de corte apropiados para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

Tabla 1. Puntos de corte clínicos y puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) para la detección de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas (según metodología EUCAST).

Carbapenémico	CMI (mg/L)		Difusión en disco, zona de inhibición (mm) con discos 10 µg	
	Puntos de corte clínicos (S/I)	Puntos de corte epidemiológicos (ECOFF)	Puntos de corte clínicos (S/I)	Puntos de corte epidemiológicos (ECOFF)
Meropenem¹	≤ 2	> 0,125	≥ 22	< 25 ²
Ertapenem³	≤ 0.5	> 0,125	≥ 25	< 25

¹Mejor balance sensibilidad y especificidad.

²25-27 mm si además son resistentes a piperacilina-tazobactam y/o temocilina (la temocilina contribuye a una mayor especificidad).

³Alta sensibilidad, pero baja especificidad. Se puede utilizar como antibiótico alternativo de cribado, pero cepas productoras de BLEE y AmpC pueden ser resistentes sin tener carbapenemasas.

2. Detección mediante combinación de discos con inhibidores.

Este método está disponible comercialmente por diferentes fabricantes (MAST, Reino Unido; Rosco, Dinamarca) o también puede hacerse mediante la adición de inhibidores a discos de carbapenémicos (7-9). El ácido borónico inhibe carbapenemasas de clase A (aunque los datos de otras carbapenemasas de clase A diferentes a la KPC son escasos), y el ácido dipicolínico y el etilendiaminotetracético (EDTA) inhiben carbapenemasas de clase B. La cloxacilina, que inhibe las beta-lactamasas AmpC, se añade a los tests para diferenciar entre hiperproducción de AmpC más pérdida de porinas y producción de carbapenemasas (1). La mayor desventaja de estos métodos es que hay que esperar unas 18h (periodo de incubación de las placas) para obtener resultados.

2.1. Preparación manual de discos con inhibidor:

- Cloxacilina; solución 30µg/µl: se añade 20µl por disco, con el fin de que cada disco reciba 600µg
- Ácido fenil borónico; solución 20µg/µl: se añade 20µl por disco, con el fin de que cada disco reciba 400µg
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA); solución 37,2µg/µl: se añade 20µl por disco, con el fin de que cada disco reciba 745µg

Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión en disco e inocular una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. Colocar discos de ertapenem, ertapenem+ácido fenil borónico, ertapenem+EDTA y ertapenem+cloxacilina. También pueden utilizarse discos de imipenem o meropenem con las mismas combinaciones de inhibidores. Incubar a 35 ± 2°C durante 18 horas.

Interpretación de resultados:

Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición (incluyendo el diámetro del disco) con un pie de rey. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Positivo.** Incremento ≥ 5 mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto a la del carbapenémico sólo. Los resultados positivos se interpretan según la Tabla 2.
- Negativo.** No diferencia o incremento < 5 mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al halo del carbapenémico sólo.

Tabla 2. Interpretación resultados discos con inhibidores (preparación manual).

Resultado	Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia
CAR+BOR \geq 5mm CAR y CAR+CLOX < 5mm CAR ¹	Carbapenemasa de Clase A
CAR+EDTA \geq 5mm CAR	Carbapenemasa de Clase B
CAR+BOR y CAR+CLOX \geq 5mm CAR	Hiperproducción de AmpC o Hiperproducción de AmpC + Carbapenemasa de Clase A

¹CAR, carbapenémico; BOR, ácido fenil borónico; CLOX, cloxacilina. La ausencia de inhibición con cloxacilina descarta la hiperproducción de beta-lactamasas AmpC.

Para los diferentes proveedores comerciales, seguir las instrucciones del fabricante. Como ejemplo, la preparación es igual para los discos (tabletas) con inhibidores de Rosco Diagnóstica®, excepto que esta casa comercial utiliza ácido dipicolínico en lugar de EDTA y los discos ya vienen preparados luego no hay que añadir los inhibidores.

