



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DETECCIÓN DE HIDRÓLISIS DE CEFALOSPORINAS  
Y CARBAPENEMASAS EN *ENTEROBACTERALES*  
DIRECTO DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS DE  
JULIO 2022 A OCTUBRE 2023**

**TESINA**

**QUE PARA OBTENER EL:  
GRADO DE ESPECIALISTA**

**EN:  
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PRESENTA:  
Q.F.B. RAÚL GENARO GARCÍA GARCÍA**



**TUTORA:  
M.A.S.S. DÁMARIS MANZANO ARREDONDA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 M en C Carlos Alberto Eslava Campos

Vocal M en C Luis Manuel Perea Mejía

Secretario Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

1er. Suplente Dra. Verónica Viñuela Berni

2do. Suplente Dr. Alberto García Iozano

Trabajo realizado en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría.

Tutor:

---

M.A.S.S. Dámaris Manzano Arredonda

Sustentante:

---

Q.F.B. Raúl Genaro García García

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Irasema y Raúl y a mi hermana, Fátima, por siempre estar presentes y apoyarme en mi educación y crecimiento personal y profesional.

A mi novia, Jessica, por su amor y cariño, los momentos de risas y por siempre alentarme a seguir adelante.

A todo el equipo del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría, por recibirme, aceptarme y ser grandes personas y maestros.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	39
CONCLUSIÓN .....	44
BIBLIOGRAFÍA .....	46

## RESUMEN

Las bacteriemias son enfermedades causadas por la presencia de bacterias en la sangre que, si no se tratan adecuadamente, resultan en una fuente importante de morbilidad y mortalidad. En los niños, el diagnóstico clínico de bacteriemia puede ser difícil debido a la edad, diversidad en la presentación y microorganismo causante. La epidemiología de los patógenos microbianos que causan bacteriemias ha cambiado a lo largo de los años, con un aumento en la incidencia de organismos Gram negativos (GN), siendo las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* los principales patógenos causantes de bacteriemias con una tasa de aislamiento de hasta 30%. El tratamiento empírico oportuno y adecuado desempeña un papel fundamental en las bacteriemias causadas por GN, sin embargo, la creciente prevalencia de bacterias GN resistentes dificulta el tratamiento empírico de las bacteriemias.

La resistencia a antimicrobianos es una de las principales problemáticas de salud pública a nivel mundial, razón por la cual se han desarrollado metodologías que emplean la tecnología de ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) para la identificación de microorganismos. Esta tecnología es una solución rápida, de alto rendimiento, bajo costo, eficiente para realizar la identificación rápida de bacterias causantes de bacteriemias y con aplicación en la resistencia a los antimicrobianos, específicamente en la detección de la actividad hidrolítica de enzimas producidas por los microorganismos como cefalosporinasas y carbapenemasas, directamente de hemocultivos, con el fin de obtener resultados de importancia clínica de manera rápida y oportuna.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la utilidad de dos kits comerciales para la detección rápida de hidrólisis de antibióticos por enzimas cefalosporinasas y carbapenemasas (DRHAECfyCb) a partir de hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales*, en comparación con un método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Las pruebas comerciales para la DRHAECfyCb realizadas con los kits MBT STAR-Cepha y MBT STAR-Carba en hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales* mostraron, respectivamente, un porcentaje de exactitud del 92.19% y 100.00%, una sensibilidad de 90.48% y 100.00% y una especificidad de 95.45% y 100.00%, en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Con este trabajo pudimos concluir que los kits comerciales, al compararse con los resultados obtenidos por el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana, brindaron resultados de manera rápida y confiable (en aproximadamente 2 horas), lo cual es de utilidad para que el médico realice ajustes en la terapia antimicrobiana empírica de los pacientes, contribuyendo así a la disminución en el uso indiscriminado de antibióticos, la resistencia antimicrobiana, brotes y/o diseminación de patógenos resistentes.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a antimicrobianos es una de las mayores amenazas a la salud pública en la actualidad, con un estimado de 4.95 millones de muertes asociadas a resistencia bacteriana en 2019, de las cuales 1.27 millones se atribuyen directamente a resistencia bacteriana (Murray et al., 2022). La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno en el que los microorganismos dejan de responder a los medicamentos antimicrobianos, produciendo infecciones complicadas de tratar que a su vez elevan el riesgo de volverse severas y llevar a la muerte (WHO, 2021). Esto puede presentarse de manera intrínseca en algunos microorganismos y para otros ocurre como un proceso evolutivo natural (por mutaciones o adquisición de material genético exógeno por conjugación, transformación y/o transducción). El uso incorrecto de medicamentos, la contaminación del medio ambiente, las políticas ineficaces en el control de infecciones y factores socioeconómicos como el comercio mundial, conflictos, desplazamientos y migraciones promueven el crecimiento y diseminación de este problema, además del escaso y lento desarrollo y/o síntesis de nuevos antimicrobianos, lo que vuelve a la resistencia antimicrobiana aún más peligrosa (Aslam et al., 2021; Kaprou et al., 2021; Serna y Gonzalez-Zorn, 2022).

