



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN RÁPIDA DE ENTEROBACTERIAS
PRODUCTORAS DE BLEEs DIRECTAMENTE EN
MUESTRAS DE ORINAS Y HEMOCULTIVOS MEDIANTE
EL USO DE LA PRUEBA CROMOGENICA B LACTA TM
TEST.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

GERARDO ANTONIO ROMERO BORJA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Luis Manuel Perea Mejía
VOCAL: Profesor: Tanya Plett Torres
SECRETARIO: Profesor: María del Rosario Vázquez Larios
1er. SUPLENTE: Profesor: Karen Flores Moreno
2° SUPLENTE: Profesor: Daniel Ramos Pérez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.

ASESOR DEL TEMA:

M. en AOS. María del Rosario Vázquez Larios

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. Ana María del Rocío Hernández Dueñas

SUSTENTANTE:

Gerardo Antonio Romero Borja

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Enterobacterias	10
2.2 Epidemiología	11
2.3 Estructura bacteriana de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	12
2.4 Resistencia antimicrobiana (RAM)	14
2.5 Superbacterias	15
2.6 β -lactámicos	19
2.6.1 Estructura química	19
2.6.2 Mecanismo de acción	20
2.7 Clasificación de las β -lactamasas	22
2.8 Las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) como mecanismo de resistencia	23
2.9 Métodos fenotípicos para la identificación de BLEEs	24
2.9.1 Método de tamizaje para detección de β -lactamasas de Espectro Extendido según CLSI	24
2.9.2 Test confirmatorio BLEEs - CLSI (método americano)	26
2.9.3 Placa de 12 discos	27
2.10 Kit β -LACTA™ test	28
2.11 Cefalosporina cromogénica HMRZ-86	29
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo General	33
5.2 Objetivos Particulares	33

6. METODOLOGÍA	34
6.1 Selección de la población	35
6.1.1 Criterios de inclusión y exclusión	35
6.2 Manejo de la información	36
6.3 Análisis estadístico de los resultados	36
6.3.1 Definición de las variables	36
6.3.2 Cálculo de la sensibilidad y especificidad	37
6.3.3 Cálculo del índice de concordancia Kappa (k)	37
6.4 Limitaciones del estudio	37
6.5 Uso de β LACTA™ test directo en colonias aisladas de enterobacterias	38
6.6 Uso de β LACTA™ test directo en muestras de orina	39
6.7 Uso de β LACTA™ test directo en hemocultivos	40
6.8 Identificación de Microorganismos patógenos y su perfil de susceptibilidad a antibióticos marcadores de posible producción de BLEEs a través del sistema de microbiología automatizado Phoenix™ ID/AST (BD Diagnostics, Sparks, MD, EE. UU.)	41
6.9 Test confirmatorio BLEEs-CLSI/Disco Combinado (método americano)	42
7. RESULTADOS	43
7.1 β LACTA™ test sobre colonias aisladas de enterobacterias	44
7.2 β LACTA™ test directo en muestras de orina	46
7.3 β LACTA™ test directo en hemocultivos	48
8. DISCUSIÓN	50
8.1 Comparación general de los resultados obtenidos por β LACTA™ test, BD Phoenix™ ID/AST y Disco combinado	51
8.2 Determinación fenotípica de los tipos de enzimas producida por las cepas ensayadas.	54
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	57
11. REFERENCIAS	60
12. ANEXO	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura celular de las enterobacterias
- Figura 2.** Composición química de la pared celular de bacterias Gram negativas
- Figura 3.** Estructura química de los β -lactámicos
- Figura 4.** Mecanismo de acción de los β -lactámicos sobre *Enterobacteriaceae*
- Figura 5.** Similitud estereoquímica entre la D-alanil-D-alanina con las moléculas de los β -lactámicos
- Figura 6.** Esquema de clasificación de las β -lactamasas
- Figura 7.** Prueba confirmatoria BLEEs - CLSI (método americano)
- Figura 8.** Placa de 12 discos
- Figura 9.** Kit β LACTA™ test
- Figura 10.** Estructura química de HMRZ-86.
- Figura 11.** Resultados de β LACTA™ test en colonia directa
- Figura 12.** Resultados de β LACTA™ test en sedimento urinario
- Figura 13.** Resultados de β LACTA™ test en muestras de hemocultivo
- Figura 14.** Sistema de microbiología automatizado BD Phoenix™ ID/AST

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Enterobacterias de importancia clínica
- Tabla 2.** Sitio anatómico de infección por enterobacterias más frecuentes
- Tabla 3.** Algunos métodos empleados para la detección de BLEEs
- Tabla 4.** Resultados de la detección directa en colonias de enterobacterias productoras de BLEEs mediante β LACTA™ test, además de la confirmación con Disco Combinado y el microsistema BD Phoenix TM ID/AST
- Tabla 5.** Resultados de la detección de enterobacterias productoras de BLEEs directo en orina mediante β LACTA™ test, además de la confirmación con Disco Combinado y el microsistema BD Phoenix TM ID/AST
- Tabla 6.** Resultados de la detección de enterobacterias productoras de BLEEs directo en hemocultivos mediante β LACTA™ test, además de la confirmación con Disco Combinado y el microsistema BD Phoenix TM ID/AST

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM	aztreonam
BGN	Bacilos Gram Negativos
BLEEs	β -lactamasas de Espectro Extendido
BLT	β LACTA™ test
CAZ	ceftazidima
CAZ-CLA	ceftazidima-ácido clavulánico
CLA	ácido clavulánico
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CTT	cefotetán
CTX	cefotaxima
CTX-CLA	cefotaxima-ácido clavulánico
CRO	ceftriaxona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ETP	ertapenem
FEP	cefepima
FOX	cefoxitin
GS	gelosa sangre
GCh	gelosa chocolate
IAAS	Infección asociada a la atención de la salud
IMP	imipenem
ITU	Infección del tracto urinario
LPS	lipopolisacárido
MER	meropenem
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas de unión a penicilina
Plan UCRA	Plan Universitario de Control de la Resistencia a los Antimicrobianos
RAM	Resistencia Antimicrobiana
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas se han convertido en un problema de salud debido al incremento en la producción de mecanismos de Resistencia Antimicrobiana (RAM); un ejemplo de este fenómeno son las cepas productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs). Por tal motivo, el objetivo de este estudio transversal es confirmar la producción de BLEEs por cepas de la familia *Enterobacteriaceae* presentes en muestras de interés clínico; particularmente en hemocultivos y orinas recibidas como parte del trabajo de asistencia en el laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” entre agosto de 2018 y enero de 2019, mediante el ensayo de pruebas fenotípicas de sensibilidad *in vitro* más eficaces, rápidas, seguras y que cumplan con los estándares de calidad aplicables. Las muestras seleccionadas para el ensayo con la prueba cromogénica novedosa denominada **β LACTA™ test** (BLT), son aquellas con crecimiento de Bacilos Gram Negativos (BGN), sedimentos urinarios con datos de infección por BGN y hemocultivos detectados positivos por el equipo *DB BACTEC™ FX*. Destacando que, el tiempo de detección de BLEEs utilizando BLT fue de 15 minutos a tres horas, después de haber realizado la técnica. Una vez aislado al agente etiológico presente en la muestra de interés clínico, se ensayaron las colonias con el microsistema BD Phoenix™ ID/AST, el cual proporcionó información sobre género, especie y mecanismos de resistencia de la cepa en estudio, además de confirmar la presencia de producción de BLEEs mediante la prueba de *Disco Combinado* (Recomendada por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio y *estándar de oro*); obteniendo por este último un total de 45% (69/155) de cepas BLEEs positivas, al igual que con BD Phoenix™ ID/AST, mientras que con BTL, realizando los ensayos con muestras directas y con colonias aisladas, también se lograron identificar correctamente el 45% (69/155) de cepas BLEEs positivas en menor tiempo, lo cual indica para la prueba colorimétrica una sensibilidad y especificidad de 100% cada una; evidenciando que, debido al reducido tamaño de muestra ensayado, no hay diferencia significativa respecto al estándar de oro, por lo que este estudio funciona como un piloto, y se requiere realizar una evaluación con un tamaño de muestra adecuado; sin embargo, con los resultados obtenidos en este proyecto, se puede afirmar que **β LACTA™ test** podría ser candidata para utilizarse como método de detección de enterobacterias BLEEs según las facilidades del laboratorio, y de esta manera, emitir en menor tiempo, un reporte de laboratorio que permita orientar al médico en la selección del tratamiento más efectivo para el paciente, basado en el perfil RAM del microorganismo patógeno causante de la infección del paciente.

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado e irracional de los antimicrobianos ha traído como consecuencia la aparición del fenómeno de la Resistencia Antimicrobiana (RAM), propiciando que los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistentes presenten mayor riesgo de tener resultados clínicos desfavorables y complicaciones serias que pueden ocasionar la muerte; además, de consumir más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias, impactando de manera importante el costo destinado a la atención de enfermedades infecciosas, de las cuales, los principales agentes etiológicos son las enterobacterias productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) ^(17,53).

En abril del 2014, la RAM fue declarada como *amenaza global* por la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido a que son pocos los antibióticos novedosos efectivos que han sido aprobados ^(52,61); pasando de 16, en el periodo de 1983-1987, a sólo 2, en el periodo de 2008-2012; teniendo como consecuencia que se disponga cada vez de menos opciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas ^(22,56).

Es importante mencionar que, en el año 2016, la OMS aprobó un plan de acción mundial para afrontar el problema de la RAM ⁽⁵³⁾, con el compromiso, por parte de los estados miembros, de elaborar y aplicar planes nacionales apegados al mismo ^(56,78). En este planteamiento mundial y multidisciplinario, se incluye a todo el personal implicado, tales como diversos profesionales de la salud de distintos sectores (agropecuario, humano, ambiente, encargados de aguas residuales, etc.), bajo la premisa de *Una Salud*.

El enfoque de *Una Salud* reconoce que la salud de las personas está relacionada con la salud animal y el ambiente, por ejemplo: 6 de cada 10 enfermedades infecciosas en los seres humanos se propagan de los animales ⁽⁴⁰⁾. El objetivo de *Una Salud* es encontrar la colaboración de múltiples disciplinas, trabajando a nivel local, nacional y global para lograr mejorar la salud de las personas y los animales, lo cual permita mantener un estado de equilibrio con el medio ambiente que les

rodea ⁽⁵³⁾. El plan de acción reconoce y aborda la variabilidad de los recursos que disponen las naciones para luchar contra la RAM y los factores económicos que desalientan el desarrollo de productos de recambio por parte de la industria farmacéutica. ^(17,53)

En consecuencia, México ha decidido sumarse a la lucha contra la RAM tomando como referencia los objetivos planteados por la OMS en su plan de acción mundial, por consiguiente, en el año 2018 publicó en el Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos el *ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos* ⁽¹⁷⁾ y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) publicó, dentro del Programa Universitario de Investigación en Salud; el *Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (Plan UCRA)* ⁽⁷⁶⁾.

En relación con la RAM, la mayoría de los estudios han asociado la multirresistencia en enterobacterias con la presencia de β -lactamasas adquiridas, en especial las cefamicinasas plasmídicas, carbapenemasas y las BLEEs ^(56,74); las cuales fueron descritas inicialmente en España en 1988, poco después de su detección inicial en Alemania y Francia. *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* fueron las especies de mayor importancia clínica inicial en cuanto a la producción de BLEEs; originando brotes nosocomiales en grandes hospitales, principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), Quirúrgicas y Neonatales ^(54,64). Sin embargo, desde el año 2002, también han tenido relevancia las infecciones de origen estrictamente comunitario producidas por otras especies tales como *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis* y *Salmonella sp* ^(11,33,44).

Adicionalmente, la OMS en su plan de acción para combatir la RAM, menciona que es cada vez mayor la evidencia que demuestra que la resistencia simultánea a múltiples antimicrobianos representa un mal pronóstico, lo cual propicia dificultades en el tratamiento de enfermedades que, en casos extremos, puede derivar en la muerte de pacientes por el fracaso terapéutico que representa ^(36,70); además, es importante mencionar que el éxito de varios procedimientos médicos y quirúrgicos

modernos dependen de la efectividad de la antibioticoterapia. Por tal motivo, los esfuerzos han sido enfocados al diseño de políticas de salud que regulen la administración adecuada de antimicrobianos; además, del desarrollo de nuevas técnicas para la identificación temprana del agente etiológico y de su perfil de RAM, con el objetivo de contribuir al diagnóstico y selección del tratamiento de la enfermedad infecciosa ^(17,53).

Con base en lo anterior, con el fin de poder administrar al paciente la antibioticoterapia adecuada mediante la reducción de las 48 horas mínimas necesarias para realizar la detección de BLEEs en enterobacterias presentes en muestras de orina y hemocultivos empleando tanto pruebas de difusión en agar al igual que microsistemas como *BD Phoenix ID/AST* (BD Diagnostics, Sparks, MD, EE. UU.), *Bio-Rad* (Marnes la Coquette, France) ha diseñado una prueba rápida cualitativa colorimétrica denominada **β -LACTA™ test** (BLT) ^(31,32,78), la cual disminuye el tiempo de detección de BLEEs en *Enterobacteriaceae* a únicamente 15 minutos - 3 horas, debido a que se emplea directamente en colonias bacterianas y sedimentos provenientes de orina y hemocultivo; además, es más rápida y menos costosa que una prueba molecular y no requiere de equipos para poder ser implementada ⁽²⁴⁾. Así mismo, reduce el riesgo de transmisión cruzada de infecciones entre pacientes y permite orientar el tratamiento para seleccionar el más efectivo, basado en el perfil RAM del microorganismo patógeno causante de la infección del paciente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enterobacterias

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un gran grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprófitos en el tracto digestivo, aunque se trata de microorganismos ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación; así como, formando parte de la microbiota del hombre y de muchos animales. *Escherichia coli* es el microorganismo más prevalente de esta familia; asimismo, es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio ^(7,60).

En la **Tabla 1.** se detallan los géneros y las especies de enterobacterias con importancia clínica.

Tabla 1. Enterobacterias de importancia clínica.

Género	Especies
<i>Escherichia</i>	<i>coli, alberti, alvei</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca, granulomatis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>choleraesuis, typhi</i>
<i>Enterobacter</i>	Complejo <i>cloacae</i> *, <i>aerogenes, aglomerans, gergoviae, sakazakii</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alves</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii, amalonaticus, diversus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis, enterocolitica, pseudotuberculosis</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis, vulgaris</i>
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri, stuartii</i>
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae, flexneri, sonnei, boydii</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Edwarsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Ewingella</i>	<i>americana</i>
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i> *: <i>E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii</i> y <i>E. nimipressuralis</i> ⁽⁴³⁾ .	
Tabla tomada y modificada de Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. <i>Medicine</i> . 10 (51):3426.	

2.2 Epidemiología

En los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo los pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en los pacientes que no reciben tratamiento antibiótico, hay colonización por enterobacterias; además del tracto digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel. En estos contextos, la frecuencia de infección por estas bacterias productoras de BLEEs respecto a las no productoras es del 60% ^(73,76). La proporción de aislamientos resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos aquellos que producen β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), ha aumentado de forma ininterrumpida, de modo que, algunos estudios realizados en México y diferentes partes del mundo ^(3,21,41,46,76) demuestran que cerca del 90 al 100% de todos los aislamientos nosocomiales, y aproximadamente el 14% de todos los aislamientos adquiridos en la comunidad, son ahora resistentes a varias clases importantes de antimicrobianos. Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias en los hospitales, un ejemplo de dichos factores son el uso cada vez mayor de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas (catéteres urinarios e intravenosos, endoscopias e intervenciones), así como, el empleo de potentes inmunosupresores y las estancias hospitalarias prolongadas, entre otros ^(56,60).

