

Desempeño de un sistema de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de distintas variantes de carbapenemasas de KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48-like.

E. Albornoz, M. Rapoport, B. Sanz, A. Menocal, J. M de Mendieta, F. Pasteran, A. Corso., D. Faccone

Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos (LNRRA) INEI-ANLIS "Dr. C. Malbrán", CABA

Introducción: El aumento de la prevalencia de bacilos gram-negativos (BGN) con resistencia extrema a los antimicrobianos, y en particular los productores de carbapenemasas (CBPs), es un desafío para los sistemas de salud. A partir de la aprobación de nuevas combinaciones de antimicrobianos con inhibidores de CBP para uso terapéutico, cobra vital importancia la identificación del tipo de CBP presente en los BGN.

Objetivo: Evaluar el desempeño de una PCR tiempo real (qPCR) multiplex para la detección de CBPs, basado en el análisis de las curvas de melting de los productos de amplificación, frente a un panel de diversas variantes de CBPs.

M&M: Se estudiaron 86 BGN: 77 productores de CBP (61 con 1 CBP, 14 con 2 CBP y 2 con 3 CBPs) y 9 no productores de CBP. Los aislamientos fueron previamente caracterizados por PCR/secuenciación de Sanger/Illumina, y pertenecen al repositorio del LNRRA y al CDC AR-Bank. Se evaluaron 27 variantes de CBPs presentes en 13 especies de BGN (Tabla). La extracción de ADN se realizó por la técnica de boiling. Para la reacción qPCR se utilizó la mezcla MeltDoctor®HRM (Applied Biosystems) en un volumen final de 20uL. Se utilizaron los siguientes primers (concentración) definidos por Monteiro J. et. al. (doi:10.1093/jac/dkr563) para amplificar *blaKPC* (0,2mM), *blaNDM* (0,4mM) y *blaOXA-48-like* (0,2mM). Además, se diseñaron los primers VIM-RT-F AGTGGTGAGTATCCGACAG, y VIM-RT-R ATGAAAGTGCCTGGAGAC, para *blaVIM* (0,2mM); IMP-RT-F GAGTGGCTTAATTCTCRATC, e IMP-RT-R GGYARCCAAACCACTASGTTATCT para *blaIMP* (0,6mM). Se utilizó el equipo AriaMX System (Agilent), la curva de melting se realizó con una resolución de 0,2°C/5 segundos.

Resultados: Los aislamientos rindieron amplificación positiva entre los ciclos 12,44 y 24,4, y se definió un Ct máximo de 25 ciclos para considerar amplificación positiva. Para cada gen y todas las variantes ensayadas se obtuvo un rango de temperatura de melting ($T^{\circ}m$) acotado ($\leq 1.61^{\circ}C$), salvo para IMP que presentó un rango mayor debido a la amplia variabilidad entre las secuencias de las variantes analizadas. Las $T^{\circ}m$ de variantes IMP-27 ($78,46^{\circ}C$) e IMP-67 ($78,34^{\circ}C$) solaparon con el rango de $T^{\circ}m$ de los genes de OXA-48-like, y la variante VIM-1 ($82,42^{\circ}C$) solapo con el rango de los genes NDM, sin embargo ninguna de estas 3 variantes fueron descriptas aún en nuestro país. Los aislamientos productores de más de una CBP fueron correctamente diferenciados. Los aislamientos sin CBP presentaron un Ct >25 ciclos y/o no presentaron curvas de melting compatible con las CBPs buscadas.

Discusión: El sistema de qPCR presentado permitió la correcta detección y diferenciación de genes de CBP en BGNs. No obstante, los resultados obtenidos por qPCR deben contrastarse con los perfiles fenotípicos de resistencia y el perfil con inhibidores específicos. La identificación temprana del tipo de CBP en infecciones severas tiene impacto directo en la optimización del tratamiento y mortalidad del paciente.

XXV Congreso SADI 2025 - 12 al 14 de junio de 2025

Carbapenemasa	Cant. Aisl.	Especies	Variantes analizadas	Rango T°m
IMP	18	<i>A. baumannii</i> (1); <i>E. cloacae</i> (2); <i>K. aerogenes</i> (1); <i>K. pneumoniae</i> (2); <i>P. aeruginosa</i> (11); <i>P. mirabilis</i> (1)	IMP-1; IMP-4; IMP-8; IMP-13; IMP-14; IMP-15; IMP-16; IMP-18; IMP-26; IMP-27; IMP-67	74,64 - 78,46°C
OXA-48L	8	<i>E. cloacae</i> (2); <i>K. aerogenes</i> (1); <i>K. pneumoniae</i> (5)	OXA-48; OXA-163; OXA-181; OXA-232	78,05 - 79,15°C
NDM	17	<i>A. baumannii</i> (1); <i>E. cloacae</i> (1); <i>E. coli</i> (1); <i>K. pneumoniae</i> (13); <i>M. morganii</i> (1)	NDM-1; NDM-5	81,33 - 82,14°C
VIM	8	<i>E. cloacae</i> (3); <i>K. pneumoniae</i> (2); <i>P. aeruginosa</i> (3)	VIM-1; VIM-2; VIM-4; VIM-11; VIM-27	82,42 - 84,03°C
KPC	10	<i>E. cloacae</i> (1); <i>E. coli</i> (1); <i>K. pneumoniae</i> (6); <i>P. aeruginosa</i> (2)	KPC-2; KPC-3; KPC-4; KPC-5	88,25 - 89,57°C
KPC+IMP	3	<i>K. pneumoniae</i> (2); <i>R. ornitholytica</i> (1)	KPC-2 + IMP-8; KPC + IMP	KPC: 89,07-89,2°C IMP: 76,2-76,38°C
KPC+O48L	4	<i>K. pneumoniae</i> (3); <i>E. cloacae</i> (1)	KPC-2 + OXA-163; KPC + OXA-48L	KPC: 89,06-89,43°C O48L: 78,73-79,04°C
KPC+NDM	3	<i>K. pneumoniae</i> (3)	KPC + NDM	KPC: 89,17-89,24°C NDM: 81,77-81,83°C
KPC+VIM	1	<i>S. marcescens</i> (1)	KPC + VIM	KPC: 89,14°C VIM: 83,88°C
NDM+IMP	1	<i>K. pneumoniae</i> (1)	NDM + IMP	NDM: 81,73°C IMP: 76,34°C
NDM+O48L	1	<i>K. pneumoniae</i> (1)	NDM-5 + OXA-163	NDM: 81,70°C O163: 78,74°C
IMP+O48L	1	<i>E. cloacae</i> (1)	IMP + OXA-48L	IMP: 76,37°C O48L: 78,76°C
NDM+VIM+O48L	1	<i>P. rettgeri</i> (1)	NDM-1 + VIM-36 + OXA-163	NDM: 81,8°C VIM: 84,0°C O163: 78,8°C
NDM+VIM+KPC	1	<i>K. pneumoniae</i> (1)	NDM + VIM + KPC	NDM: 81,66°C VIM: 83,78°C KPC: 89,14°C
Sin carbapenemasa	9	<i>A. xylosoxidans</i> (1); <i>E. cloacae</i> (1); <i>E. coli</i> (1); <i>K. pneumoniae</i> (2); <i>P. aeruginosa</i> (3); <i>Shigella</i> (1)	Sin carbapenemasa	NC