En respuesta a esta situación se han creado diversas estrategias para combatirla, entre las cuales se encuentra el Plan de Acción Global para la Resistencia Antimicrobiana de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que plantea el uso responsable y apropiado de antimicrobianos para mejorar los resultados de los pacientes, mediante un conjunto de medidas que incluyen la prescripción de



antimicrobianos adecuados, cuando se requieren, en la dosis, vía, duración y régimen correcto (WHO, 2021).

En este sentido, también se han creado programas de administración de antimicrobianos que buscan preservarlos e implementar de manera eficiente intervenciones a lo largo de los sectores de salud en todos los niveles, las cuales se engloban en cinco pilares (WHO, 2021):

1. Establecimiento y desarrollo de guías y mecanismos de coordinación nacionales.
2. Asegurar el acceso y regulación de los antimicrobianos.
3. Aumentar la conciencia, educación y entrenamiento sobre el uso de antimicrobianos.
4. Fortalecer el saneamiento de aguas, la higiene y la prevención y control de infecciones.
5. Vigilancia, monitoreo y evaluación del uso y resistencia de antimicrobianos, así como de las actividades de los programas de administración de éstos.

La resistencia a antimicrobianos también es abordada bajo el concepto de “Una sola salud” (One Health), un esfuerzo colaborativo multidisciplinario y multiinstitucional que establece la necesidad de prevenir, detectar y responder eficazmente a los problemas de salud que surgen de la compleja relación e interacción entre humanos, animales y el ambiente, a nivel local, nacional y mundial. Este enfoque busca combatir el problema con acciones como vigilancia y reporte de resistencia a antimicrobianos, seguimiento de las dinámicas de transmisión de patógenos multirresistentes a nivel humano, animal

y ambiental y la concientización y educación de la comunidad (Aslam et al., 2021; McEwen y Collignon, 2018).

La resistencia a antimicrobianos representa una amenaza para la práctica de la medicina, específicamente la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, agentes terapéuticos que han sido utilizados históricamente y ampliamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 (Bush y Bradford, 2020).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se subdividen en cuatro clases: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Estructuralmente, estas cuatro clases presentan un anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros el cual se enlaza a un segundo anillo (anillo tiazolidina en las penicilinas o anillo tiazina en las cefalosporinas) mediante átomos de nitrógeno y carbono (Iyer, 2022).

Este grupo de antibióticos presentan actividad bactericida, inhibiendo el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de la pared celular bacteriana, específicamente en el entrecruzamiento del peptidoglucano, un polímero estructural que le otorga forma a la célula bacteriana (Iyer, 2022). Este efecto se consigue gracias a la interacción covalente entre las moléculas de antibiótico y enzimas transpeptidasas llamadas proteínas de unión a penicilinas (PBP) las cuales pierden su actividad enzimática involucrada en los pasos finales del entrecruzamiento del peptidoglucano previo a que ocurra la división celular (Bush y Bradford, 2020; Iyer, 2022).

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos, como cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos está incrementando en muchas regiones del mundo, con tasas de

resistencia de hasta 80-100% en África, 90% en América y 60% en Europa, de acuerdo con la OMS (McEwen y Collignon, 2018).

La resistencia a estos medicamentos se presenta mediante tres mecanismos (Iyer, 2022):

1. Hidrólisis mediada por enzimas  $\beta$ -lactamasas.
2. Alteración del sitio blanco del antibiótico.
3. Disminución en la permeabilidad de la pared celular a las moléculas de antibiótico.

De estos mecanismos, la producción de  $\beta$ -lactamasas es el más común en bacterias Gram negativas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace amida presente en el anillo  $\beta$ -lactámico, dejando al antibiótico sin la capacidad de inhibir a las proteínas de unión a penicilina (PBP) (Palzkill, 2018).

Estas enzimas se clasifican de dos maneras: por sus características funcionales y por su estructura primaria. Estructuralmente se agrupan en cuatro clases moleculares, A, B, C y D, de acuerdo con motivos de aminoácidos conservados e identificables. Las clases A, C y D abarcan enzimas que forman una acil enzima mediante una serina en el sitio activo, mientras que la clase B se refiere a las metalo- $\beta$ -lactamasas, las cuales requieren al menos un sitio activo con zinc para llevar a cabo la hidrólisis (Bush y Jacoby, 2010). Por otro lado, la clasificación funcional, aunque compleja, permite relacionar a las enzimas con su efecto clínico. En este sentido, las enzimas se clasifican en cuatro grupos (Bush y Jacoby, 2010):

1. Grupo 1: Cefalosporinasas ubicadas en la clase molecular C, codificadas en los cromosomas de *Enterobacteriaceae* y otros organismos, presentan actividad

contra cefalosporinas, aztreonam y generalmente son resistentes al ácido clavulánico (inhibidor de  $\beta$ -lactamasas).