El uso de catéteres representa una probabilidad del 6,2% ⁽⁷³⁾ de adquirir una infección bacteriana, la cual, al no tratarse adecuadamente, prácticamente garantiza que se presentará el fenómeno de RAM. Con base en el estudio realizado en el año 2015 por Rodríguez-Vidigal F. y col. ⁽⁶⁶⁾, se sabe que el tratamiento empírico inicial no es idóneo en mayor proporción cuando se trata de infecciones causadas por enterobacterias BLEEs (66,7% frente a 15,9%, $p < 0,0001$), y en estos casos, cerca del 42,6% de pacientes fallecen (RM = 5,3: IC 95% 1,3-21,5). Por otro lado, cuando el agente etiológico es una enterobacteria y hay presencia de bacteriemia, la mortalidad es mayor (75% frente a 22%, $p < 0,02$) y el tratamiento empírico no es idóneo (87,5% frente a 43,7%, $p = 0,05$). En la **Tabla 2.** se resumen los sitios anatómicos de infección por enterobacterias más frecuentes.

Tabla 2. Sitio anatómico de infección por enterobacterias más frecuentes.

Sitio anatómico	Enterobacterias más frecuentes
Sistema nervioso central	<i>Escherichia</i>
Tracto respiratorio inferior	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Torrente sanguíneo	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Tracto digestivo	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
Tracto urinario	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

Tabla tomada y modificada de Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*. **10**(51):3427.

2.3 Estructura bacteriana de la familia *Enterobacteriaceae*

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro. Como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, consiste en una capa delgada de peptidoglucano junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa incluye lipopolisacáridos (LPS), los cuales, en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias; además, contienen lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa, entre las cuales, se encuentran algunas estructuras complejas proyectadas hacia el exterior; los flagelos, utilizados para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada desde la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y el pili sexual, el cual es una estructura presente en las bacterias que contienen plásmidos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa del DNA plasmídico.

En la **Figura 1.** se esquematiza la estructura básica de la familia *Enterobacteriaceae*. En la **Figura 2.** se detalla la composición química de la pared celular de las bacterias Gram negativas ^(7,67,60).

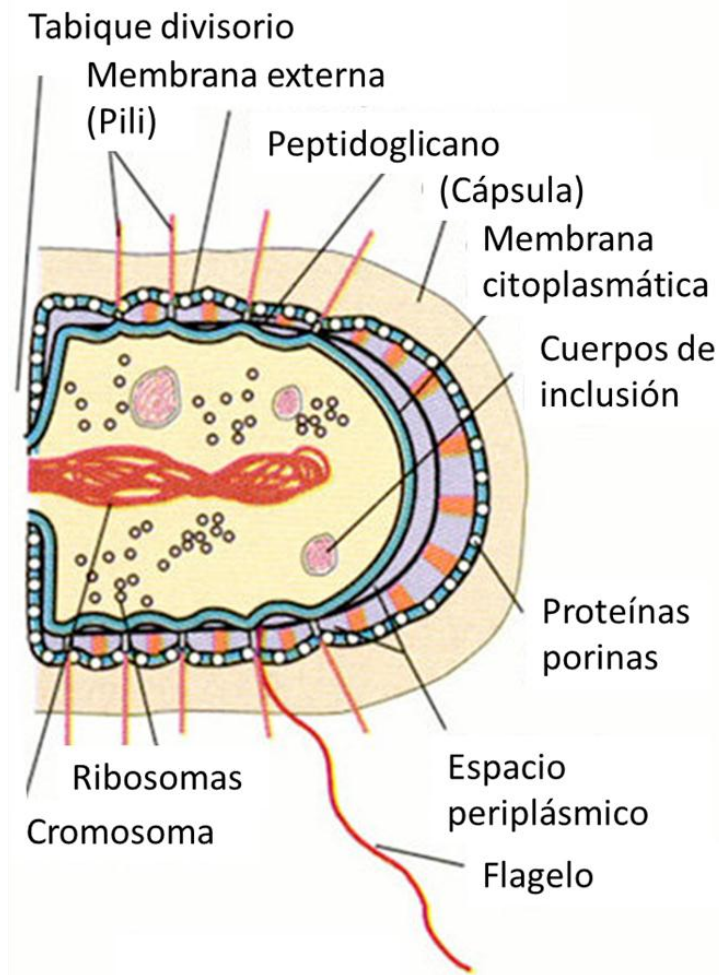


Figura 1. Estructura celular de las enterobacterias. Poseen una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa. Las estructuras cuyo nombre se encuentran entre paréntesis no se encuentran en todas las bacterias. Durante el proceso de división celular, la membrana y el peptidoglicano crecen para formar el tabique divisorio que separará a las células hijas. (Tomado y modificado de Marler, M.; Siders, J.; Simpson, A; Alien, S. (2004). Mycology Image Atlas CD-Rom, Indiana Pathology Images.)

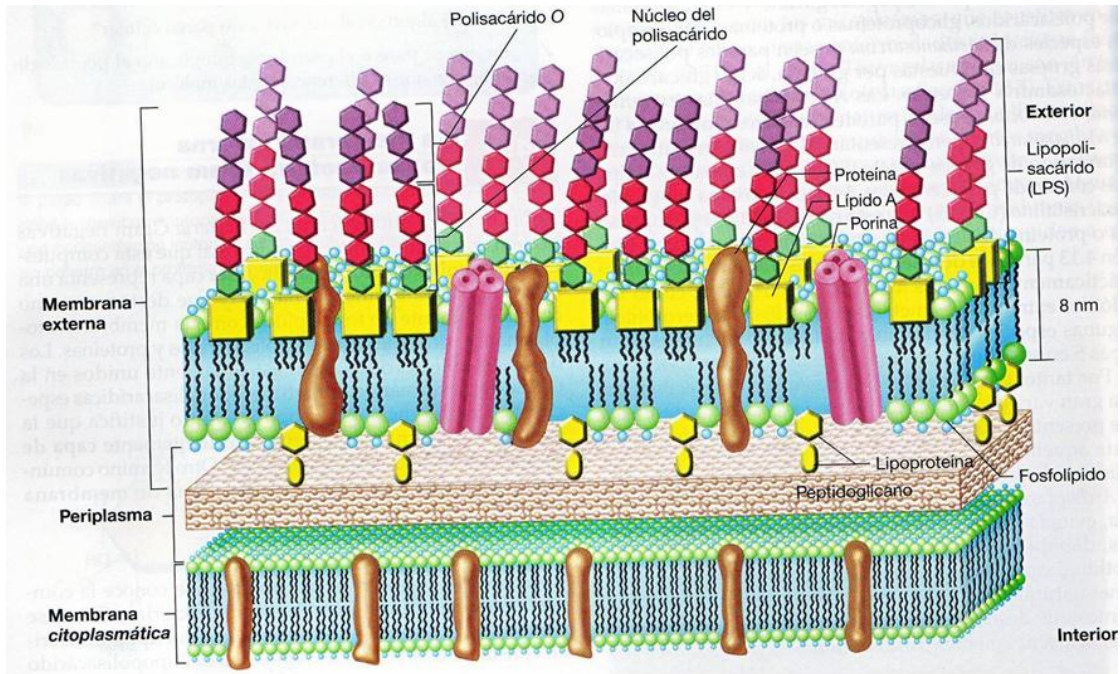


Figura 2. Composición química de la pared celular de bacterias Gram negativas. Se observa la disposición del lipopolisacárido, fosfolípidos, porinas y lipoproteínas en la membrana externa. (Tomada de M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10a Ed. Prentice Hall-Pearson Education. 80.)

2.4 Resistencia antimicrobiana (RAM)

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema de salud mundial que se encuentra en constante evolución. De manera frecuente se reportan nuevos mecanismos de RAM, tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas ⁽⁶⁵⁾. Las RAM son utilizadas por algunos microorganismos como mecanismo de defensa; son un fenómeno que existía antes del descubrimiento, desarrollo y uso de los antibióticos (resistencia intrínseca); sin embargo, al emplear a estos últimos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, la RAM se ha intensificado debido al fenómeno denominado *presión selectiva* contra las bacterias, considerado como uno de los factores más importantes para su aparición y diseminación (resistencia adquirida) ^(65,69). En el Plan UCRA ⁽⁷⁶⁾, se observó que en los aislamientos de enterobacterias existe resistencia elevada a cefalosporinas de segunda, tercera y

cuarta generación, si bien no se informó el fenotipo para producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), se consideró que la incidencia de RAM es de al menos el 60% debido a que ese fue el porcentaje promedio de aislamientos productores de ese tipo de enzimas.

La presencia de una bacteria resistente a antibióticos como agente etiológico de una infección, disminuye las posibilidades de lograr la erradicación bacteriológica en el paciente, generando así, por un lado, el incremento significativo en los costos de atención y tratamiento. Mientras que, por otro lado; propicia el alza de las tasas de morbilidad ⁽¹⁶⁾, por tal motivo, es necesario implementar técnicas rápidas de identificación de RAM que puedan apoyar en el diagnóstico del paciente, con el objetivo de seleccionar una antibioticoterapia adecuada para el paciente en el menor tiempo posible ^(17,45,53,73,76).

2.5 Superbacterias

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), antes denominadas infecciones nosocomiales, son un importante problema de salud pública debido a que generan altas tasas de morbilidad y un importante aumento en los costos de atención de hasta \$29 000 dólares, por paciente, cuando el agente etiológico es una bacteria resistente a antibióticos ⁽⁴⁾. Las IAAS se definen como las infecciones adquiridas en el hospital por un paciente internado por una razón distinta a ellas, que no estaban en periodo de incubación ni con manifestaciones clínicas al momento del ingreso y/o egreso hospitalario ⁽⁴⁷⁾.

En general, las IAAS pueden ser causadas por una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos. Entre los factores que contribuyen a esta patología encontramos aquellos que son exclusivos del microorganismo, de la susceptibilidad del paciente, del medio ambiente y del tratamiento establecido ⁽⁵⁰⁾.

Más de 1.7 millones de personas en el mundo presentan complicaciones por infecciones contraídas en el hospital. Si bien las IAAS afectan tanto a países desarrollados como a subdesarrollados, sus tasas de prevalencia entre ellos son completamente diferentes. La tasa global de IAAS por 100 egresos reportada en México en 2014 fue de 4.1 ⁽¹⁸⁾, y la prevalencia fluctúa desde 7 hasta 15.8%, dependiendo de la institución del sector salud, con una mortalidad aproximada de 29%. No obstante, en la unidad de cuidados intensivos (UCI), el panorama es más crítico, con una prevalencia de hasta 23.2%, con una mortalidad global de 5.9%, y por IAAS, de 25.15% ^(39,71).

Los reportes más recientes de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) de la Secretaría de Salud indican que en nuestro país, las IAAS más frecuentes son bacteriemias (23%) , neumonía (20%), infección de vías urinarias (15.9%), infección de herida quirúrgica (15.4%), otras (25.4%) ⁽¹⁸⁾; estos porcentajes han variado respecto a los reportes de 2012, donde eran neumonía (39.7%), infecciones urinarias (20.5%), quirúrgicas (13.3%) y del torrente sanguíneo (7.3%) ⁽⁵⁰⁾.

En enero de 2009, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (Infectious Diseases Society of America en inglés) publicó una lista de bacterias patógenas de alta incidencia en el mundo que presentan multirresistencia a antibióticos, denominadas coloquialmente como “superbacterias” ^(30,34,56,71). Asimismo, la OMS ⁽⁵¹⁾, hizo un llamado para que se desarrollen con urgencia nuevas estrategias para combatir las infecciones que causan estas bacterias, denominadas actualmente patógenos prioritarios; dicha lista se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, elevada y media.

Prioridad 1: CRÍTICA

- a. *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- b. *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- c. *Enterobacteriaceae*, productoras de BLEEs, resistentes a los carbapenémicos

Prioridad 2: ELEVADA

- a. *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
- b. *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
- c. *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
- d. *Campylobacter spp.*, resistente a las fluoroquinolonas
- e. *Salmonella*, resistente a las fluoroquinolonas
- f. *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas y a las fluoroquinolonas

Prioridad 3: MEDIA

- a. *Streptococcus pneumoniae*, resistente a la penicilina
- b. *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
- c. *Shigella spp.*, resistente a las fluoroquinolonas

El grupo de prioridad crítica incluye a las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos ^(30,34,56,71). Este grupo puede provocar infecciones graves y a menudo letales, como bacteriemias y neumonías ⁽⁵¹⁾.

Las bacterias de prioridad crítica han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multirresistentes) ⁽⁷²⁾.

Los niveles segundo y tercero de la lista, las categorías de prioridad elevada y media contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por *Salmonella*.

Cabe mencionar que entre estas bacterias se encuentra un grupo denominado como **ESCAPE** ⁽³⁷⁾, acrónimo que hace referencia a sus nombres: *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridioides difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacteriaceae*, así como a su capacidad de “escapar” a la terapia con antibióticos, ya que estas bacterias pueden poseer resistencia a muchos de los antibióticos que se emplean para su tratamiento ^(30,34,56,71). Este grupo también es conocido como **ESKAPE** ⁽³⁰⁾, en donde se reconoce a *Klebsiella pneumoniae* BLEEs como una bacteria que requería mención especial, sin embargo, debido a que este acrónimo busca englobar a las bacterias causantes de IAAS con mayor frecuencia, en septiembre de 2009, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América decidió colocar a *Klebsiella pneumoniae* dentro de *Enterobacteriaceae* y adicionar a *C. difficile* al acrónimo, debido a que se observó un incremento en la prevalencia de IAAS causadas por dicho microorganismo ⁽³⁷⁾.

Esta clasificación, si bien sirve de referencia a nivel mundial, no se puede utilizar en todos los pacientes; por este motivo, es importante conocer la biota de cada país, por ejemplo, Estados Unidos es una de las naciones en donde existe un mayor número de estudios de prevalencia sobre los agentes etiológicos en las IAAS. De estos, el microorganismo más frecuentemente aislado es *Staphylococcus aureus* ⁽⁶⁷⁾. En lo que respecta a México, el perfil es cambiante: resultados presentados en el 2018 por la UNAM, en el Plan UCRA, muestran que el principal microorganismo aislado son las enterobacterias productoras de BLEEs, principalmente *E. coli* y *K. pneumoniae* (48%), seguido por *P. aeruginosa* multirresistente (incluido carbapenémicos) (22%), *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (13%), *A. baumannii*. (11%) y enterococos resistentes a vancomicina (6%) ⁽⁷⁶⁾.

2.6 β -lactámicos

Los β -lactámicos son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana.

2.6.1 Estructura química

De acuerdo a su estructura química (ver **Figura 3**), pueden describirse cuatro clases de β -lactámicos ^(2,13,14,77):

- π penicilinas
- π cefalosporinas
- π monobactámicos
- π carbapenémicos

La generación de un número creciente de subclases, dentro de las dos primeras, hace que sean los grupos más grandes dentro de la familia.

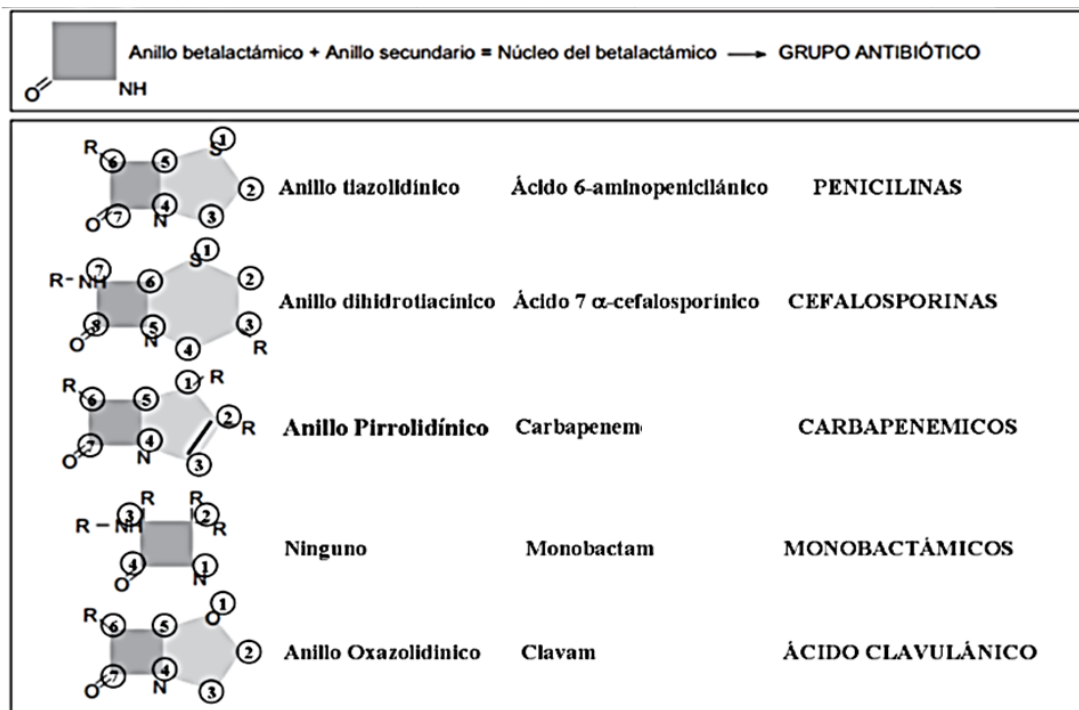


Figura 3. Estructura química de los β -lactámicos. (Tomada y modificada de Suárez, C.; Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27**(2):118.)