No hay inhibidores para la enzima OXA-48-like. Se ha propuesto el alto nivel de resistencia a la temolicina (CMI >128 mg/L) como un posible marcador fenotípico para la detección de OXA-48-like (1). Sin embargo, este marcador no es específico de carbapenemasas tipo OXA-48, pues otros mecanismos de resistencia pueden conferir este fenotipo. La **Tabla 3** muestra la interpretación conjunta de las diferentes pruebas fenotípicas de combinación de discos descritas hasta ahora para la detección de carbapenemasas según recomendaciones de EUCAST (1).

Tabla 3. Interpretación de los tests fenotípicos (tipos de carbapenemasas en negrita) por métodos de difusión en disco o tabletas. Las definiciones exactas de sinergia vienen dadas por cada fabricante en los métodos comerciales (1).

β -lactamasa	Sinergia observada como aumento del halo de inhibición (mm) con 10 μ g meropenem disco/tableta				Temolicina CMI > 128 mg/L o zona inhibición <11 mm
	DPA/EDTA	BOR	DPA+BOR	CLOX	
MBL	+	-	-	-	Variable ¹
KPC	-	+	-	-	Variable ¹
MBL + KPC²	Variable	Variable	+	-	Variable ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Sí
AmpC + pérdida porinas	-	+	-	+	Variable ¹
BLEE + pérdida porinas	-	-	-	-	No

Abreviaciones: MBL= metalo- β -lactamasa, KPC= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, DPA= ácido dipicolínico, EDTA= ácido etilendiaminotetracético, BOR= ácido fenil borónico, CLOX=cloxacilina.

¹El test de sensibilidad a temolicina solo se recomienda en casos en los que no se detecta sinergia en los discos con inhibidores, para diferenciar entre BLEE + pérdida de porinas y enzimas OXA-48-like (1, 10, 11). Cuando otras enzimas están presentes la sensibilidad es variable y en este caso, no ofrece información sobre qué beta-lactamasa está presente.

²Hay un estudio sobre el uso comercial de tabletas con inhibidores dobles (DPA o EDTA + BOR), pero no hay estudios multi-centrícos o estudios de un único centro. Esta combinación confiere resistencia de alto nivel a carbapenémicos. (1).

La combinación de los estudios de inhibición con el uso del test de Hogde modificado puede aportar información valiosa sobre todo en la detección de OXA-48. No obstante, el test de Hodge modificado puede ser difícil de interpretar y su especificidad es baja, siendo incluso su sensibilidad baja en algunos casos, por ello siempre ha de combinarse con otras técnicas.

2.2. Test de Hodge modificado (THM):

Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión en disco e inocular una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland diluida al 1:10.

Colocar un disco con un carbapenémico (imipenem, meropenem o ertapenem) en el centro de la placa.

Inocular 3-5 colonias de la cepa problema formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 horas.

Interpretación de resultados:

Examinar visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría (**Figura 1**). Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Positivo.** Presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido de al crecimiento de la cepa indicadora.
- Negativo.** Ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría.
- No interpretable.** Inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría.



Figura 1. Test de Hodge modificado donde se observan dos cepas positivas y una negativa. *Fuente:* Procedimiento nº 38 de la SEIMC: Detección fenotípica de carbapenemasas, PNT-MRN-03 (2).

Consideraciones:

Se pueden estudiar hasta cuatro o cinco cepas por placa. En las cepas que presenten un fenotipo de hiperproducción de AmpC utilizar discos de carbapenémicos con cloxacilina, puesto que las enzimas AmpC presentan cierta actividad hidrolítica sobre carbapenémicos que puede dar lugar a falsos positivos.

La **Tabla 4** muestra la interpretación conjunta de los discos combinados con inhibidores y el test de Hodge modificado.

Tabla 4. Interpretación de los tests fenotípicos (tipos de carbapenemasas en negrita) por métodos de difusión en disco o tableta y el test de Hodge modificado (THM).