2. Grupo 2: Serin- $\beta$ -lactamasas de las clases moleculares A y D. Es el grupo más amplio de enzimas debido principalmente a la identificación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).
3. Grupo 3: Metallo- $\beta$ -lactamasas de la clase molecular B con baja afinidad para hidrolizar monobactámicos, no son inhibidas por ácido clavulánico ni por tazobactam, pero si por agentes quelantes como EDTA, ácido dipicolínico o 1,10-o-fenantrolina.

Las BLEE, que surgieron en respuesta a la introducción de antibióticos más potentes como las cefalosporinas de nuevas generaciones, tienen la habilidad de hidrolizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro incluyendo cefalosporinas y monobactámicos, pero no carbapenémicos ni cefamicinas, y son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y por inhibidores más recientes como avibactam, relebactam y vaborbactam (Castanheira et al., 2021).

Específicamente en México, se ha reportado a *bla*<sub>NDM-1</sub> (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1) como el gen codificante para la carbapenemasa más frecuente en *Enterobacteriaceae*, junto con los genes 181 y 232 de oxacilinasas, así como una alta circulación de la BLEE *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (gen codificante para la cefotaximasa M-15) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Además, a diferencia de otros países de Latinoamérica y EUA, KPC (carbapenemasa de *K. pneumoniae*) es poco frecuente (Fernández-García et al., 2022; Garza-González et al., 2021).

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, específicamente a cefalosporinas de 3ª generación resulta problemática ya que se trata del tratamiento empírico de primera línea recomendado para infecciones del torrente sanguíneo, lo cual lleva al uso de carbapenémicos, la última opción para combatir estas infecciones, sin embargo, se ha reportado aumento en la resistencia a estos medicamentos, especialmente en *K. pneumoniae* (WHO, 2022).

Las bacteriemias son enfermedades causadas por la presencia de bacterias en la sangre que, si no se tratan adecuadamente, resultan en una fuente importante de morbilidad y mortalidad. (Costa y Carvalho, 2022; Pai et al., 2015). Se caracterizan por generar una respuesta inmune que incluye síntomas de fiebre, escalofríos, hipotensión, hipotermia, diaforesis, taquipnea, taquicardia, hiperventilación, cambios en el estado mental y reducción en el tono vascular y puede derivar en una sepsis, choque séptico e incluso la muerte (Costa y Carvalho, 2022).

En la población pediátrica, el diagnóstico clínico de bacteriemia puede ser difícil debido a la edad, diversidad en la presentación y microorganismo causante. (Pai et al., 2015). La epidemiología de los patógenos microbianos que causan bacteriemias ha cambiado a lo largo de los años, con un aumento en la incidencia de organismos Gram negativos (GN) (Aydın Teke et al., 2017), siendo las cepas de la familia *Enterobacteriaceae* las principales causantes de bacteriemias con una tasa de aislamiento de hasta 30% (Yu et al., 2018). Algunos de éstos patógenos pertenecen al grupo llamado ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), un grupo de microorganismos asociados a resistencia a antimicrobianos (Costa y Carvalho, 2022).

Estas bacterias presentan una alta incidencia y mortalidad (especialmente aquellas de origen nosocomial) que varía entre 113 y 204 por cada 100,000 persona-años en Norte América. En México en 2022 las infecciones del torrente sanguíneo fueron la infección vinculada a la atención de la salud más frecuente (37.6%), reportando 4,267 infecciones asociadas a catéter, 3,785 bacteriemias primarias (aquellas con aislamiento de microorganismos de hemocultivos positivos verdaderos y sin otro foco infeccioso probable), 2,835 infecciones confirmadas por laboratorio y 2,575 no demostradas (Bravo, 2023; Finello et al., 2021; Mun et al., 2022; Schöneweck et al. 2021; Secretaria de Salud, Gobierno de México, 2022).

El tratamiento empírico oportuno y adecuado desempeña un papel fundamental en las bacteriemias causadas por GN, sin embargo, la creciente prevalencia de bacterias GN resistentes dificulta el tratamiento empírico de las bacteriemias (Aydın Teke et al., 2017).