2.6.2 Mecanismo de acción

Los β -lactámicos son antibióticos de acción bactericida que actúan sobre la fase final de síntesis del peptidoglicano. Actúan como sustratos competitivos de distintas enzimas participantes en la síntesis de membrana, esencialmente de las transpeptidasas denominadas proteínas fijadoras de penicilina (PBP), ya que presentan una similitud estructural con el extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido que enlaza las cadenas de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano. En presencia de antibiótico, las transpeptidasas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico y se forma un éster estable entre el compuesto hidrolizado y un grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima. Con ello se inhibe la transpeptidación, se desestabiliza la pared celular y finalmente se produce la lisis bacteriana mediada por autolisinas ⁽¹²⁾.

La resistencia a β -lactámicos está mediada por varios mecanismos:

- 1) Alteración de la diana (PBP).
- 2) Disminución de la permeabilidad.
- 3) Mecanismos de eflujo o expulsión del antibiótico.
- 4) Inactivación enzimática por β -lactamasas:
 - a) β -lactamasas cromosómicas.
 - b) β -lactamasas plasmídicas:
 - i) β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

La producción de β -lactamasas, enzimas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, sería el principal mecanismo de resistencia en Gram negativos ⁽²⁷⁾.

En la **Figura 4**. Se muestra el mecanismo de acción de los β -lactámicos, los cuales presentan actividad antimicrobiana debido a la similitud estereoquímica entre la D-Alanil-D-Alanina y las moléculas de dichos antibióticos (**Figura 5**) ^(2,5,13,68,75,77).

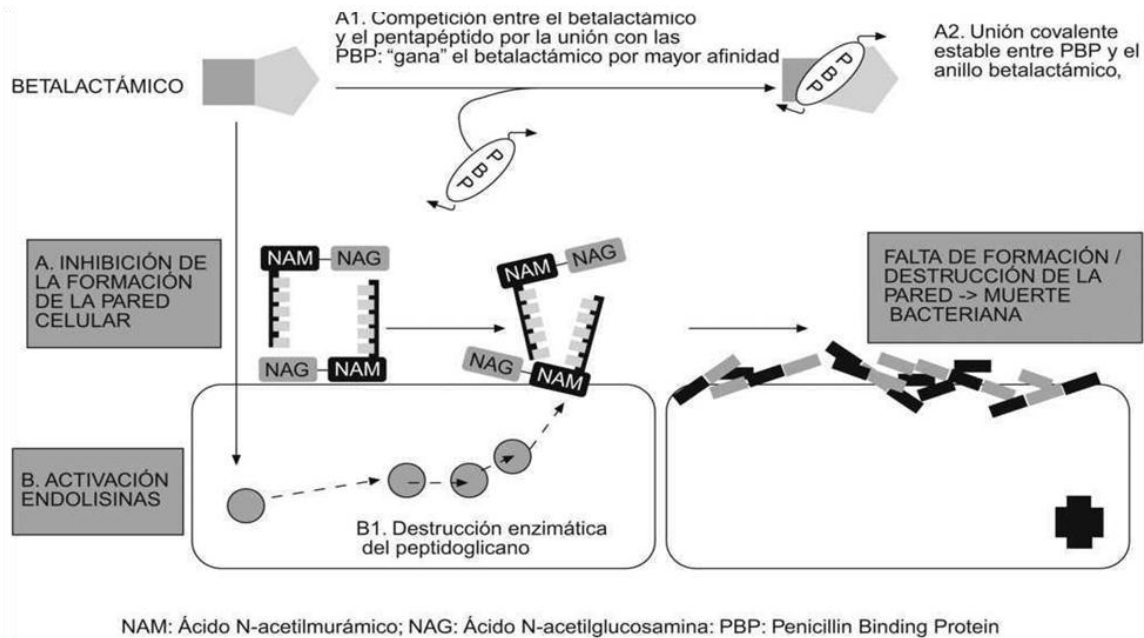


Figura 4. Mecanismo de acción de los β -lactámicos sobre *Enterobacteriaceae*. (Tomada de Suárez, C.; Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27**(2):122.)

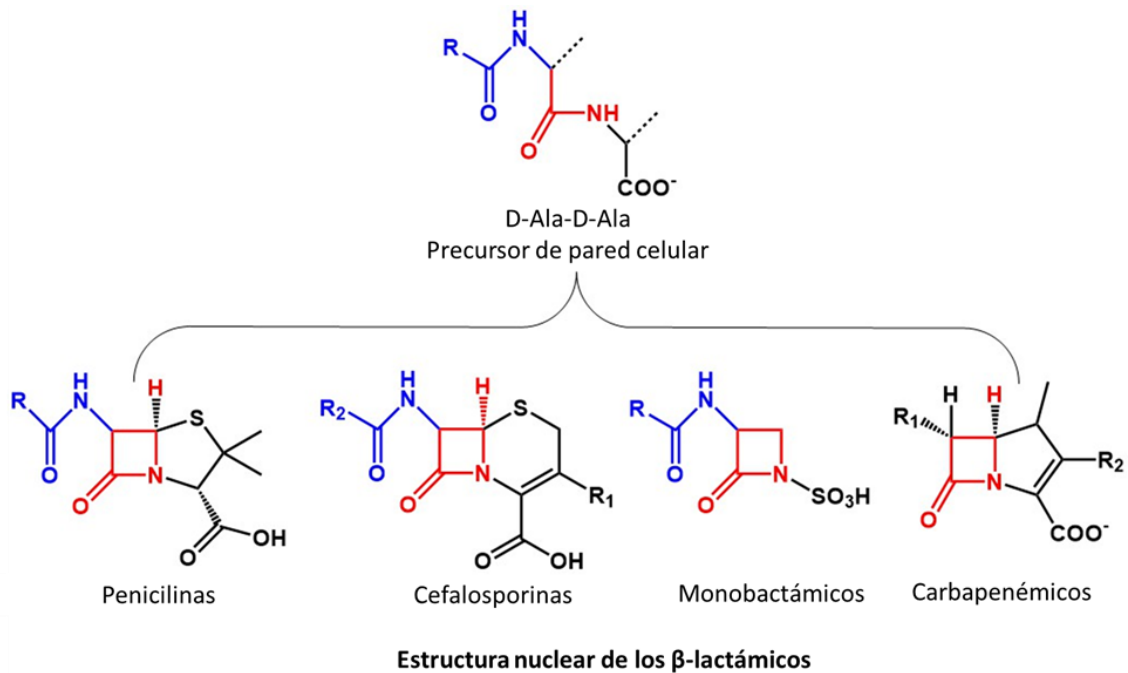


Figura 5. Similitud estereoquímica entre la D-alanil-D-alanina con las moléculas de los β -lactámicos. Todos los antibióticos β -lactámicos contienen el mismo anillo " β -lactámico" de 4 miembros (rojo). (Tomada y modificada de RINGBIO. (2019). Beta lactams antibiotics: The greatest discovery, the biggest danger. En julio 28, 2019 en <https://ringbio.com/es/node/183>)

2.7 Clasificación de las β -lactamasas

Las β -lactamasas han recibido múltiples clasificaciones debido a que son muy numerosas. Pueden ser separadas según su estructura, su función, el sustrato al que se unen o las sustancias que las inhiben, según sus parámetros cinéticos y su expresión, es decir, si está codificada en el cromosoma o si está codificada en plásmidos.

En la actualidad, las dos clasificaciones más vigentes son la de Ambler y la de Bush-JacobyMedeiros ^(54,55). La clasificación de Ambler se formuló en el año 1980 y se basa en la estructura molecular y secuencia de aminoácidos de las enzimas. Hace una clasificación con letras de la A a la D. La A, C y D, corresponden al grupo de β -lactamasas que tiene serina en su estructura y son llamadas serina β -lactamasas, hidrolizan penicilinas, oxacilina y cefalosporinas. Las del grupo B son conocidas como metalo- β -lactamasas y se diferencian de los otros tres grupos en que tienen como cofactor un ion de Zinc, necesario para actuar; igualmente, actúa sobre penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero no sobre monobactámicos (**Figura 6**) ^(9,28).

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros nació en 1995 y se basa en las similitudes de la función de las enzimas, estableciendo así, grupos del 1 al 4, de los cuales, a su vez, el grupo 2 lo subclasifica con letras de la A a la F. De este grupo, la mayoría es inhibida por el ácido clavulánico, donde el grupo 2*de* es el que corresponde a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) ^(9,20).

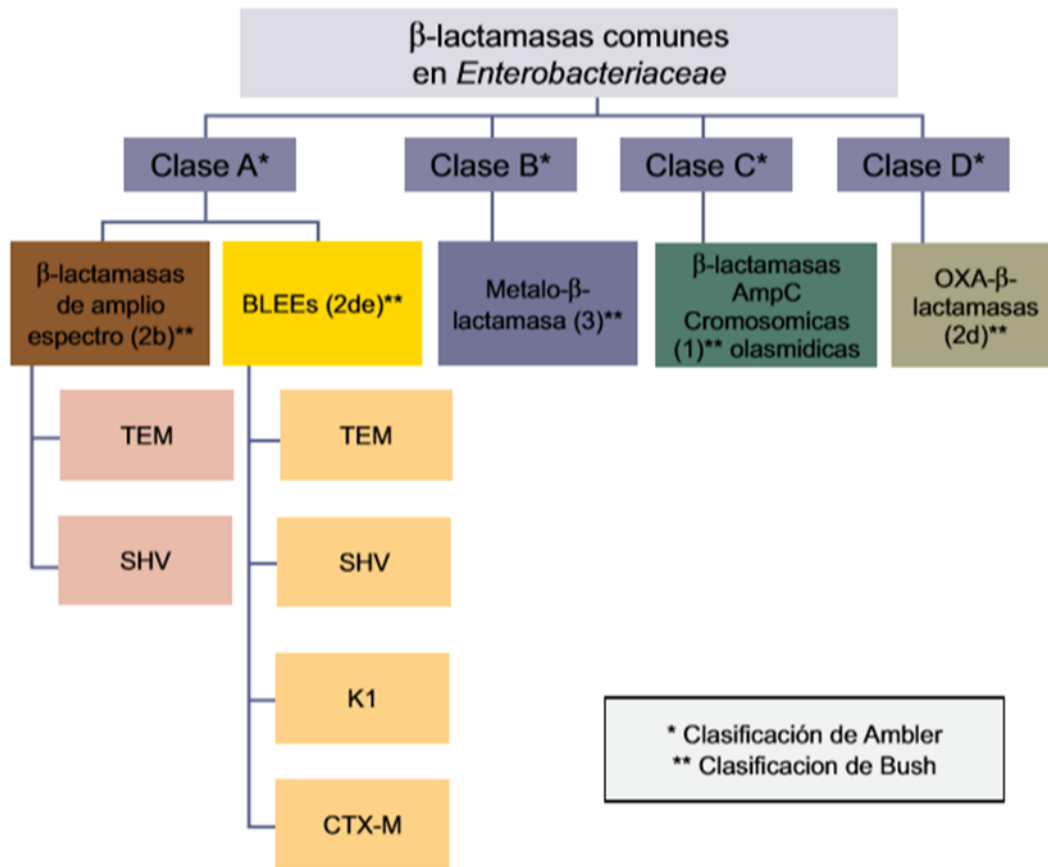


Figura 6. Esquema de clasificación de las β-lactamasas. TEM: Tipo temoniera; SHV: Variante sulfhidrilo; K1: β-lactamasa cromosómica K1; CTX-M: Cefotaximasas. (Tomada de Echeverri, L.; Atehortúa, S.; Robledo J. (2009). *K. pneumoniae* y β-lactamasas. Un problema creciente. MEDICINA UPB **28**(2):135-141)

2.8 Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) como mecanismo de resistencia

Uno de los mecanismos de resistencia con mayor trascendencia clínica son las enzimas BLEEs, codificadas por plásmidos, transposones e integrones ⁽¹⁰⁾. Por lo general, se presentan en enterobacterias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* ^(10,38).

Las BLEEs tienen la capacidad de hidrolizar las oximinocefalosporinas como ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) y el aztreonam (ATM), quedando sensibles frente a las cefamicinas (cefoxitina (FOX), cefotetan (CTT)) y carbapenémicos (imipenem (IMP), meropenem (MEP), ertapenem (ETP)) (19,54,59,62). Se ha descrito diferentes familias de BLEE, como TEM y SHV y otros tipos como las cefotaximasas (CTX-M) descritas en 1989, las cuales, se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a cefuroxima (CXM), cefotaxima (CTX) y cefepima (FEP) (54,62). Las BLEEs, constituyen un problema terapéutico y epidemiológico de gran magnitud; la presencia de estas cepas como agente etiológico de infecciones conllevan a multirresistencia debido a que portan genes que provocan resistencia cruzada a quinolonas, aminoglucósidos e incluso cotrimoxazol; de ahí la gran importancia de una adecuada y oportuna identificación (38).

2.9 Métodos fenotípicos para la detección de BLEEs

A continuación, se describen los métodos fenotípicos principales para la detección de enterobacterias productoras de BLEEs. De forma complementaria, en la **Tabla 3**, se muestran las ventajas e inconvenientes de dichos métodos y de algunos adicionales.