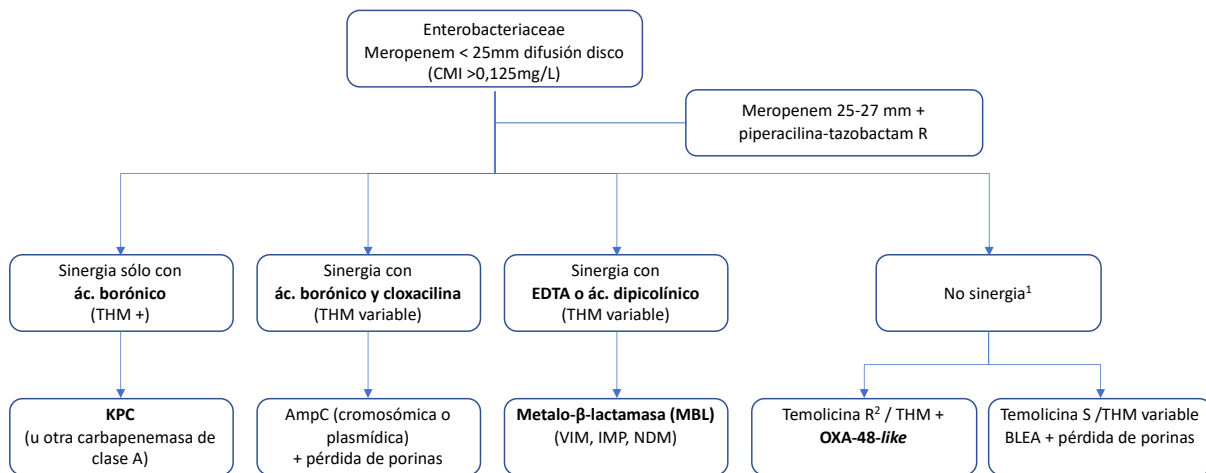
Mecanismo de resistencia	Sinergia observada como aumento del halo de inhibición (mm)			THM
	Ertapenem + EDTA	Ertapenem + BOR	Ertapenem + CLOX	
Clase A (KPC)	-	+	-	+
Clase B (VIM, IMP, NDM)	+	-	-	+/-
Clase D (OXA-48-like)¹	-	-	-	+
AmpC + reducción permeabilidad	-	+	+	+/-

BLEE + reducción permeabilidad	-	-	-	+/-
--------------------------------	---	---	---	-----

¹La resistencia a piperacilina/tazobactam pueden ayudar a diferenciar la producción de OXA-48 (ambas positivas) de la producción de BLEE más pérdida de porinas (generalmente ambas negativas, aunque puede haber cepas productoras de BLEE que pueden ser resistentes a piperacilina/tazobactam por la producción de otros mecanismos como OXA-1).

La **Figura 2** muestra un algoritmo resumen para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas teniendo en cuenta las diferentes pruebas fenotípicas descritas anteriormente (cribado inicial, combinación de discos con inhibidores, sensibilidad a temolicina y test de Hodge modificado).

Figura 2. Algoritmo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Adaptado de EUCAST (1) y del procedimiento nº 38 de la SEIMC (2).



¹La combinación de varias carbapenemasas puede dar lugar a la no sinergia – ej. producción conjunta de MBL y KPC. La caracterización molecular es necesaria en estos casos.

²Alto nivel de resistencia a temolicina (>128 mg/L, diámetro de inhibición < 11mm) es un marcador fenotípico de OXA-48.

3. E-test para detección de Metalo β -Lactamasas (MBL).

Detección de MBL con tiras de ETEST® MBL (Biomérieux) (MBL IP/IPI y MBL MP/MPI), comparamos CMI a un carbapenémico solo y con la adición de EDTA. ETEST® MBL IP/IPI se utiliza principalmente para detectar MBLs en *Pseudomonas* spp. y mayoría de *Acinetobacter* spp.. ETEST® MBL MP/MPI está diseñado para detectar MBLs en Enterobacteriaceae.

Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión en disco e inocular una placa de agar Müller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland. Dejar absorber el inóculo y asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras de E-test MBL. Aplicar la tira de E-test MBL sobre el agar con unas pinzas. Incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 horas.

Consideraciones:

Asegurarse que la tira contacta completamente con la superficie del agar. En caso de que se formen burbujas de aire bajo la tira, eliminarlas presionando ligeramente con las pinzas.

Debido a que la difusión del antibiótico es inmediata, las tiras no se pueden recolocar una vez han estado en contacto con la superficie del agar.

Leer los valores de CMI de imipenem (IP) e imipenem más EDTA (IPI) en la escala de la tira en los puntos de intersección de las elipses de inhibición del crecimiento (**Figura 3**). Los resultados se interpretan según la **Tabla 5**. Realizar el mismo procedimiento para las tiras de meropenem (MP) y meropenem más EDTA (MPI).



Figura 3. Prueba de Etest positiva en el caso de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la beta-lactamasa VIM-2. Se observa zona "fantasma" en el centro. Fuente: Procedimiento nº 38 de la SEIMC: Detección fenotípica de carbapenemasas, PNT-MRN-03 (3).

Tabla 5. Interpretación de resultados del E-test MBL.

Resultado	Observación
Positivo	El valor de la ratio de CMI Imipenem/CMI Imipenem+EDTA ≥ 8 o ≥ 3 diluciones dobles. Presencia de una zona "fantasma" entre las dos secciones de gradientes o deformación de la elipse de Imipenem independientemente de la ratio.
Negativo	El valor de la ratio de CMI Imipenem/CMI Imipenem+EDTA < 8 o < 3 diluciones dobles. Ausencia de zona fantasma entre los dos gradientes o de deformación de la elipse de Imipenem
No interpretable	Valores de CMI de Imipenem $< 4\text{mg/L}$ o Imipenem+EDTA $> 64\text{mg/L}$

Limitaciones de los métodos previamente expuestos:

- El principal inconveniente del test de Hodge modificado es su baja especificidad, ya que también puede resultar positivo en cepas con hiperproducción de β -lactamasas (AmpC) o producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) CTX-M, junto con alteraciones en las porinas. Si bien las β -lactamasas AmpC pueden ser inhibidas con la adición de cloxacilina al medio de cultivo o a los discos, en zonas con elevada prevalencia de BLEE de tipo CTX-M los resultados positivos deben ser confirmados con otros métodos genotípicos mediante PCR específica y secuenciación.
- Los métodos basados en la utilización de ácido borónico pueden presentar baja especificidad y pueden producirse resultados falsos positivos debido a la hiperproducción de enzimas de tipo AmpC ya que también es un inhibidor de estas enzimas.
- El E-test MBL presenta baja sensibilidad en *Enterobacteriaceae* productores de carbapenemasas con bajas CMI de imipenem (≤ 4 $\mu\text{g/mL}$).

4. Pruebas bioquímicas colorimétricas.

El **test CarbaNP** es un test rápido (< 2h) para la detección de la hidrólisis de carbapenémicos, por un cambio de pH que hace virar del color de rojo al amarillo en una solución de rojo fenol (1, 12, 13). Esta prueba se ha validado para colonias bacterianas crecidas en Mueller-Hinton, agar sangre y agar tripsicasa de soja, pero no en Drigalski ni McConkey. Varios estudios han informado de una buena sensibilidad y especificidad (14), pero también se han observado problemas de sensibilidad en cepas mucosas y algunas Enterobacterias productoras de OXA-48 (15). Se ha observado un 3-5% de resultados no interpretables (cambio de color dudoso) en la versión comercial del test CarbaNP.