Debido a lo anterior, resulta de especial importancia la identificación rápida y precisa de los microorganismos causantes de bacteriemias, así como su respectivo perfil de resistencia para administrar el tratamiento más adecuado para el paciente, evitando así periodos largos de hospitalización, la propagación de estos patógenos resistentes y el uso indiscriminado de antimicrobianos (Ota et al., 2019).

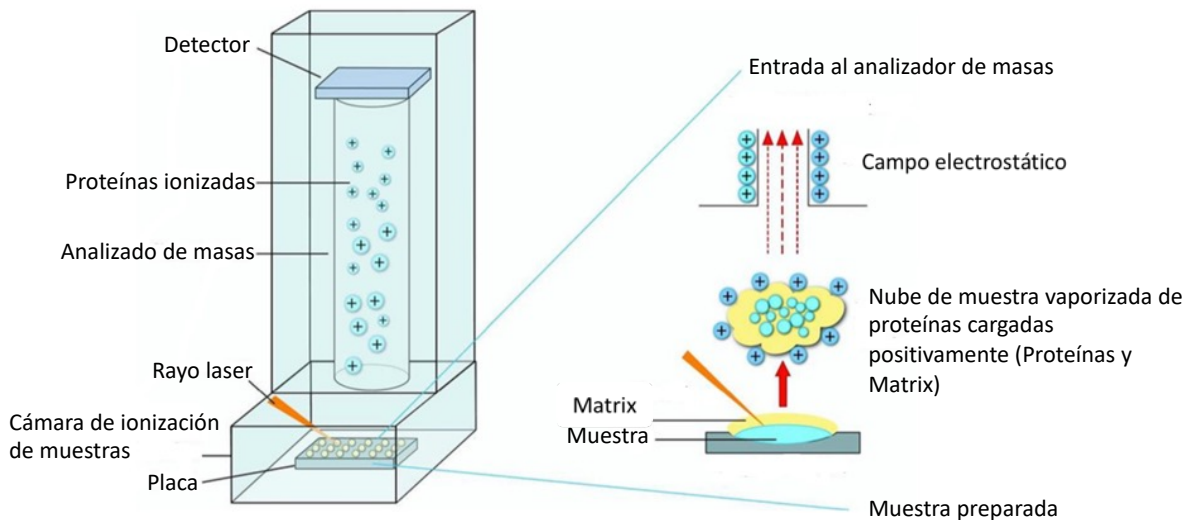
Existen diversos métodos convencionales para la identificación de microorganismos como los bioquímicos (pruebas bioquímicas manuales, uso de paneles o con equipos automatizados) o los moleculares (como amplificación de ácidos nucleicos y secuenciación), sin embargo, éstos tienden a ser costosos y tardados (Patel, 2013).

De manera similar ocurre para la identificación de resistencia a antibióticos, siendo los

métodos fenotípicos los más empleados, los cuales incluyen ensayos de difusión, gradientes y dilución, uso de equipos automatizados y métodos moleculares que buscan identificar genes de resistencia, mutaciones y expresión de éstos (Marroki y Bousmaha, 2022).

Por otro lado, la proteómica se ha vuelto de gran importancia para la identificación de microorganismos, particularmente con la tecnología de ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Esta técnica permite analizar las moléculas de una sustancia en función de su relación masa/carga y abundancia en la muestra. El proceso consiste en cristalizar la muestra utilizando una matriz (generalmente ácido  $\alpha$ -ciano-3,4-hidroxicinámico [HCCA]) que, al ser irradiada por un láser, a una longitud de onda de 337 nm, se volatiliza fácilmente, formando iones de biomoléculas grandes, no volátiles y termolábiles como las proteínas ribosomales. La volatilización de la matriz y la muestra provoca que haya colisiones entre ellas, transfiriéndole carga a las partículas de la muestra, las cuales se movilizan por un campo electrostático de carga positiva hacia un tubo con vacío donde se establece un campo magnético que atrae a las partículas hacia el detector de manera que las más ligeras llegan más rápido al detector y las más pesadas lo hacen después (Figura 1). Al llegar las partículas al detector, se registra el tiempo que tardan en atravesar el campo magnético y se transforma la señal de la corriente de iones en una relación de masas (eje x) mientras que la abundancia relativa o intensidad se expresa como altura en el eje y, creando un espectro (Oviaño et al., 2019; Patel, 2013).

Figura 1. Fundamentos técnicos de la identificación microbiana por MALDI-TOF MS.



*Nota.* Adaptado de “Métodos para la identificación de microorganismos cultivados mediante ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)” (p. 12), por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).

Para la aplicación de esta tecnología para la identificación de microorganismos se trabaja con un rango de masas de entre 2,000 y 20,000 Da, en donde la mayoría de los picos de masas obtenidos representan proteínas ribosomales, creando así un perfil peptídico específico que se analiza comparándolo con una base de datos para identificar al microorganismo más cercano de acuerdo con un puntaje que indica el nivel de confianza de la identificación (Oviaño et al., 2019; Patel, 2013).