2.9.1 Método de tamizaje para detección de β -lactamasas de Espectro Extendido según CLSI

Es realizado a través del método de disco difusión en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Kirby Bauer. Se emplean discos de susceptibilidad antimicrobiana de ATM (30 μ g), CRO (30 μ g), CTX (30 μ g) y CAZ (30 μ g); estos dos últimos permiten la detección de forma más eficiente de BLEEs de tipo CTX-M y las derivadas de TEM, SHV, y PER-2, respectivamente; además, se utilizan como criterios de sospecha, los diámetros: ATM \leq 27 mm; CRO \leq 25 mm.; CTX \leq 27 mm; CAZ \leq 22 mm. Se considera cepa posible productora de BLEEs (BLEEs positiva) cuando presenta halos de inhibición iguales o inferiores a los diámetros referidos, para al menos uno de los antibióticos (15,49). Las cepas sospechosas deben ser sometidas a las pruebas confirmatorias. (15,38,49)

Tabla 3. Algunos métodos empleados para detección de BLEEs

Clasificación	Método	Técnica y/o Fundamento	Ventajas	Inconvenientes
Métodos fenotípicos	Prueba confirmatoria BLEEs-CLSI	Método de disco difusión en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Kirby Bauer. (13,42)	<ul style="list-style-type: none"> π Económico π Disponible para todos los antimicrobianos π Permite estudiar sinergismos, antagonismos y mecanismos de resistencia π No requiere un equipo especial 	<ul style="list-style-type: none"> π Completamente Manual π Debe ser modificada para podería emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento
	Epsilómetro (E- test)	Se emplean tiras no porosas impregnadas con CTX o CAZ con y sin CLA. Para determinar la CMI se lee el extremo de la tira con antibiótico sin CLA y el extremo con CLA. Se dividen las dos concentraciones en ese orden. El resultado es positivo para BLEEs cuando la proporción es ≥8 y negativo <8. (43)	<ul style="list-style-type: none"> π Gradiente de concentración del antibiótico estable, lo cual proporciona una CMI altamente reproducible. π No requiere equipo especial 	<ul style="list-style-type: none"> π Deja de ser económico si se evalúan múltiples antimicrobianos en cada aislamiento π Debe ser modificado para poderlo emplear en organismos fastidiosos o de crecimiento lento
	Microsistemas automatizados (Vitek, TM BD Phoenix ID/AST)	Se emplean cuatro marcadores principales con y sin CLA: CTX, CAZ, CPD, CRO. Si hay fenómeno de inhibición en los que se adicionó CLA, el microsistema emite una alerta de bacteria productora de BLEEs (44).	<ul style="list-style-type: none"> π Identificación paralela de género, especie y perfil de resistencia de la cepa ensayada π Inóculo estandarizado π Reproducible π Alta sensibilidad π Manejo de datos a través de Software. 	<ul style="list-style-type: none"> π Se emplean paneles o tarjetas distintas en la identificación del perfil de resistencia de cada microorganismo. π Puede requerir el uso de pruebas complementarias. π Requiere un equipo especial
Métodos genotípicos	*Colorimétrico β LACTA TM test	Se mezcla, con la muestra a ensayar, una gota del reactivo R1 y R2 del kit β LACTA TM test que contiene a la cefalosporina cromogénica HM/RZ-89, la cual, al ser hidrolizada produce un cambio de color de amarillo a rojo/violeta (45).	<ul style="list-style-type: none"> π Brinda resultados en menos de 3 horas π No requiere un equipo especial π Económico π Alta sensibilidad π Aplicable directamente en colonias π Aplicable directamente en sedimentos procedentes de orina y hemocultivos 	<ul style="list-style-type: none"> π No se recomienda usar a temperaturas ≥30°C π El color de la colonia aislada en agar MacConkey o medios con o sin clonuro de metirosanina interfiere con el resultado de la prueba (46) π No se debe emplear en la ausencia de un sedimento bacteriano visible
	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)	Técnicas de amplificación de DNA que emplean cebadores generales para confirmar el grupo al que puede pertenecer la β-lactamasa encontrada. La posterior secuenciación de los productos obtenidos permite determinar con exactitud la enzima BLEEs (47).	<ul style="list-style-type: none"> π Se pueden realizar directamente sobre muestras clínicas π Alta sensibilidad, especificidad y bioseguridad π Determinación genotípica más veloz que la fenotípica (organismos de crecimiento lento). π Útil en agentes no cultivables. 	<ul style="list-style-type: none"> π Está limitada en la actualidad por el alto número de variantes y el aumento del número de mutaciones en las nuevas BLEEs que pertenecen a estas familias. π Falta de sensibilidad si la concentración de microorganismos presentes en la muestra es baja. π Requiere equipos especiales
	<p>Abreviaturas: CTX: cefotaxima; CAZ: ácido disulfónico; CPD: cefpodoxima; CRO: cefepodoxima; CMI: concentración mínima inhibitoria; BLEEs: β-lactamasas de Espectro Extendido.</p> <p>(Tabla elaborada por Gerardo Antonio Romero Borja en agosto 11, 2019)</p>			

2.9.2 Prueba confirmatoria BLEEs - CLSI (método americano)

Las placas de agar Mueller Hinton son sembradas con las cepas sospechosas; para ello se siguen las recomendaciones del CLSI, colocándose discos de susceptibilidad antimicrobiana de CAZ (30 μ g), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 μ g), CTX (30 μ g), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 μ g). Una diferencia mayor o igual a 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ-CLA y CAZ o CXT-CLA y CTX, es interpretada como cepa productora de BLEEs ^(15,38,49) (**Figura 7**).

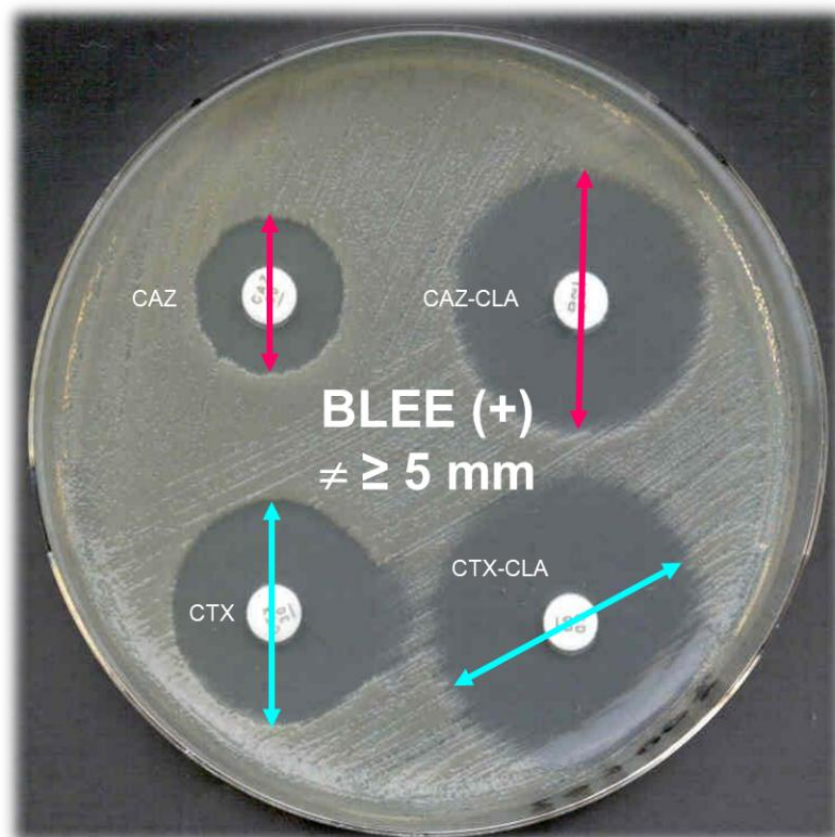


Figura 7. Prueba confirmatoria BLEEs - CLSI (método americano). Comparación entre los halos de inhibición obtenidos para los marcadores ceftazidima (CAZ) y cefotaxima (CTX), ambos con y sin ácido clavulánico (CAZ-CLA y CTX-CLA), resaltando que la cepa será identificada como productora de BLEE sí y sólo sí, en al menos un marcador se presenta una diferencia ≥ 5 mm respecto al mismo con ácido clavulánico adicionado. (Elaborada por Gerardo Antonio Romero Borja con material obtenido durante el desarrollo experimental de la tesis).

2.9.3 Placa de 12 discos

La placa de 12 discos (**Figura 8**), permite realizar de forma simultánea el Método de tamizaje para detección de β -lactamasas de espectro extendido según CLSI y el Test confirmatorio BLEE – CLSI, debido a que, esta se ensaya a través del método de disco difusión en agar Mueller Hinton mediante la técnica de Kirby Bauer, utilizando discos de susceptibilidad antimicrobiana, los cuales se colocan en posiciones y a distancias específicas para poder visualizar sinergismos, de ATM (30 μ g), CTX (30 μ g), CAZ (30 μ g) y CRO (30 μ g), (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 μ g), (CTX/CXT-CLA) (30/10 μ g), FEP (30 μ g), FOX (30 μ g), CTT (30 μ g), IMP (10 μ g), MER (10 μ g) y ETP (10 μ g) ^(15,38,49,54,62) y posterior a su incubación durante 18-24 h en atmósfera aeróbica, se registra el diámetro de los halos de inhibición producidos por la cepa en estudio, aplicando los criterios establecidos por CLSI para cada antibiótico, determinando, de esta manera, el mecanismo de RAM que el microorganismo expresa.

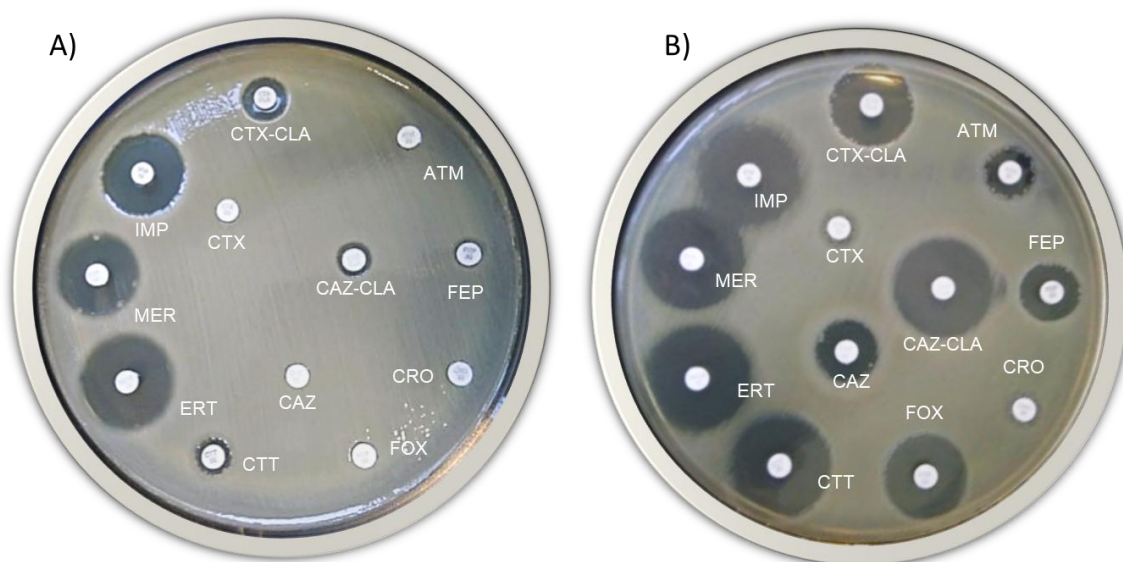


Figura 8. Placa de 12 discos. A) Placa con cepa de *Klebsiella pneumoniae* confirmada como productora de BLEEs debido a que se observaron lecturas ligeramente significativas (>5 mm) entre los halos de inhibición de cefotaxima (CTX) y cefotaxima con ácido clavulánico (CTX-CLA). B) Placa con cepa de *Escherichia coli* confirmada como productora de BLEEs debido a que se obtuvieron lecturas significativas (>> 5mm) entre los halos de inhibición de los dos marcadores CTX y ceftazidima (CAZ) con y sin sus respectivas mezclas con ácido clavulánico (CTX-CLA y CAZ-CLA). (Elaborada por Gerardo Antonio Romero Borja con material obtenido durante el desarrollo experimental de la tesis).

2.10 Kit β -LACTA™ test

β -LACTA™ test (BLT) (**Figura 9**) es una prueba rápida cromogénica desarrollada por Bio-Rad (Marnes-la-Coquette-France). Esta prueba fenotípica diseñada para ser más rápida que los métodos convencionales, está basada en la cefalosporina cromogénica, HMRZ-86, la cual, al ser hidrolizada produce un cambio de color de amarillo a rojo/violeta. BLT inicialmente fue desarrollada para detectar enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación en únicamente 15 minutos a partir de cultivos sólidos, mostrando una sensibilidad y especificidad de 80,2% y 97,9% ^(8,24,78), respectivamente; además, BTL puede ser aplicado directamente a sedimentos de orina y a hemocultivos confirmados como positivos a Bacilos Gram Negativos (BGN) ^(24,78).



Figura 9. Kit β LACTA™ test. Se muestran los reactivos R1 (A) y R2 (B) que conforman el kit, además de C y D, los cuales son resultados positivo y negativo, respectivamente a la detección de enterobacterias BLEEs

2.11 Cefalosporina cromogénica HMRZ-86

HMRZ-86 (**Figura 10**) es una cefalosporina cromogénica novedosa que posee un grupo carboxi-propil-oxiimino unido a la cadena lateral en la posición 7 del compuesto, el cual protege al anillo β -lactámico de un rango de β -lactamasas, pero no de las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) o de las metalo- β -lactamasas ⁽³⁵⁾. La hidrólisis del anillo β -lactámico por estas enzimas cambia la longitud de onda absorbida por el doble enlace conjugado ubicado en la posición 3, cambiando el color del compuesto de amarillo a rojo-violeta, de la misma manera que ocurre con la nitrocefina ⁽⁴⁸⁾.

Los métodos de detección tradicionales son laboriosos y requieren mucho tiempo, lo que dificulta su implementación como parte del trabajo de asistencia de un pequeño hospital. Se ha demostrado ^(35,48) que HMRZ-86 reacciona con BLEEs y metalo- β -lactamasas, pero no con las penicilinasas y cefalosporinasas tradicionales. La reacción ocurre dentro de los primeros 15 minutos a tres horas, y el resultado se indica mediante un cambio visible en el color. Aunque la intensidad del color depende de la tensión, incluso las reacciones débiles son fácilmente visibles dentro de los 30 minutos ^(31,32,35,48,78). Por lo cual, es necesario resaltar la utilidad de HMRZ-86 para diferenciar las BLEEs de las β -lactamasas tradicionales.

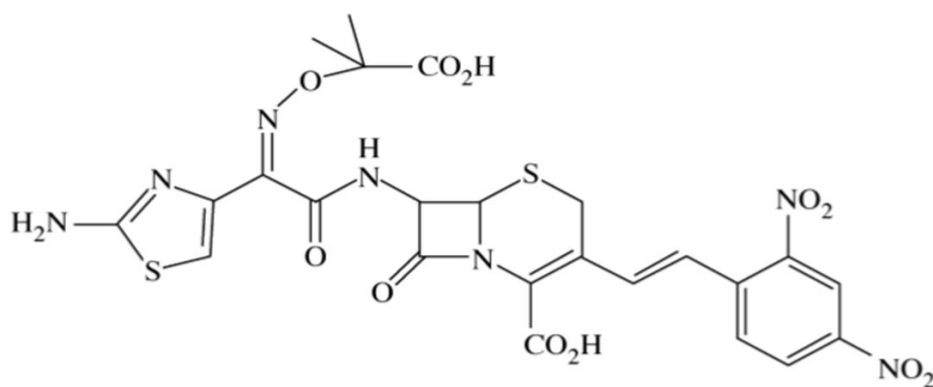


Figura 10. Estructura química de HMRZ-86. Ácido trifluoroacético (7R)-7-[2-(aminotiazol-4-il)-(z)-2-(1-carboxi-1-metiletoxiimino) acetamido]-3-(2,4-dinitrostiril)-3-cefem-4-carboxílico. isómero E. Cefalosporina cromogénica contenida en el reactivo R2 del kit β LACTA™ test. (Tomada de: Hanaki, H.; Hiramatsu, K. *et al.* (2004). Characterization of HMRZ-86: a novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum β -lactamasas. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 888.)

3. JUSTIFICACIÓN

El fenómeno de la resistencia antimicrobiana (RAM) se ha presentado como consecuencia del uso indiscriminado e irracional de los antimicrobianos, propiciando en el paciente un riesgo de hasta el 66,7% de obtener resultados clínicos desfavorables, incluso la muerte. Cabe resaltar que el servicio de atención médica y tratamiento antimicrobiano brindado a un paciente que cursa con una infección causada por una bacteria farmacorresistente aumenta hasta en \$29000 dólares por paciente, lo cual impacta significativamente en el costo destinado a la atención de enfermedades infecciosas, de las cuales, el 60% de los principales agentes etiológicos son las enterobacterias productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs). Por tal motivo, en 2014, la RAM fue declarada como *amenaza global* por la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido a que son pocos los antibióticos novedosos efectivos que han sido aprobados y en 2016 aprobó un plan de acción mundial para afrontar el problema de la RAM, el cual enfoca los esfuerzos, entre otras cosas, al desarrollo de nuevas técnicas para la identificación temprana del agente etiológico y de su perfil de RAM, con el objetivo de contribuir al diagnóstico y selección del tratamiento de la enfermedad infecciosa. En consecuencia, *Bio-Rad* ha diseñado la prueba rápida cualitativa colorimétrica denominada **β -LACTA™ test** (BLT), la cual disminuye el tiempo de detección de *Enterobacteriaceae* BLEEs a únicamente 15 minutos - 3 horas, debido a que se emplea directamente en colonias bacterianas y sedimentos provenientes de orina y hemocultivos; además, es más rápida y menos costosa que una prueba molecular y no requiere de equipos para poder ser implementada. Por tal motivo, el realizar un estudio que permita evaluar la sensibilidad y especificidad de dicha prueba en muestras de interés clínico provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, permitirá determinar si BLT es candidata para emplearse en la detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido, y de esta manera, emitir en menor tiempo, un reporte de laboratorio que permita orientar al médico en la selección del tratamiento más efectivo para el paciente, basado en el perfil RAM del microorganismo patógeno causante de la infección del paciente.