Un derivado del test CarbaNP, es el test rápido **Azul-Carba** (< 2h) (16, 17), basado en la hidrólisis del imipenem por colonias bacterianas (inoculación directa) y cambio en el pH utilizando como indicador el azul de bromotimol (azul a verde/amarillo o de verde a amarillo). El estudio de Pasteran et al. (18) observó una excelente sensibilidad para carbapenemasas de clase A y B, pero una sensibilidad baja para la detección de enzimas OXA-48.

Un tercer test bioquímico rápido (< 2h), es el **β CARBA test™**, mediante la adición de 1-3 colonias a los reactivos. La lectura debe hacerse en un máximo de 30 minutos de incubación. Un resultado positivo viene indicado por cambio en el color de amarillo a naranja, rojo o morado. Hay discrepancias en cuanto a su sensibilidad y especificidad, algunos estudios han informado de excelentes resultados para la detección de OXA-48, aunque en este caso puede requerir de un mayor periodo de incubación, mientras que la habilidad para detectar carbapenemasas de clase A debe ser verificada por la observación de falsos positivos (17-19).

5. Método de inactivación por un carbapenémico (CIM-test).

Este método consiste en la detección de hidrólisis enzimática al incubar un antibiótico carbapenémico con una suspensión bacteriana, utilizando discos antibióticos como sustrato. Después de 2h de incubación de una suspensión bacteriana (asa de siembre llena) con un disco de meropenem, el disco se coloca en una placa de agar inoculada con *Escherichia coli* ATCC 25922. La presencia de una carbapenemasa habrá hidrolizado el carbapenémico del disco y por tanto evitará la formación de halo de inhibición, aunque la cepa de *E. coli* usada es sensible al meropenem. La falta de actividad de la carbapenemasa dará lugar a un halo de inhibición, pues el meropenem presente en el disco no habrá sido hidrolizado. Su efectividad es variable (20-22), y al igual que el método de combinación de discos e inhibidores requiere de 18h de incubación.

6. Detección de hidrólisis de carbapenémico por MALDI-TOF.

La detección por espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) consiste en la disminución o desaparición de picos específicos de carbapenémicos en un espectro de masas de una suspensión bacteriana previamente incubada con un carbapenémico (23, 24). Este método ha mostrado buena sensibilidad y especificidad, excepto para el grupo de enzimas OXA-48, cuya detección podría mejorarse (sensibilidad 98%) con la adición de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) (25). Se ha publicado que la

adición de bicarbonatos al medio de cultivo puede favorecer el crecimiento de bacterias productoras de carbapenemasas tipo OXA-48, debido a una mejor acción amortiguadora del medio o a una reacción mixta resultado de una eficiente re-carboxilación del residuo Lys del sitio activo de la enzima. Las bacterias patógenas al invadir a nuestro organismo suelen estar rodeadas por un ambiente rico en bicarbonatos y dióxido de carbono. Estas sustancias pueden influir su actividad metabólica, incluyendo la expresión de mecanismos de resistencia (26).

7. Ensayos de inmunocromatografía lateral.

Estos métodos están basados en la captura inmunológica de epítomos de las diferentes carbapenemasas, utilizando nanopartículas de oro coloidales unidas a una membrana de nitrocelulosa dentro de un aparato con flujo lateral (1). Son tests rápidos que pueden realizarse directamente en muestras clínicas. Un estudio reciente ha mostrado una alta especificidad (100%) para la detección de NDM, OXA-48 y KPC, con una sensibilidad del 96% (27).

8. Utilización de controles: cepas de referencia.

Las cepas patrón o de referencia, se usan para comprobar que los valores de sensibilidad obtenidos mediante los diferentes métodos de determinación son los correctos. A continuación, se muestra una lista de las cepas utilizadas en el Laboratorio de Referencia de Resistencia a Antibióticos (LRRRA), así como aquellas cepas recomendadas por EUCAST (2).