En un inicio, MALDI-TOF MS era empleado para identificar microorganismos a partir de colonias en medios de cultivo sólidos en menos de una hora, sin embargo, se han desarrollado metodologías caseras y kits comerciales que permiten trabajar directamente con las muestras clínicas, como con sangre directa de frascos de hemocultivos positivos usando el kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics), el cual prepara a las células bacterianas presentes en un hemocultivo positivo (eliminando las



proteínas del medio de cultivo y las derivadas de la sangre, posteriormente se lavan y concentran para su análisis por MALDI-TOF MS. Este proceso lleva alrededor de una hora, lo que permite ahorrarse el tiempo de crecimiento del subcultivo y aislamiento del microorganismo causante de infección para su identificación (Nomura et al., 2020). Adicionalmente, esta tecnología ha sido empleada para el desarrollo de kits que permiten la detección rápida de enzimas de resistencia para cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos como alternativa a los métodos fenotípicos basados en cultivos (Ota et al., 2021).

Los kits MBT STAR-Cepha y MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics) hacen uso de MALDI-TOF MS para detectar cambios en la masa específica del antibiótico (cefalosporina de 3ª generación e imipenem, respectivamente) resultado de los productos de la hidrólisis de dichos antibióticos. Sin embargo, estos kits solo permiten detectar la hidrólisis del antibiótico cefalosporina de tercera generación y la hidrólisis del antibiótico imipenem debido a la presencia de enzimas cefalosporinasas y carbapenemasas, respectivamente. El kit MBT STAR-Cepha permite detectar todas las muestras con actividad hidrolítica hacia el antibiótico cefalosporina de 3ª generación, siempre y cuando la enzima cefalosporinasa se encuentre expresada, funcional y en cantidad suficiente. Sin embargo, también posee algunas limitaciones como que no se garantiza la detección de la actividad hidrolítica en hemocultivos mixtos, ni en hemocultivos anaerobios (se prefieren los aerobios). El kit MBT STAR-Carba permite detectar la actividad de carbapenemasa siempre y cuando la enzima se encuentre expresada, funcional y en cantidad suficiente, sin embargo, puede no detectar la actividad hidrolítica por carbapenemasas de tipo GES y OXA ni en

hemocultivos mixtos. También puede dar lugar a resultados falsos negativos en el caso de microorganismos de crecimiento lento y falsos positivos si el periodo de incubación se prolonga. Para ambos kits, un resultado de no hidrólisis, no asegura que no esté presente otro mecanismo de resistencia como, bombas de flujo, alteración del sitio blanco, cambios en la permeabilidad de la membrana, porinas modificadas, etc. (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 2021a; Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 2021b). En un estudio de evaluación del rendimiento realizado por el fabricante, el kit MBT STAR-Cepha mostro una sensibilidad del 93.3 %, una especificidad 90.9% y una exactitud del 92.2%, mientras que para el kit MBT STAR-Carba se obtuvo una sensibilidad del 95.2%, una especificidad de 99.1% y una exactitud del 97.1%. (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 2021a; Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, 2021b).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La identificación de bacterias del orden *Enterobacterales* recuperados a partir de hemocultivos, así como la obtención de su perfil de resistencia a antimicrobianos es un proceso que puede demorar días, por lo que es de gran importancia, la implementación de técnicas rápidas que puedan acelerar este proceso.

En comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana, ¿las pruebas para la DRHAECfYCb tendrán una exactitud, sensibilidad y especificidad mayor a la reportada por el fabricante?

## **JUSTIFICACIÓN**

Sabiendo que en la actualidad la resistencia a antimicrobianos es una de las principales amenazas a la salud pública a nivel mundial, contribuyendo a más de cinco millones de muertes anuales (Murray et al., 2022), el uso de pruebas para la DRHAECfYCb se ha convertido en una necesidad para que los médicos puedan elegir en un menor tiempo los agentes antimicrobianos apropiados para el tratamiento de los pacientes y así disminuir la diseminación de patógenos resistentes, los brotes y la morbi-mortalidad causados por éstos.

A partir de hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales* de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría se buscó evaluar la utilidad de dos pruebas comerciales rápidas para la DRHAECfYCb en comparación con un método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana, de manera que se pueda proveer esta información a los médicos tratantes de manera rápida y confiable (en

aproximadamente 2 horas) y así se pueda ajustar el tratamiento empírico antimicrobiano de los pacientes.