4. HIPÓTESIS

La prueba cromogénica **β LACTA™ test** ha sido previamente evaluada en la detección rápida de enterobacterias BLEEs directo en colonias, en muestras de hemocultivos y orina. Por tal motivo, se espera que la sensibilidad y especificidad de ésta, sea muy similar a la del microsistema *BD Phoenix™ ID/AST* y al estándar de oro, *Disco Combinado*, al ser empleados en la detección de enterobacterias BLEEs presentes en dichas muestras de importancia clínica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- π Evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba cromogénica **β LACTA™ test**, la cual fue diseñada para la detección rápida de enterobacterias productoras de BLEEs directo en colonias, muestras de orina y hemocultivos obtenidos de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019.

5.2 Objetivos particulares

- π Ensayar la técnica estandarizada **β LACTA™ test** directo en colonias, orina y hemocultivos positivos para bacilos gram negativos.
- π Correlacionar los resultados obtenidos con **β LACTA™ test**, el microsistema BD Phoenix™ ID/AST y el método de referencia Disco combinado alusivos a la producción de BLEEs por enterobacterias.
- π Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba **β LACTA™ test** para la identificación de enterobacterias BLEEs.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de la población

Se realizó un estudio transversal, debido a que sólo se analizó una muestra por paciente, con una medición en un tiempo definido. De tal manera que se recolectaron en el laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, un mínimo 50 muestras provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios de dicha institución de tercer nivel, para cada una de las tres técnicas a ensayar con **β LACTA™ test**:

- π Directo en colonias aisladas de enterobacterias.
- π Orina positiva a bacilos Gram negativos (confirmados posteriormente como enterobacterias).
- π Hemocultivos positivos a bacilos Gram negativos (confirmados posteriormente como enterobacterias).

6.1.1 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- π **Colonias:** Colonias de enterobacterias aisladas en los medios de gelosa sangre de carnero o gelosa chocolate, provenientes de muestras de interés clínico.
- π **Orina:** Se realizará la lectura del sedimento en fresco y se preparará un frotis con el mismo, el cual será teñido con colorantes de Gram. Deberán observarse ≥ 6 leucocitos por campo y abundantes bacilos gram negativos, respectivamente.
- π **Hemocultivos:** Aquellos que sean detectados por el equipo *BD BACTEC™ FX*; los cuales serán confirmados mediante una de tinción de Gram con presencia de bacilos gram negativos.

Exclusión:

- π **Colonias:** Colonias aisladas en medios de cultivo que tengan colorantes y/o indicadores que puedan interferir con la interpretación del resultado obtenido con **β LACTA™ test**.
- π **Orina y hemocultivos:** Muestras positivas a bacilos Gram negativos que sean identificados como cepas no correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

6.2 Manejo de la información

Los datos obtenidos de la identificación de enterobacterias BLEEs mediante **β LACTA™ test**, Disco combinado y microsistema *Phoenix™ ID/AST*, se colocaron en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Office, 2013) y se procedió a realizar el análisis estadístico de forma manual para calcular la Sensibilidad, Especificidad y el índice de concordancia Kappa.

6.3 Análisis estadístico de los resultados

6.3.1 Definición de las variables

- π **Variable independiente:** Métodos fenotípicos para identificar enterobacterias productoras de BLEEs (**β LACTA™ test**, Disco combinado y *BD Phoenix™ ID/AST*).
- π **Variable dependiente:** Sensibilidad y especificidad obtenida por **β LACTA™ test**, al ser empleada en la identificación de enterobacterias BLEEs, con base en las cepas identificadas como productoras de BLEEs confirmadas, con la prueba de referencia recomendada por CLSI, Disco combinado y con *BD Phoenix™ ID/AST*.

6.3.2 Cálculo de la sensibilidad y especificidad ⁽⁷⁹⁾

		Producción de BLEEs (Disco combinado)	
		Positiva	Negativa
β LACTA™ test	+	Verdadero positivo a	Falso positivo b
	-	Falso negativo c	Verdadero negativo d
		a + c	b + d
		Sensibilidad = a / (a + c)	Especificidad = d / (b + d)

6.3.3 Cálculo del índice de concordancia kappa (k) ⁽²⁹⁾

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde:

$$P_o = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$$

$$P_e = \frac{[(a + b)(a + c)] + [(c + d)(b + d)]}{(a + b + c + d)^2}$$

6.4 Limitaciones del estudio

Las limitaciones más importantes del estudio son el número de muestras (orina y hemocultivos) positivas a enterobacterias, recibidas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019 y la cantidad de reactivo disponible **β LACTA™ test** para poder realizar el ensayo.

6.5 Uso de β LACTA™ test directo en colonias aisladas de enterobacterias

Se tomó un tubo de microcentrífuga de 0,5 mL y se añadió una gota de los reactivos R1 y R2 del kit colorimétrico β LACTA™ test. Posteriormente, se seleccionaron algunas colonias aisladas de enterobacterias, fenotípicamente iguales, las cuales fueron tomadas con un asa microbiológica estéril de 1 μ L, procurando que el anillo de ésta estuviera completamente lleno, y se procedió a colocar la muestra en el microtubo con la mezcla de reactivos preparada previamente. Se observó detenidamente el color de la mezcla final y el microtubo fue incubado a temperatura ambiente (18-30°C). La mezcla final se observó primero a los 15 minutos de incubación y posteriormente se observó de forma frecuente hasta que se completaron las 3 horas de dicho proceso; registrando el vire de la suspensión, en caso de que en algún momento se presentara. El resultado final fue interpretado de la siguiente manera: ningún cambio en el color inicial indica un resultado negativo, un cambio en el color inicial a rojo-violeta indica un resultado positivo y un cambio en el color inicial a naranja indica un resultado no interpretable (**Figura 11, Anexo 1**)

Para completar el análisis, el cultivo analizado fue caracterizado de la siguiente manera: se identificó género y especie mediante el sistema MALDI-TOF, género, especie y perfil de RAM mediante el microsistema *Phoenix™ ID/AST* y la confirmación de dicho perfil mediante el estándar de oro, *Disco combinado*.

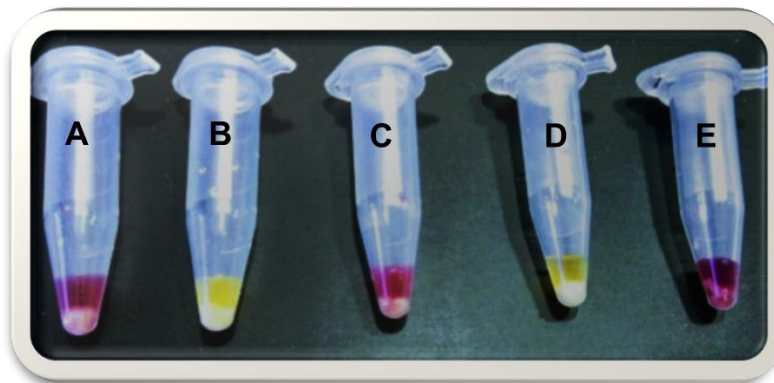


Figura 11. Resultados de β LACTA™ test en colonia directa. Los tubos A, C y E presentan un vire a rojo-violeta, lo cual indica una cepa BLEE (+). Mientras que B y D presentan una coloración amarilla (no hay vire) indica una cepa BLEE (-).

6.6 Uso de β LACTA™ test directo en muestras de orina

Se tomó 1,5 mL de orina seleccionada previamente por presentar sedimento activo (piuria y bacterias abundantes); además de Bacilos Gram Negativos (BGN) abundantes observados con tinción de Gram. Dicha muestra se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó por 5 minutos a 3000 xg (*Eppendorf microcentrifuge*), se descartó el sobrenadante y se adicionó al microtubo una gota de los reactivos R1 y R2 del kit colorimétrico β LACTA™ test. Se resuspendió el botón bacteriano y se observó detenidamente el color de la mezcla final. El microtubo fue incubado a temperatura ambiente (18-30°C). La mezcla final se observó primero a los 15 minutos de incubación y posteriormente se observó de forma frecuente hasta que se completaron las 3 horas de dicho proceso; registrando el vire de la suspensión, en caso de que en algún momento se presentara. El resultado final fue interpretado de la siguiente manera: ningún cambio en el color inicial indica un resultado negativo, un cambio en el color inicial a rojo-violeta indica un resultado positivo y un cambio en el color inicial a naranja indica un resultado no interpretable (**Figura 12, Anexo 2 y 4**)

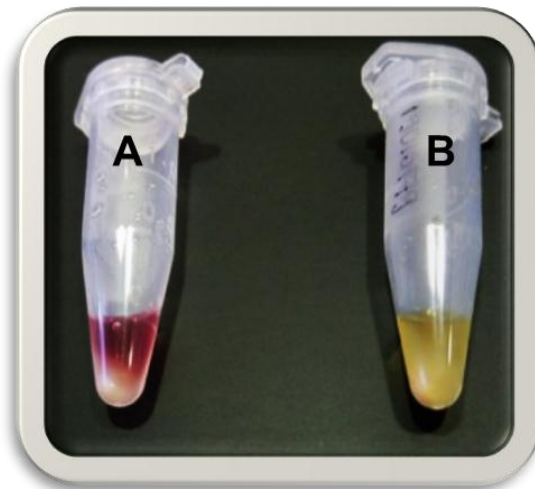


Figura 12. Resultados de β LACTA™ test en sedimento urinario. El tubo A presenta un vire a rojo-violeta, lo cual indica una cepa BLEE (+). Mientras que el tubo B presenta una coloración amarilla (no hay vire) indicando una cepa BLEE (-).

Para finalizar, se procedió a realizar el aislamiento de la enterobacteria respectiva presente en la orina sembrando la muestra en los medios de gelosa sangre y Mac Conkey con asa calibrada de 10 μ L. Se incubó 18-24 horas en atmósfera aeróbica y se trabajó únicamente si el cultivo presentó desarrollo de $\geq 10^5$ UFC/mL (Urocultivo positivo con base en los criterios de Kass), realizando la detección de género y especie; además, del perfil de RAM mediante el microsistema *Phoenix™ ID/AST* y la confirmación de dicho perfil mediante el estándar de oro, *Disco combinado*.

6.7 Uso de β LACTA™ test directo en hemocultivos

Se tomó 1,5 mL de hemocultivo positivo detectado mediante el equipo *BD BACTEC™ FX. Blood Culture System* (BD-Becton Dickinson, USA) y confirmado mediante una tinción de Gram con presencia de bacilos Gram negativos. Dicha muestra se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se centrifugó 1 minuto a 1700 xg (*Eppendorf microcentrifuge*), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de solución recién preparada de Tritón X-100: Agua bidestilada estéril (3 μ L:1000 μ L). Posteriormente, se agitó en vortex durante 15 s y se centrifugó 1 min a 13000 xg (*Eppendorf microcentrifuge*). Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1 mL de agua bidestilada estéril; centrifugando, entre cada uno, 1 minuto a 13000 xg (*Eppendorf microcentrifuge*). Después de finalizar el segundo lavado, se descartó el sobrenadante y se adicionó al microtubo una gota de los reactivos R1 y R2 del kit colorimétrico β LACTA™ test. Se observó detenidamente el color de la mezcla final. El microtubo fue incubado a temperatura ambiente (18-30°C). La mezcla final se observó primero a los 15 minutos de incubación y posteriormente se observó de forma frecuente hasta que se completaron las 3 horas de dicho proceso; registrando el vire de la suspensión, en caso de que en algún momento se presentara. El resultado final fue interpretado de la siguiente manera: ningún cambio en el color inicial indica un resultado negativo, un cambio en el color inicial a rojo-violeta indica un resultado positivo y un cambio en el color inicial a naranja indica un resultado no interpretable (**Figura 13, Anexo 3 y 4**)

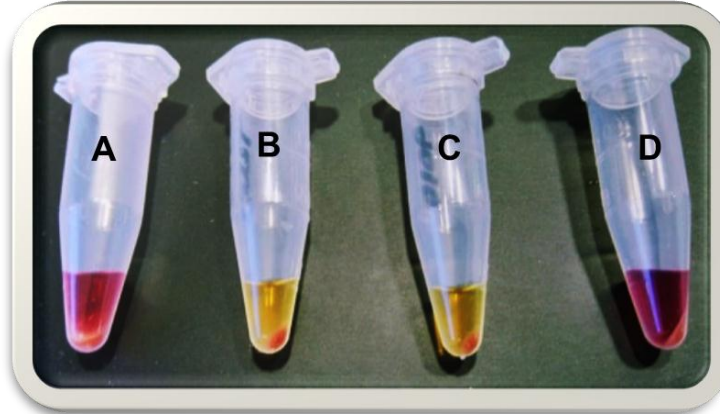


Figura 13. Resultados de β LACTA™ test en muestras de hemocultivo. Los tubos A, y D presentan un vire a rojo-violeta, lo cual indica una cepa BLEE (+). Mientras que B y C presentan una coloración amarilla (no hay vire) indica una cepa BLEE (-).

Para concluir, se procedió a realizar el aislamiento de la enterobacteria respectiva presente en el hemocultivo utilizando los medios de gelosa sangre, gelosa chocolate y Mac Conkey. Se realizó la detección del género y especie mediante el sistema MALDI-TOF. Se analizó género, especie y perfil de RAM mediante el microsistema *Phoenix™ ID/AST* y la confirmación de dicho perfil mediante el estándar de oro, *Disco combinado*.

6.8 Identificación de microorganismos patógenos y su perfil de susceptibilidad a antibióticos marcadores de posible producción de BLEEs a través del sistema de microbiología automatizado *BD Phoenix™ ID/AST* (BD Diagnostics, Sparks, MD, EE. UU.)

Se vertió la suspensión bacteriana en los paneles e ingresar al equipo, siguiendo la metodología proporcionada por el fabricante ^(6,58). Si el equipo detectó a una enterobacteria posible productora de BLEEs, se procedió a realizar el ensayo de susceptibilidad *in vitro* de Disco combinado para confirmar la producción de BLEE de la enterobacteria en estudio (**Figura 14**).

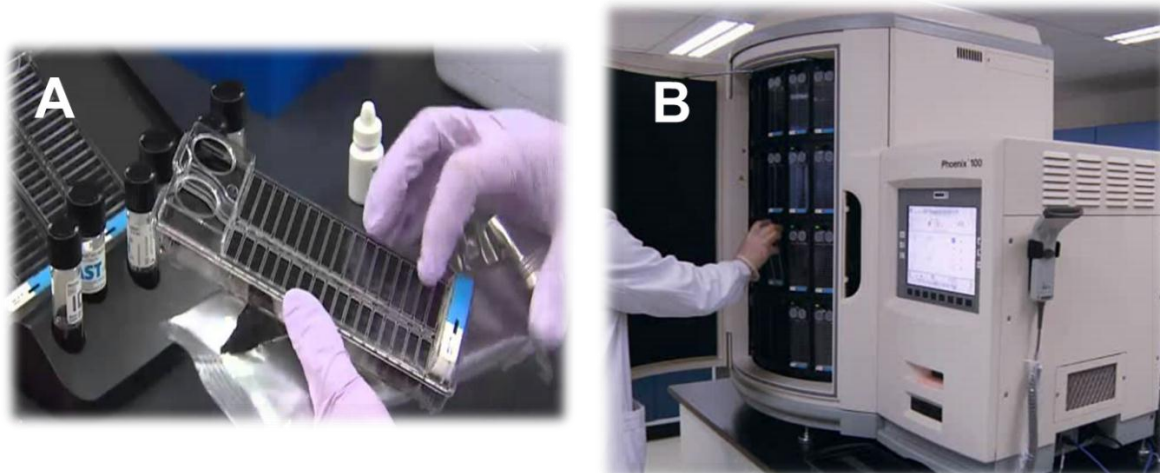


Figura 14. Sistema de microbiología automatizado *BD Phoenix™ ID/AST*. A) Vertido de suspensión bacteriana en los paneles para realizar la identificación y obtener la susceptibilidad de la cepa ensayada. B) Ingreso del panel preparado en el inciso A, al equipo *BD Phoenix™ ID/AST*. (Tomada de BD. *BD Phoenix™ ID/AST Manual Panel Inoculation*. Recuperado en octubre 27, 2018 en <https://goo.gl/mmqoww>)

6.9 Prueba confirmatoria BLEEs-CLSI/*Disco Combinado* (método americano)

Se sembraron las placas de Mueller Hinton con la cepa problema siguiendo las recomendaciones del CLSI ^(15,23) y se leyó el diámetro de los halos de inhibición. Una diferencia ≥ 5 mm en los halos de inhibición entre los discos de CAZ y CAZ-CLA o CTX y CTX-CLA fue interpretada como cepa productora de BLEEs ⁽³⁸⁾ (**Figura 7**).