Cepa	Mecanismo	Fuente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Para el THM	LRRRA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Control negativo	LRRRA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATB_002	Metalo- β -lactamasa (VIM-1)	LRRRA
<i>K. pneumoniae</i> ATB_003	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (KPC-2)	LRRRA
<i>K. pneumoniae</i> ATB_004	Carbapenemasa OXA-48	LRRRA
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC combinada con expresión reducida de porinas	EUCAST
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58547 o <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	Metalo- β -lactamasa (VIM)	EUCAST
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	Metalo- β -lactamasa (NDM-1)	EUCAST
<i>E. coli</i> NCTC 13476	Metalo- β -lactamasa (IMP)	EUCAST
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 56233 or <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	EUCAST
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	Carbapenemasa OXA-48	EUCAST
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	Control negativo	EUCAST

RECURSOS MATERIALES para el método de discos combinados con inhibidores

EQUIPOS

- Frigorífico (2-8°C)
- Congelador de -20°C
- Estufa de incubación atmósfera aeróbica (37 ± 2°C)
- Agitadores "vortex":
- Pipetas de 200 µl, 1000 µl
- Mecheros bunsen de gas
- Pie de rey con resolución de 1 mm
- Tubos de vidrio estériles
- Asas de plástico estériles para siembra
- Escobillones estériles
- Pinzas de acero inoxidable con o sin dientes para sujetar
- Viales y tubos Bijoux de vidrio estériles
- Gradillas para tubos

REACTIVOS

- Reactivos para la preparación de discos con inhibidor:
 - Cloxacilina
 - Ácido fenil-borónico
 - Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)
 - Agua desionizada estéril.
 - Dimetilsulfóxido (DMSO, CH₃SOCH₃)
- Tubos con solución de PBS salina estéril
- Agar Mueller-Hinton en placas.
- Discos:

• Ertapenem (10 µg)	• Imipenem (10 µg)	• Meropenem (10 µg)
• Ertapenem -ácido fenil-borónico (10/400 µg)	• Imipenem-ácido fenil-borónico (10/400 µg)	• Meropenem-ácido fenil-borónico (10/400 µg)
• Ertapenem -cloxacilina (10/600 µg)	• Imipenem -cloxacilina (10/600 µg)	• Meropenem-cloxacilina (10/600 µg)
• Ertapenem -EDTA (10/745 µg)	• Imipenem -EDTA (10/745 µg)	• Meropenem-EDTA (10/745 µg)
- Tabletas de antibiótico.
 - Meropenem (10 µg)
 - Meropenem (10 µg) + ácido dipicolínico
 - Meropenem (10 µg) + ácido fenil-borónico
 - Meropenem (10 µg) + cloxacilina
- Dispensadores de discos de antibióticos.
- Estándar de turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

Bibliografía

1. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.01, July 2017
2. Procedimiento nº 38 en Microbiología Clínica de la SEIMC: Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos; PNT-MRN-03. Detección fenotípica de carbapenemasas
3. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432-8.
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
5. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:168-72
6. Tato M, Coque TM, Ru.z-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-8.
7. Vading M, Samuelsen ., Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest. and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:668-74.
8. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen ., Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:552-6.
9. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3877-80.
10. 23. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenylboronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2013.
11. 24. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E230-2.
12. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1503-7.
13. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6437-40.
14. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3097-101.
15. 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.
16. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3060-3.
17. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol.* 201 Feb;55(2):510-518.
18. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015 ;53(6):1996-8.
19. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β -Carba Test. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065-3068.
20. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690.
21. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2016;128:48-51.
22. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(1):274-6.

23. Hrabák J, Studentov. V, Walkov. R, Zemlickov. H, Jakubu V et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3.
24. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:2163-71.
25. Papagiannitsis CC, Študentov. V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH₄HCO₃, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1731.
26. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, Pfeifer Y, Chudackova E, Bergerova T, et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiologica.* 2015; 60 119–129.
27. Fauconnier C, Dodemontc M, Depouhon A, Anantharajah A, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H, Lateral flow immunochromatographic assay for rapid screening of faecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2019;74(2):357–359.