## **HIPÓTESIS**

Las pruebas para la DRHAECfYCb en bacterias del orden *Enterobacterales* directo de hemocultivos positivos tendrán una exactitud, sensibilidad y especificidad mayor a la estimada por el fabricante en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana para poder brindar un tratamiento oportuno.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la utilidad de los kits MBT STAR-Cepha y MBT STAR-Carba para la DRHAECfYCb a partir de hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales* en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Realizar la DRHAECfYCb en bacterias del orden *Enterobacterales* de hemocultivos positivos.
2. Comparar los resultados obtenidos de la DRHAECfYCb en bacterias del orden *Enterobacterales* contra los resultados del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana de antibióticos cefalosporina de tercera generación y carbapenémicos (imipenem).
3. Determinar la exactitud, sensibilidad y especificidad de la DRHAECfYCb en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este es un estudio experimental retrospectivo y prospectivo, realizado en 64 hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales* de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría, obtenidos en el periodo de tiempo de julio de 2022 a octubre de 2023, y a partir de los cuales se realizó la identificación de las especies bacterianas, las pruebas de DRHAECfYCb, así como la susceptibilidad a antimicrobianos por un método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Se consideraron como criterios de inclusión, exclusión y eliminación los siguientes:

### Criterios de inclusión

Se incluyeron hemocultivos positivos de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría, cultivados en frascos BacT/ALERT® para aerobios (BacT/ALERT® FA PLUS), anaerobios (BacT/ALERT® FN PLUS) y pediátricos (BacT/ALERT® PF PLUS) e incubados en el equipo BACT/ALERT® VIRTUO®, en los cuales en la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos, los cuales fueron identificados directamente del frasco de hemocultivo utilizando el kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics), de tal manera que se incluyeron los hemocultivos positivos en los que se identificaron bacterias del orden *Enterobacterales* y, en el caso de pacientes con más de un hemocultivo, se incluyó el primer hemocultivo positivo, sin embargo, si entre hemocultivos positivos de un mismo paciente con una diferencia de tiempo mayor a un mes, se incluyeron.

### Criterios de exclusión

Se excluyeron los hemocultivos positivos en los que no se recuperaron bacterias del orden *Enterobacterales*, así como aquellos con aislamiento de más de un microorganismo.

### Criterios de eliminación

Se eliminaron aquellos hemocultivos positivos que, posterior al uso del kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics) para la identificación de especie, no se obtuviera una cantidad de muestra suficiente como para realizar la prueba de identificación directa y las pruebas de DRHAECfYCb, así como aquellos hemocultivos positivos cuyo puntaje de identificación de especie fuera  $\leq 1.8$  en el equipo, Microflex LT (Bruker Daltonics).

### Materiales

- Microtubos de 1.5 mL
- Jeringas de 3 mL
- Agujas
- Portaobjetos
- Asas bacteriológicas
- Reactivos para tinción de Gram
- Frascos para hemocultivo BacT/ALERT® aerobio, anaerobio y pediátrico.
- Kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics)
- Placas para MALDI-TOF



- Reactivos para MALDI-TOF (ácido fórmico, matriz HCCA [ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico])
- Puntas para micropipeta de 1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 10  $\mu$ L.
- Kits MBT STAR-Cepha y MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics)
- Phoenix™ ID broth, AST indicator, AST broth y placa NMIC-406 (Becton Dickinson)
- Placas de agar sangre (BAS) con 5% sangre de carnero
- Placas de agar MacConkey
- Cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Escherichia coli* ATCC 25922

#### Identificación de especies

Los hemocultivos se procesaron utilizando el kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics), de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante (Figura 2):

1. Se colocó 1 mL de líquido de hemocultivo en un microtubo de 1.5 mL.
2. Se agregó 200  $\mu$ L de buffer de lisis, se agitó mecánicamente el microtubo y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos.
3. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 1 mL de buffer de lavado.
4. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto.
5. Se descartó el sobrenadante.

6. A partir del pellet, se tomó una pequeña muestra con una punta de micropipeta o palillo de madera, se colocó en una posición de la placa de MALDI y se dejó secar al aire libre.
7. Se agregó 1  $\mu$ l de ácido fórmico al 70% y dejó secar al aire libre.
8. Se agregó 1  $\mu$ l de matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) y dejó secar al aire libre.
9. Se analizó la placa de MALDI con el equipo Microflex LT (Bruker Daltonics) y el software MBT Compass ver. 4.1.100 (Bruker Daltonics).