7. RESULTADOS

7.1 β LACTA™ test directo en colonias aisladas de enterobacterias

Debido a que se analizaron solamente las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión, se ensayaron únicamente 50 colonias de enterobacterias aisladas de muestras de interés clínico (urocultivos, secreciones de herida, abscesos, hemocultivos, aspirados bronquiales, lavados bronquioalveolares y biopsias) provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019 recibidas en el laboratorio de Microbiología Clínica como parte del trabajo de asistencia, en las cuales predominaron los siguientes géneros: *E. coli* 36% (18/50), *K. pneumoniae* 20% (10/50), *Serratia marcescens* 14% (7/50) y *Enterobacter cloacae* 14% (7/50) y en menor predominio, se ensayaron algunas cepas de *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, las cuales corresponden al 16% (8/50) de las cepas evaluadas.

De las 50 cepas en estudio, el 40% (20/50) mostró un resultado positivo (**Tabla 4**) al ser ensayadas con la prueba colorimétrica β LACTA™ test, mientras que, el 2% (1/50) dio como resultado *no interpretable*. Dicho resultado no se incluyó para determinar la sensibilidad y especificidad del método, tal como se observa en el análisis realizado por algunos autores ^(1,8,26,78); quienes también hacen mención de la obtención de un resultado menor o igual al 2% de cepas no interpretables utilizando la técnica colorimétrica.

Enterobacteria evaluada	N° de cepas n (%)	Disco combinado (DC)				BD Phoenix™ ID/AST (BDP)				β LACTA™ test (BTL)			
		Estándar de oro		Muestras ensayadas		Muestras ensayadas		BDP vs DC		Muestras ensayadas		BTL vs DC	
		Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)
<i>Escherichia coli</i>	18 (36)	3 (10)	3 (10)	15 (75)	3 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (75)	3 (10)	0 (0)	0 (0)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 (20)	5 (17)	5 (17)	5 (25)	5 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (25)	5 (17)	0 (0)	0 (0)	
<i>Serratia marcescens</i>	7 (14)	7 (23)	7 (23)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	0 (0)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	7 (14)	7 (23)	7 (23)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (23)	0 (0)	0 (0)	
Otras*	8 (16)	8 (27)	8 (27)	0 (0)	8 (27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (27)	0 (0)	0 (0)	
Total = N (%)	50 (100)	30 (60)	30 (60)	20 (40)	30 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (40)	30 (60)	0 (0)	0 (0)	
β LACTA™ test directo en colonias Sensibilidad = 100% Especificidad = 100%													
Otras*: <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> . Total**: Se estudiaron 51 cepas, sin embargo, una de ellas obtuvo resultado no interpretable , por tal motivo, no se incluyó en el análisis.													

7.2 β LACTA™ test directo en muestras de orina

Debido a que se analizaron solamente las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión, se ensayaron en total 51 cepas de enterobacterias en muestras de orina provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019 recibidas en el laboratorio de Microbiología Clínica como parte del trabajo de asistencia, en las cuales predominaron los siguientes géneros de enterobacterias: *E. coli* 72% (37/51), *K. pneumoniae* 18% (9/51). Dicho predominio coincide con el que reporta la literatura ^(1,9,10,26,28,49,62,70), debido a que estos microorganismos son los que se aíslan con mayor frecuencia como agentes patógenos causantes de infecciones del tracto urinario (ITU); además, se hace mención que, en algunos casos, es posible aislar a *Proteus sp*, así como lo fue en este, debido a que se realizó el aislamiento de una cepa de *Proteus mirabilis*, la cual representa el 2% (1/51) del total de las cepas ensayadas; mientras que el 8% (4/51) restante está conformado por algunas cepas de *E. cloacae*, *Morganella morganii* y *Providencia alcaligenes*.

De las 51 cepas en estudio, el 45% (23/51) mostró un resultado positivo (**Tabla 5**) al ser ensayadas con la prueba colorimétrica β LACTA™ test, mientras que, al igual que en el caso anterior, donde se ensaya la prueba directo sobre colonias; el 2% (1/51) dio como resultado *no interpretable*. Dicho resultado no se incluyó para determinar la sensibilidad y especificidad del método, tal como se observa en el análisis realizado por algunos autores ^(1,7,26,78); quienes también hacen mención de la obtención de un resultado menor o igual al 2% de cepas no interpretables utilizando la técnica colorimétrica directamente en sedimento urinario.

Tabla 5. Resultados de la detección de enterobacterias productoras de BLEEs directo en orina mediante β LACTA™ test, además de la confirmación con Disco Combinado y el micro sistema BD Phoenix™ ID/AST.

Enterobacteria evaluada	N° de cepas n (%)	Disco combinado (DC)				BD Phoenix™ ID/AST (BDP)				β LACTA™ test (BTL)				
		Estándar de oro		Muestras ensayadas		Muestras ensayadas		Muestras ensayadas		BTL vs DC		BTL vs DC		
		Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	
<i>Escherichia coli</i>	37 (72)	17 (61)	20 (87)	17 (61)	20 (87)	20 (87)	17 (61)	20 (87)	20 (87)	17 (61)	20 (87)	17 (61)	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 (18)	7 (25)	2 (9)	7 (25)	2 (9)	2 (9)	7 (25)	2 (9)	2 (9)	7 (25)	2 (9)	7 (25)	0 (0)	0 (0)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (2)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Otras*	4 (8)	4 (14)	0 (0)	4 (14)	0 (0)	4 (14)	4 (14)	0 (0)	0 (0)	4 (14)	0 (0)	4 (14)	0 (0)	0 (0)
Total** = N (%)	51 (100)	28 (55)	23 (45)	28 (55)	23 (45)	23 (45)	28 (55)	23 (45)	23 (45)	28 (55)	23 (45)	28 (55)	0 (0)	0 (0)

β LACTA™ test directo en orina
Sensibilidad = 100%
Especificidad = 100%

Otras*: *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Providencia alcaligenes*.

Total**: Se estudiaron 52 cepas, sin embargo, una de ellas obtuvo resultado **no interpretable**, por tal motivo, no se incluyó en el análisis.

7.3 β LACTA™ test directo en hemocultivos

Debido a que se analizaron solamente las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión, se ensayaron en total 54 cepas de enterobacterias presentes en hemocultivos provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019 recibidos en el laboratorio de Microbiología Clínica como parte del trabajo de asistencia, en las cuales predominó el aislamiento de los siguientes géneros de enterobacterias: *E. coli* 42% (23/54), *K. pneumoniae* 26%(14/54), *K. oxytoca* 9% (5/54), *S. marcescens* 6% (3/54) y *Salmonella choleraesuis* 6% (3/54). Dicho predominio coincide con el que reporta la literatura ^(78,25), siendo estos microorganismos los que se aíslan con mayor frecuencia como agentes patógenos causantes de sepsis; juntamente con un aislamiento en menor proporción, del 11% (6/54), compuesto por algunas cepas de *C. braakii*, *Enterobacter asburiae*, *E. cloacae* y *S. enterica*.

De las 54 cepas en estudio, el 48% (26/54) mostró un resultado positivo (**Tabla 6**) al ser ensayadas con la prueba colorimétrica β LACTA™ test, mientras que, a diferencia de los ensayos anteriores: directos sobre colonia y sedimento urinario, no se obtuvieron resultados *no interpretables*.

Tabla 6. Resultados de la detección de enterobacterias productoras de BLEEs directo en hemocultivo mediante β LACTA™ test, además de la confirmación con Disco Combinado y el micro sistema BD Phoenix TM ID/AST.													
Enterobacteria evaluada	N° de cepas n (%)	Disco combinado (DC)				BD Phoenix™ ID/AST (BDP)				β LACTA™ test (BTL)			
		Estándar de oro		Muestras ensayadas		Muestras ensayadas		Muestras ensayadas		BTL vs DC		BTL vs DC	
		Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Cepas BLEEs + n (%)	Cepas BLEEs - n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)	Falsos positivos n (%)	Falsos negativos n (%)
<i>Escherichia coli</i>	23 (42)	14 (54)	9 (32)	14 (54)	9 (32)	0 (0)	0 (0)	14 (54)	9 (32)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14 (26)	11 (42)	3 (11)	11 (42)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	11 (42)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5 (9)	1 (4)	4 (14)	1 (4)	4 (14)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	4 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Serratia marcescens</i>	3 (6)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	3 (6)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Otras*	6 (11)	0 (0)	6 (21)	0 (0)	6 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total = N (%)	54 (100)	26 (48)	28 (52)	26 (48)	28 (52)	0 (0)	0 (0)	26 (48)	28 (52)	0 (0)	0 (0)	26 (48)	28 (52)
β LACTA™ test directo en hemocultivos Sensibilidad = 100% Especificidad = 100%													
Otras*: <i>Citrobacter braakii</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Salmonella enterica</i> .													

8. DISCUSIÓN

8.1 Comparación general de los resultados obtenidos por β LACTA™ test, BD Phoenix™ ID/AST y Disco combinado

En el presente trabajo se analizaron un total de 155 cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* conformadas por 14 géneros distintos, donde se logró confirmar la producción de BLEEs en 45% (69/155) de las cepas, mientras que en el 55% (86/155) de las cepas restantes, no se encontró evidencia de producción de BLEEs. Para poder dimensionar la magnitud de estos resultados, se realizó la comparación con los obtenidos en el 2009 por Mena y col.⁽⁴²⁾ y se puede observar que los valores referentes a la producción de BLEEs por parte de las enterobacterias estudiadas, un 25% resultaron ser positivas, lo cual demuestra que la prevalencia de enterobacterias BLEEs, 10 años después, prácticamente se ha duplicado.

Para la detección de BLEEs en todas las enterobacterias se emplearon diferentes métodos, favoreciendo el aumento de la sensibilidad (probabilidad de que un enfermo sea identificado correctamente por la prueba, es decir, que tenga una prueba positiva. Son los enfermos con prueba positiva de entre todos los enfermos⁽²⁹⁾) y especificidad (probabilidad de que un individuo sin la enfermedad sea identificado correctamente por la prueba, es decir, que tenga una prueba negativa. Son los sanos con prueba negativa de entre todos los sanos⁽²⁹⁾), resultando de gran utilidad debido a que determinadas cepas BLEEs positivas pueden parecer sensibles *in vitro* a los betalactámicos, siendo en realidad resistente; debido a que pueden existir diferencias cuantitativas en la actividad hidrolítica de determinadas cepas BLEEs sobre los sustratos⁽⁴²⁾, sobre todo para *E. coli* y *K. pneumoniae*; de igual manera, ciertas β -lactamasas pueden no detectarse si el inóculo es muy elevado y/o si la producción de la misma se asocia con otro mecanismo de resistencia como la hiperproducción de cefalosporinasa de Bush tipo 1 (no es inhibida por CLA) o una disminución de la permeabilidad membranal al paso del antibiótico^(42,68,75).

Al analizar los resultados obtenidos en la identificación de β -lactamasas de Espectro Extendido en cepas de enterobacterias aisladas de muestras provenientes única y

exclusivamente de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” mediante las pruebas fenotípicas de sensibilidad *in vitro* **β LACTA™ test** (BLT) y *BD Phoenix™ ID/AST*; y estas, al ser comparados con el estándar de oro recomendado por CLSI, Disco combinado (**Tablas 4, 5 y 6**), se evidenció que el test colorimétrico no mostró diferencias significativas al ser probado en la identificación de enterobacterias BLEEs directo en colonias y en sedimentos bacterianos obtenidos de orina o hemocultivos con al menos una cepa de enterobacteria presente, debido a que cada uno obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%.

Respecto al uso de BLT directo en colonias, el fabricante ⁽⁸⁾ reporta una sensibilidad y especificidad de 80,2% y 97,9%, respectivamente, mientras que Renvoisé, A. y col. ⁽⁶³⁾ en su estudio realizado a finales de 2013 reportan una sensibilidad de 87,7% y especificidad de 99,6%; adicionalmente, es importante mencionar que éste último estudio confirmó el perfil de resistencia de sus cepas ensayadas con técnicas moleculares.

Por otro lado, los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad con BLT al ser ensayado sobre sedimentos provenientes de muestras de orina son de 100% cada una, y dichos valores coinciden con los reportados el estudio realizado en Paris, en 2014 por Gallah, S. y col. ⁽²⁶⁾, donde es importante mencionar que, la técnica fue realizada de la misma manera que se realizaron los ensayos en la presente tesis, sin embargo, siguiendo el mismo procedimiento, Amzalag, J. y col. ⁽¹⁾ determinaron en su estudio que BLT posee una sensibilidad y una especificidad de 81% y 95,7%. Adicionalmente, Waleski, V. y col. ⁽⁷⁸⁾, en su estudio realizado en Paris, 2015; reportan que BLT empleado en la detección de enterobacterias BLEEs en sedimentos bacterianos provenientes de hemocultivos posee una sensibilidad y especificidad de 95,7% y 100% respectivamente, por otro lado, un estudio francés realizado en 2018 por Mizrahi, A. y col. ⁽⁴⁵⁾ reportó una sensibilidad de 89,7% y especificidad de 97,6%, mientras que, los resultados que se presentan en este estudio muestran valores de 100%, en sensibilidad y especificidad.

Debido a que el resultado obtenido en el presente estudio es estadísticamente inconsistente, puesto que BLT obtuvo un 100% en sensibilidad y especificidad; además, de presentar un valor igual a 1 en el índice de concordancia Kappa (el cual representa la proporción de acuerdos observados más allá del azar respecto del máximo acuerdo posible más allá del azar ⁽²⁹⁾), significaría que la prueba BTL con base en los resultados mostrados por las cepas ensayadas, sería una prueba estadísticamente perfecta, es decir, que nunca cometería error alguno. Por tal motivo, se realizó el cálculo teórico del tamaño de muestra (**Anexo 5**) que debe evaluarse con la prueba colorimétrica, determinando que se requieren mínimo 369 muestras para cada uno de los tres estudios realizados (directo en colonias, sedimentos de orina y sedimento de hemocultivos) para poder representar un resultado que sea estadísticamente significativo y, el realizar la evaluación de este número de muestras, únicamente con cepas provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, requeriría extender, aproximadamente, al menos un año la investigación. Sin embargo, aún con los valores obtenidos en este estudio, se pone en evidencia, por un lado, que la prueba rápida **β LACTA™ test** es valiosa por el ahorro de tiempo de diagnóstico, lo cual se traduce en ahorro en tratamiento, debido a que este al ser seleccionado adecuadamente, es más efectivo. Mientras que, por otro lado, BLT es candidata para emplearse en la detección rápida de enterobacterias productoras de BLEEs directo en colonias aisladas en los medios agar gelosa sangre o agar gelosa chocolate; asimismo, puede emplearse directo del sedimento urinario indicativo de ITU causadas por enterobacterias aisladas con alta frecuencia (*E. coli* y *K. pneumoniae*) y baja frecuencia (*E. cloacae*, *M. morganii*, *P. alcaligenes*) y directo del sedimento bacteriano obtenido del hemocultivo correspondiente a un paciente que cursa por una bacteriemia originada por enterobacterias aisladas con alta frecuencia (*E. coli* y *Klebsiella sp*, *S. marcescens* y *Salmonella sp*) y baja frecuencia (*C. braakii*, *E. asburiae*, *E. cloacae*, *S. enterica*); sin embargo, aún es necesario ensayar un número mayor de muestras con dicha prueba colorimétrica para obtener un valor estadísticamente significativo que refleje realmente la sensibilidad y especificidad de la prueba.