*Figura 2. Proceso de identificación de especies con el kit MBT Sepsityper® RUO*



### Método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana

Este ensayo se llevó a cabo utilizando reactivos y equipos de la casa comercial Becton Dickinson (BD), de acuerdo con el procedimiento indicado por el fabricante (Figura 3):

1. A partir de un cultivo puro con colonias aisladas del microorganismo problema, se preparó una suspensión del microorganismo al 0.5 en la escala de McFarland en un tubo con caldo para identificación (Phoenix™ ID broth, BD).
2. Se agregó una gota de indicador (Phoenix™ AST indicator, BD) a un tubo con caldo para la prueba de sensibilidad (Phoenix™ AST broth, BD). Se mezcló por inversión 4 veces.
3. Se transfirió 25 µl de la suspensión preparada al tubo para la prueba de sensibilidad. Se mezcló por inversión 8 veces.
4. Se agregó todo el contenido del tubo en la placa para sensibilidad en el carril correspondiente de la placa Phoenix™ NMIC-406, BD y se selló con el tapón proporcionado por el fabricante.
5. Se ingresó la placa al equipo BD Phoenix™ M50 para su incubación, lectura e interpretación de resultados de acuerdo con los puntos de corte de concentración mínima inhibitoria (MIC) de la guía M100 edición 33 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés).
6. Si el resultado del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana determinó resistencia para imipenem, se realizó la técnica de Kirby-Bauer (difusión en disco) como prueba confirmatoria.

*Figura 3. Proceso de susceptibilidad antimicrobiana por el método automatizado.*



Pruebas de DRHAECfYCb con los kits MBT STAR-Cepha y MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics) mediante MALDI-TOF MS (Figura 4).

1. Se dividió en 2 partes el pellet obtenido con el kit MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics), una para ser trabajada con el kit MBT STAR-Cepha (Bruker Daltonics) y la otra con el kit MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics).
2. Se disolvieron los antibióticos proporcionados por el fabricante mediante pipeteo y se suspendieron ambas partes del pellet en 50  $\mu$ L de la solución antibiótica correspondiente por agitación mecánica.
3. Se incubó con agitación por 30 minutos a 35°C para el kit MBT STAR-Cepha y 60 minutos a 35°C para el kit MBT STAR-Carba.
4. Posterior a la incubación, se cargó una placa de MALDI desechable con 1  $\mu$ L de estándar MBT STAR ACS y con 1  $\mu$ L de la muestra por duplicado (incluyendo los controles positivo y negativo). Se dejó secar al aire libre.

5. Se agregó en cada una de las posiciones utilizadas 1  $\mu$ L de matriz MBT STAR-BL y se dejó secar al aire libre.
6. Se analizó la placa con el equipo Microflex LT (Bruker Daltonics) utilizando el software del módulo MBT STAR-BL, el cual calcula automáticamente el valor logRQ normalizado, un indicador del grado de hidrólisis del antibiótico comparado con el de las cepas control (positivo y negativo).

Se utilizaron cultivos frescos en agar sangre de las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como control positivo y *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.

Figura 4. Proceso de las pruebas de DRHAECfyCb



En este estudio se consideró la operacionalización de las siguientes variables, las cuales se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida
Resistente	Cualitativa nominal	Categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una MIC o diámetro mayor o igual al punto de corte de resistencia no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del agente con esquemas de dosificación normales.	Según mediciones realizadas por el equipo BD Phoenix™ M50, de acuerdo con puntos de corte de la guía CLSI M100 edición 33.	<p><b>MIC:</b>            Ceftriaxona: MIC &gt;1 µg/mL            Imipenem: MIC ≥ 2 µg/mL            Meropenem: MIC ≥ 2 µg/mL            Ertapenem: MIC ≥ 1 µg/mL</p> <p><b>Diámetro:</b>            Ceftriaxona: ≤ 25 mm            Imipenem: ≤ 22 mm            Meropenem: ≤ 22 mm            Ertapenem: ≤ 21 mm</p>
Susceptible	Cualitativa nominal	Categoría definida por un punto de corte que implica que los aislados con una MIC o diámetro igual o menor al punto de corte de susceptibilidad son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada se usa para tratar el sitio de infección.	Según mediciones realizadas por el equipo BD Phoenix™ M50, de acuerdo con puntos de corte de la guía CLSI M100 edición 33.	<p><b>MIC:</b>            Ceftriaxona: MIC ≤ 1 µg/mL            Imipenem: MIC ≤ 1 µg/mL            Meropenem: MIC ≤ 1 µg/mL            Ertapenem: MIC ≤ 0.5 µg/mL</p> <p><b>Diámetro:</b>            Ceftriaxona: ≥ 23 mm            Imipenem: ≥ 23 mm            Meropenem: ≥ 23 mm            Ertapenem: ≥ 22 mm</p>

Hidrólisis	Cualitativa nominal	Actividad hidrolítica frente a cefalosporinas de 3ª generación o carbapenémicos detectada por encima de los umbrales.	Según mediciones realizadas por el equipo Microflex LT (Bruker Daltonics).	Hidrólisis (H) No hidrólisis (NH)
------------	---------------------	---	--	--------------------------------------