8.2 Determinación fenotípica de los tipos de enzimas producida por las cepas ensayadas

En los resultados obtenidos mediante la prueba de *Disco Combinado* se observó, en la mayoría de los casos, una diferencia mayor entre el diámetro ($17 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$) de los halos de inhibición de CTX y CTX-CLA que entre el diámetro ($11 \text{ mm} \pm 4 \text{ mm}$) de los halos de inhibición de CAZ y CAZ-CLA. Dichos resultados demuestran que las enterobacterias BLEEs ensayadas, producen tanto cefotaximasas (CTX-M) como ceftazidimasas (TEM, SHV), sin embargo, al observar una diferencia mayor entre los halos de inhibición de CTX y CTX-CLA, se puede afirmar que las cepas ensayadas expresan mayor producción de cefotaximasas, que de ceftazidimasas, lo cual concuerda con lo que se describe en la literatura ^(22,26,33,78).

Por otro lado, diversos estudios ^(22,26,33,73,78) demuestran que *K. pneumoniae* y *E. coli* son las enterobacterias productoras de BLEEs por excelencia, con 56 y 84,9% de cepas BLEEs, respectivamente. Este resultado puede atribuirse al hecho de que estos géneros forman parte de la microbiota, sobreviven durante un tiempo sobre la piel, fomites y adquieren con cierta facilidad plásmidos conjugativos ⁽⁴²⁾. No obstante, en los estudios realizados por Mena y col., Mizrahi y col. y Amzalag y col. ^(1,42,45), se han encontrado altos porcentajes de producción de BLEEs en *Enterobacter sp* (25%), *Proteus mirabilis* (6%) y *K. oxytoca* (4%); además de *E. coli* y *K. pneumoniae*, por lo que es importante incorporar otras enterobacterias en el estudio de producción de BLEEs.

9. CONCLUSIONES

- π Se detectó de forma rápida enterobacterias productoras de BLEEs directo en colonias, sedimentos de muestras de orina y hemocultivos provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Instituto nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019 mediante el uso de la prueba cromogénica **β LACTA™ test**.
- π La prueba colorimétrica **β LACTA™ test** obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100 % al ser probada directo en colonias y sedimentos bacterianos obtenido de muestras de orina y hemocultivos, lo cual demuestra que dicha prueba es candidata a para emplearse en la detección de enterobacterias productoras de β-lactamasas de Espectro Extendido.
- π Se determinó que se requiere de un tamaño de muestra mayor para tener un resultado REAL (alta exactitud) y reproducible (alta precisión) utilizando la prueba **β LACTA™ test** para la detección de enterobacterias BLEEs.
- π Se determinó que la identificación de enterobacterias productoras de β-lactamasas de Espectro Extendido utilizando la prueba cromogénica **β LACTA™ test**, debido a su fácil uso y a que no requiere equipos especiales; es candidata para emplearse en instituciones de primer y segundo nivel de atención médica.

10. PERSPECTIVAS

Hasta hace poco, se consideraba que los microorganismos productores de BLEEs causantes de infecciones eran un problema que se daba preferentemente en los nosocomios; sin embargo, algunos estudios como el de Mena y col. ⁽⁴²⁾ demuestran que una buena parte (18%) de los microorganismos BLEEs positivos fueron aislados de pacientes ambulatorios; lo cual está posiblemente ligado a que este grupo de bacterias frecuentemente producen infecciones y están ampliamente distribuidas en la población, facilitando los procesos de intercambio de material genético y recombinaciones. No obstante, existen casos que confirman la disminución de brotes nosocomiales debido al implemento de medidas de control y prevención, tales como el aislamiento, asepsia y lavado de manos, aliados con una terapia enfocada a erradicar la cepa resistente basada en el uso racional de los antibióticos; aun así, es necesario el monitoreo constante de los perfiles fenotípicos observados en el laboratorio, adicional al control permanente del uso de antimicrobianos. Estas conductas deben ser potenciadas por la presencia de programas de vigilancia de la resistencia tanto a nivel nacional como local y de aproximaciones multidisciplinarias para una terapia adecuada ⁽⁴²⁾.

Por otra parte, el uso indiscriminado de los antibióticos en el hombre ha transformado a la resistencia antimicrobiana en un problema creciente, que involucra cada día un mayor número de cepas; nuevas especies y nuevos mecanismos, por lo que el estudio del comportamiento de las bacterias frente a los antimicrobianos in vitro, se hace hoy cada vez más importante ya que no se tiene capacidad de predecir la respuesta que ellas pudieran presentar frente al antimicrobiano que se desea prescribir para la antibioticoterapia ^(42,65).

En consecuencia, es importante implementar pruebas sencillas en el laboratorio de microbiología que permitan predicciones de RAM, con el objetivo de disminuir costos, hacer un uso racional de recursos y brindar un mejor control de calidad en el laboratorio de microbiología ^(17,76). Ejemplo de esto es **β LACTA™ test** combinado con MALDI-TOF en hemocultivos recién detectados, los cuales permitirían obtener género, especie y perfil de resistencia sin necesidad de utilizar medios de cultivo.

Actualmente hay kits comerciales como *Sepsityper specimen processing* (Bruker Daltonics, Billerica, MA), el cual permite la detección de género y especie de microorganismos presentes en hemocultivos detectados como positivos por algún sistema automatizado como *BD BACTEC™ FX*. Recientemente se han realizado algunos estudios ⁽⁴⁵⁾ con la finalidad de evaluar a esta mancuerna de métodos fenotípicos, a pesar de ello, los autores afirman que el análisis debe realizarse sobre una población con mayor prevalencia de BLEEs para poder obtener un resultado más significativo. Conociendo lo anterior, todo apunta a que este es el inicio de la nueva era del diagnóstico microbiológico sin necesidad de cultivar al microorganismo etiológico.

No obstante, es necesario tener a un profesional calificado al frente del área para realizar la interpretación de resultados obtenidos por los microsistemas y las pruebas rápidas; igualmente, realizar el análisis que ayude a determinar de forma correcta cual es la técnica más adecuada según el presupuesto con el que dispone su laboratorio, sin perder de vista la calidad, eficacia, seguridad y rapidez del proceso de la muestra y la emisión del resultado.

Adicionalmente, se requiere evaluar un número mayor de cepas con la prueba **β LACTA™ test**, debido a que esto permitirá obtener un valor estadísticamente significativo y real de sensibilidad y especificidad; asimismo, utilizar como estándar de oro métodos moleculares que permitan confirmar, de forma exacta y precisa la presencia de genes de resistencia en las cepas ensayadas.

Para concluir, es importante determinar mediante métodos moleculares, la razón por la cual existen cepas que presentan resultados “no interpretables” al ser ensayadas con la prueba **β LACTA™ test**, debido a que esto podría ser indicio de baja afinidad por el sustrato por una posible modificación estructural en la enzima, lo cual podría atribuirse a una mutación en las β-lactamasas, generando, de esta manera, una nueva rama de estudio para dichas enzimas.

11. REFERENCIAS

1. Amzalag, J.; Mizrahi, A.; Naouri, D. *et al.* (2016). Optimization of the B LACTA test for the detection of extended-spectrum-b-lactamase-producing bacteria directly in urine samples. *Infect Dis.* **48**(9):695–698.
2. Andes, D. y Craig, W. (2009). *Cephalosporins. Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7a ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER. 323-339.
3. Andrade, V.; Sánchez, D.; Sánchez, R. *et al.* (2004). Frecuencia de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEES causantes de infecciones nosocomiales en pacientes pediátricos. *Enf Infec y Micro.* **24**(1):33-45.
4. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M. *et al.* (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* **11**(1):1645-1658.
5. Banzhaf, M.; Terrak, M.; Fraipont, C. *et al.* (2012). Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol.* **85**(1):179-194.
6. BD. BD Phoenix™ ID/AST Manual Panel Inoculation. (2015). Recuperado en octubre 27, 2018 a las 17:25 horas en <https://goo.gl/mmqoww>
7. Bennett, J.; Dolinm R.; Martin J. (2006). Mandel, Douglas y Bennett. *Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica.* 6a ed. Madrid: Elsevier Churchill Livingstone. 409-458.
8. BIORAD. Inserto β LACTA™ test. Marnes-la-Coquette France. (2014). Recuperado en marzo 14, 2019 a las 19:32 horas en <https://bit.ly/2Z98AjQ>
9. Bradford, P. (2001). Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* **14**(4):933–951.
10. Cano, M.; Domínguez, M.; Baquedano, C. *et al.* (2008). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enf Infec Microbiol Clin.* **26**(4):220-229.
11. Cantón, R.; Oliver, A.; Coguen, TM. *et al.* (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol.* **40**(4):1237-1243.

12. Cantón, R.; Valdezate, S.; Mir, N. (1999). Resistencia a los antimicrobianos. Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Science. 41-47.
13. Chambers, H. (2009). Penicillins and B-lactam Inhibitors Principles and Practice of Infectious Diseases. 7a ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER. 309-322.
14. Chambers, H. (2009). Carbapenems and Monobactams. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7a ed. Philadelphia: Churchill, Livingstone-ELSEVIER. 341-345.
15. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th Informational Supplement. CLSI document M100. Wayne, Pennsylvania: Clinical and laboratory Standards Institute, 2018.
16. Cosgrove, S. (2006). The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. Clin Infect Dis. **42**(2):582-589.
17. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. (DOF). ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. (2018). Recuperado en febrero 25, 2019 a las 19:32 horas en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018
18. Dirección General de Epidemiología. (2014). Informe Anual RHOVE 2014. México: Secretaría de Salud. Recuperado en agosto 01, 2019 a las 17:28 horas en <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2014>
19. Drawz, S.; Papp-Wallace, KM.; Bonomo, RA. (2014). New b-lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world. Antimicrob Agents Chemother. **54**(4):1835-1846.
20. Echeverri, T.; Atehortúa, S.; Robledo, J. (2008). *K. pneumoniae* y betalactamasas. Un problema creciente. MEDICINA UPB. **28**(2):135-141.

21. Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C. *et al.* (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*. **24**(1):252-261.
22. Fariñas, M. y Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **31**(1):402–409.
23. Ferreira, L.; Sánchez-Juanes, F.; Muñoz-Bellido, JL. *et al.* (2011). Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect*. **17**(7):1007-1012.
24. Frickmann, H.; Masanta, W.; Zautner, A. (2014). Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. *BioMed Res Int*. **37**(1):56-81.
25. Fundación de enfermería de Cantabria. Revisión del Protocolo de Extracción de Hemocultivos en el Hospital Comarcal Sierrallana. Periodo 2009/10. (2010). Recuperado en marzo 14, 2019 a las 21:40 horas en: <https://bit.ly/2UZiFAw>
26. Gallah, S.; Decré, D.; Genel, N. *et al.* (2014). The B-Lacta Test for Direct Detection of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Urine. *J Clin Microbiol*. **52**(10):3792–3794.
27. García-Hernández, A.; García-Vázquez, E.; Hernández-Torres, A. *et al.* (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*. **24**(2): 57-66.
28. Giske, C.; Sundsfjord, A.; Kahlmeter, G. *et al.* (2009). Redefining extended-spectrum B-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother*. **63**(1):1–18.
29. Gómez, C. y Pérez, J. (2007). Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. *SEMERGEN*. **33**(10):509-519.

30. Gutiérrez, J.; Ramírez, A.; Martínez, B. *et al.* (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Rev Latin Infect Pediatr.* **30**(2):68-75.
31. Hanaki, H.; Koide, Y.; Yamazaki, H. *et al.* (2007). Substrate specificity of HMRZ-86 for β -lactamases, including extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *J Infect Chemother.* **13**(6):390–395.
32. Hanaki, H.; Kubo, R.; Nakano, T. *et al.* (2004). Characterization of HMRZ-86: a novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* **53**(5):888–889.
33. Horcajada, J. y Fariñas, M. (2005). Involvement of bacterial resistances in community-acquired urinary infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **23**(1):1-3.
34. Informe Anual RHOVE 2014. México: Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. (2014). Recuperado en marzo 8, 2019 a las 09:35 horas en www.epidemiologia.salud.gob.mx
35. Kawashima, S.; Hiramatsu, K.; Hanaki, H. *et al.* (2002). Cephem compounds and ESBL-detecting reagents containing the same. International Patent Information Number WO02/24707 A1.
36. Kumar, A.; Roberts, D.; Wood, K. *et al.* (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* **34**(6):1589-1596.
37. Lance R, Peterson. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. *Clin Infect Dis.* **49**(6):992–993
38. Lezameta, L.; Gonzáles-Escalante, E.; Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* **27**(3):345-351.
39. López-Herrera, J.; Méndez-Cano, A.; Bobadilla-Espinosa, R. *et al.* (2012). Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc.* **20**(2):85-90.

40. Marrero-Moreno, C.; Mora-Llanes, M.; Hernández-Fillor, R. *et al.* (2017). Identificación de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Rev Salud Anim.* **39**(3):428-435.
41. Martínez, P.; Espinal, P.; Bustos, A. *et al.* (2005). Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el hospital de San Jerónimo de Monterí. *MedUNAB.* **8**(1):15-22.
42. Mena, P. y Castellano, M. (2009). Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera.* **37**(1):25-37.
43. Mezzatesta, L.; Gona, F.; Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **7**(7):887-902.
44. Mirellis, B.; Navarro, F.; Miró, E. *et al.* (2003). Community transmisión of extended-spectrum-B-lactamase. *Emerg Infect Dis.* **9**(8):1024-1025.
45. Mirzahi, A.; Amzalag, J.; Couzigou, C. *et al.* (2018). Clinical impact of rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS combined with the bêta-LACTA™ test on early antibiotic adaptation by an antimicrobial stewardship team in bloodstream infections. *Infect Dis (Lond).* **50**(9):668-677.
46. Navarro-Navarro, M.; Robles-Zepeda, E.; Garibay-Escobar, A. *et al.* (2011). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* comunitarias y hospitalarias productoras de β -lactamasas en hospitales de Hermosillo, Sonora. *Salud Públ Mex.* **53**(4):341-344
47. Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. (2005). Recuperado en agosto 01, 2019 a las 17:20 horas en <http://iner.salud.gob.mx/descargas/normatecainterna/MJnormasmexicanas/NOM-045-SSA2-2005.pdf>
48. O'Callaghan, C.; Morris, A.; Kirby, SM. *et al.* (1972). Novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother.* **1**(4):283–288.

49. Oliver, A. y Cantón, R. (2003). Enterobacterias productoras de β -Lactamasas plasmídicas de espectro extendido. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Recuperado en marzo 12, 2019 a las 16:50 horas en <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
50. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). Prevención de las infecciones nosocomiales: guía práctica. 4-7. Recuperado en julio 30 de 2019 a las 18:40 horas en: https://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf
51. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Comunicado de prensa. Recuperado en agosto 03, 2019 en a las 18:40 horas en <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
52. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Recuperado en febrero 27, 2019 a las 19:25 horas en <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
53. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Plan de Acción Mundial Sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Recuperado en febrero 25, 2019 a las 19:30 horas en <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>
54. Paterson, D. y Bonomo, R. (2005). Extended-Spectrum B-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev.* **18**(4):657-686.
55. Pérez, F.; Endimiani, A.; Hujer, KM. *et al.* (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacolog.* **7**(5):459-469.

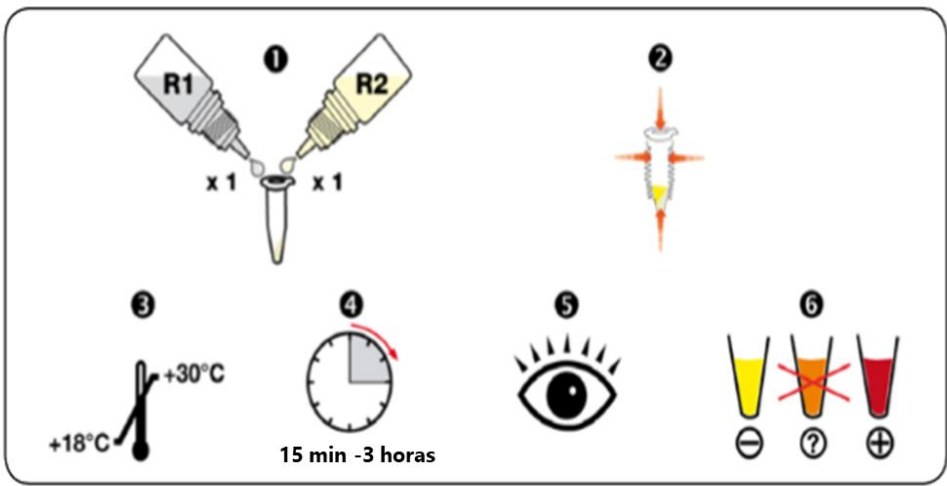
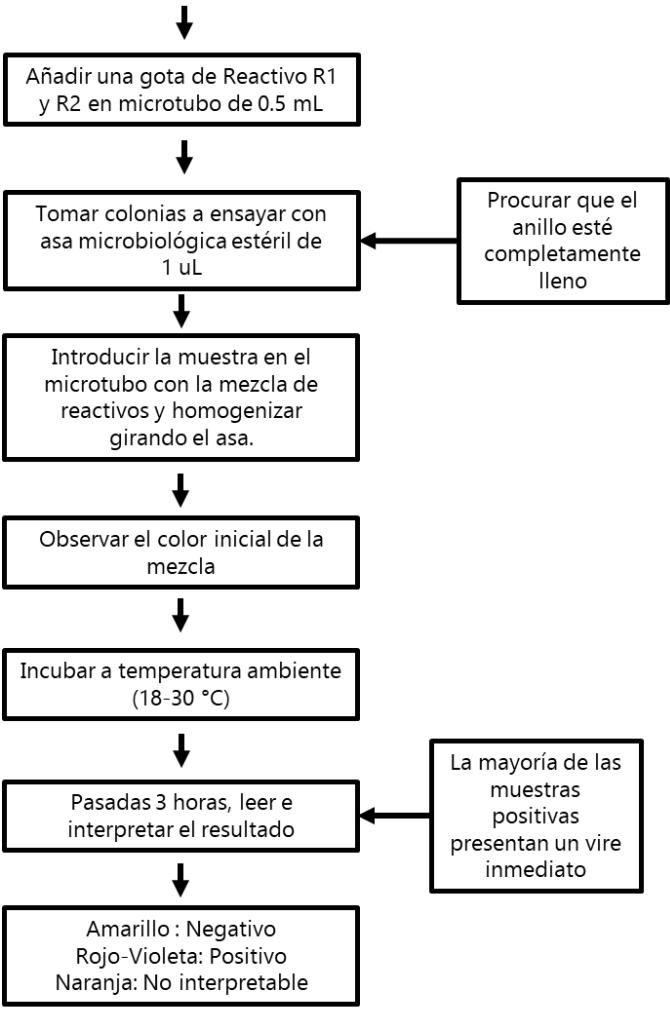
56. Pérez-Morales, D. y Bustamante-Santillán, V. (2018). Crisis mundial por bacterias patógenas resistentes a antibióticos, si no hay acciones hoy, no habrá cura mañana. *BIOTECNOLOGÍA EN MOVIMIENTO, UNAM*. **15**:31-46.
57. Pier, G. (2006). Mecanismos moleculares de la patogenia bacteriana. Harrison. Principios de Medicina Interna. 16.a ed. México DF: McGraw Hill Interamericana. 1013-1021.
58. Pratt T, S. Sistema automatizado para microbiología BD Phoenix™ ID/AST. (2010). Recuperado en abril 07 de 2019 a las 20:03 horas en <https://bit.ly/2P7IDfO>
59. Pucci, M. y Bush, K. (2013). Investigational Antimicrobial Agents of 2013. *Clin Microbiol Rev*. **26**(4):792-821.
60. Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*. **10**(51):3426-31.
61. Pulcini, C. y Mainardi, J. (2014). Antimicrobial stewardship: an international emergency. *Clin Microbiol Infect*. **20**(10):947-948.
62. Ramos-Godínez, A.; Hernández-Pedroso, W.; Nodarse-Hernández, R. *et al.* (2008). Detección precoz de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes graves. *Rev Cub Med Int Emerg*. **5**(1):294-301.
63. Renvoisé, A.; Decré, D.; Amarsy-Guerle, R. *et al.* (2013). Evaluation of the β Lacta Test, a Rapid Test Detecting Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Strains of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. **51**(12):4012-4017.
64. Rodríguez-Baño, J. y Pascual, A. (2008). Clinical significance of extended spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*. **6**(5):671-683.
65. Rodríguez-Noriega, E.; León-Garnica, G.; Petersen-Morfín, S. *et al.* (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. **34**(1):181-190.

66. Rodríguez-Vidigal, F.; Vera-Tomé, A.; Nogales-Muñoz, N. *et al.* (2016). Infecciones por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido tras cirugía cardíaca: su impacto en la mortalidad. *Rev Colomb Cardiol.* **23**(4):321-326.
67. Santajit, S. y Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.* **2016**(1):1-8.
68. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M. *et al.* (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* **32**(2):234-258.
69. Schechner, V.; Temkin, E.; Harbarth, S. *et al.* (2013). Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clin Microbiol Rev.* **26**(2):289-307.
70. Schwaber, M.; Navon-Venezia, S.; Kaye KS. *et al.* (2006). Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(4):1257-1262.
71. Secretaría de Salud. (2011). Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. Recuperado en febrero 27, 2019 a las 19:20 horas en http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_IF.pdf
72. Seral, C.; Pardos, M.; Castillo, F. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **28**(1):12-18.
73. Supliguicha, M.; Supliguicha, P.; Ortega, V. *et al.* (2017). Factores de riesgo para la infección del tracto urinario por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *AVFT.* **36**(5):201-205.
74. Thompson, K. (2010). Extended-Expectrum-Beta-Lactamase, AmpC and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* **48**(4):1019-1025.

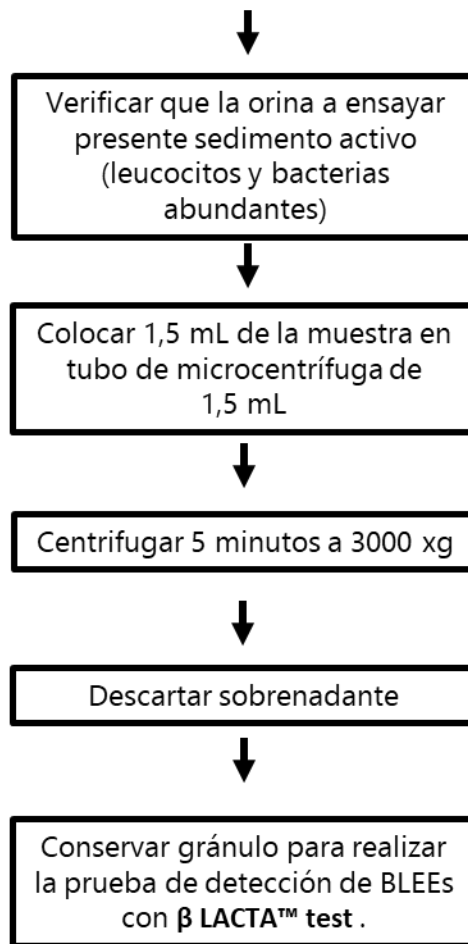
75. Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C. *et al.* (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol.* **10**(2):123-136.
76. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). *Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana* (Plan UCRA). (2018). Recuperado en febrero 25, 2019 a las 19:35 horas en http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reporte-ucradigital.pdf
77. Vignoli, L. Mecanismos de Resistencia a los antibióticos. (2018). Recuperado en marzo 01, 2018 a las 20:01 horas en: <http://ATBgrama2018.evimed.net>.
78. Walewski, V.; Podglajen, I.; Lefeuvre, P. *et al.* (2015). Early detection with the β -LACTA™ test of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **83**(3). 216–218.

12. ANEXO

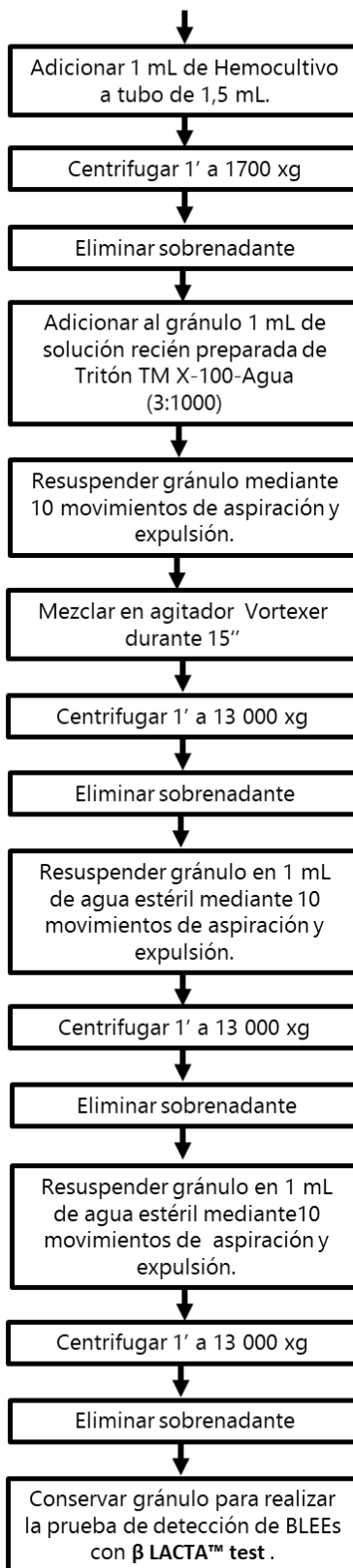
1) Prueba de detección de BLEEs con β LACTA™ test en colonia directa de GS y GCh



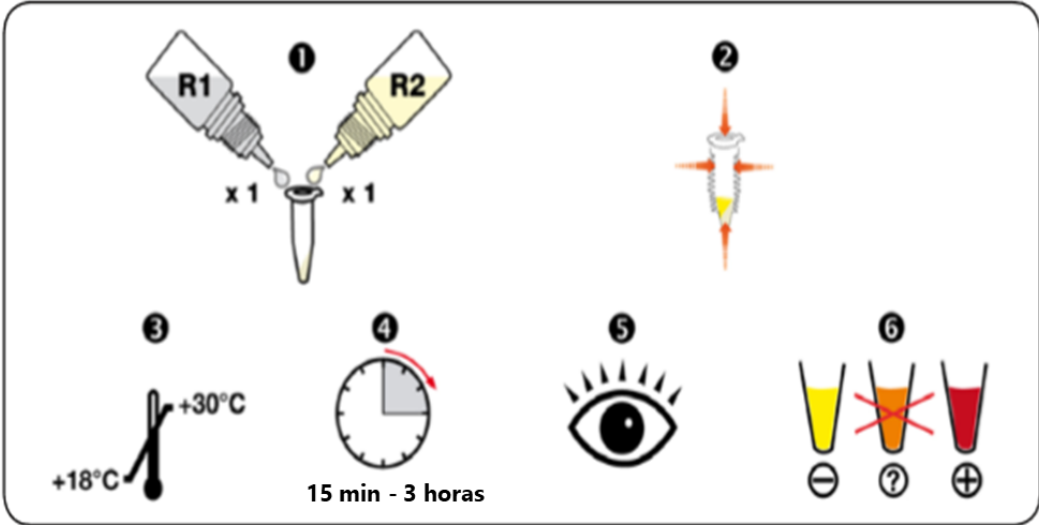
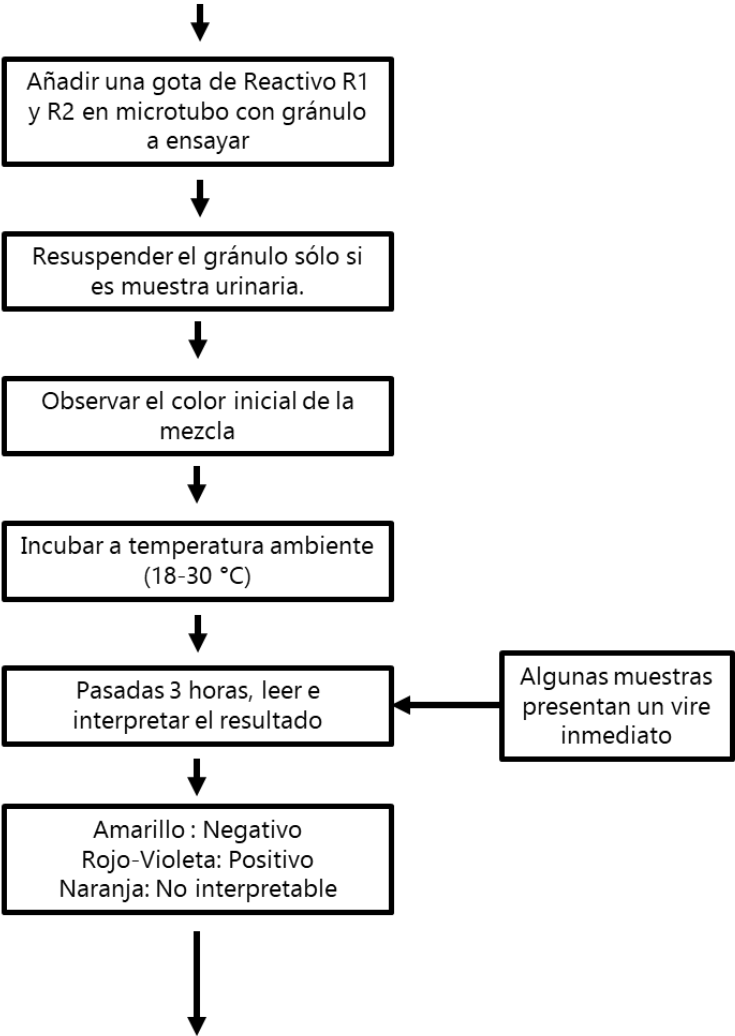
2) Obtención de sedimento urinario para ensayarse con la técnica colorimétrica β LACTA™ test



3) Obtención de sedimento de hemocultivo para ensayarse con la técnica colorimétrica β LACTA™ test



4) Prueba de detección de BLEEs con β LACTA™ test en sedimentos de orinas y hemocultivos



5) Cálculo del tamaño de muestra para una población infinita o desconocida.

Donde ⁽¹⁾:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{i^2}$$

π n: tamaño muestral

π Z: valor correspondiente de la distribución de Gauss $Z_{\alpha=0.05}=1.96$

π p: prevalencia esperada del parámetro a evaluar, en este caso, con base en el plan UCRA ⁽²⁾, se sabe que la prevalencia es del 60%.

π q: 1-p

π i: error que se prevé cometer, en este caso, al ser un estudio biológico, el error permitido es del 5%

Ejemplo del cálculo:

$$n = \frac{(1.96)^2 \cdot 0,60 \cdot (1 - 0,60)}{(0.05)^2} = 369 \text{ muestras.}$$

Referencias:

1. Bolaños, E. (2012). Tema: Muestra y Muestreo. UAEH. Recuperado en agosto 4, 2019 en https://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/tizayuca/gestion_tecnologica/muestraMuestreo.pdf
2. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). *Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana* (Plan UCRA). (2018). Recuperado en febrero 25, 2019 a las 19:35 horas en http://www.puis.unam.mx/slider_docs/reporte-ucradigital.pdf