### Análisis estadístico

El análisis estadístico que se llevó a cabo en el presente estudio para el análisis de los resultados fue descriptivo, utilizando Microsoft® Excel ver. 16.76. Para ello se obtuvieron las frecuencias de los microorganismos aislados y de los diagnósticos presuntivos para los 64 hemocultivos positivos trabajados. Se calculó la sensibilidad

utilizando la fórmula  $\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$  y la especificidad con la

fórmula  $\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$ , de las pruebas de DRHAECfYCb

tomando al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana como método de referencia. La exactitud entre ambos métodos se evaluó mediante el cálculo de la kappa de Cohen, la cual cumple con lo esperado.

## RESULTADOS

El presente estudio se desarrolló en el periodo de julio 2022 a octubre 2023, en el cual se incluyeron 64 hemocultivos positivos de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría. En la Tabla 2 se muestran los datos demográficos e identificación de los microorganismos identificados en las 64 muestras trabajadas, siendo los resultados los siguientes, una media de edad de 6 años, 25 pacientes fueron femeninos y 39 masculinos, los resultados del kit para identificación directa de hemocultivos positivos MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics) con un puntaje >1.8 (puntaje mínimo para la identificación a nivel de especie de alta confianza) los cuales se analizaron en el equipo Microflex LT (Bruker Daltonics), obteniéndose los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (31/64) 48.44%, *Klebsiella pneumoniae* (21/64) 32.81%, *Salmonella* sp., *Klebsiella variicola*, *Enterobacter hormaechei* y *Citrobacter freundii* (2/64) 3.13% de cada especie y *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter rogenkampii*, *Enterobacter cloacae* y *Pantoea agglomerans* (1/64) 1.56% de cada uno, como se muestra en el Gráfico 1.

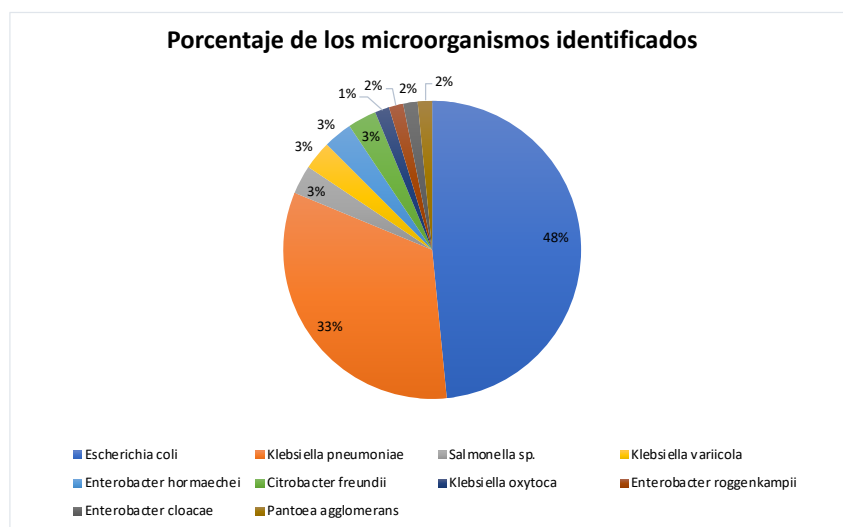


Gráfico 1. Porcentaje de los microorganismos identificados a partir de los hemocultivos positivos.



Los 64 pacientes con hemocultivos positivos tenían los siguientes diagnósticos presuntivos: fiebre (20/64) 31.25%, sin diagnóstico (11/64) 17.19%, bacteriemia (7/64) 10.94%, sepsis (5/64) 7.81%, trasplante y leucemia linfoblástica aguda (4/64) 6.25% cada uno, ventriculitis, enfermedad renal crónica y neumonía (2/64) 3.13% cada uno y hemofilia B, falla multiorgánica, infección asociada a catéter, colangitis, control, apendicitis y síndrome nefrótico (1/64) 1.56% cada uno.

Tabla 2. Datos demográficos de los pacientes e identificación de microorganismos.

Muestra	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico	Microorganismo	Score Sepsityper
1	10	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	1.97
2	3	F	S/D	<i>Salmonella sp.</i>	1.86
3	1	F	Trasplante	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.37
4	0	F	S/D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.12
5	17	F	LLA	<i>Escherichia coli</i>	2.03
6	10	F	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.39
7	1	M	Ventriculitis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.09
8	9	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.38
9	0	F	Sepsis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.16
10	3	M	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.24
11	14	F	Bacteriemia	<i>Escherichia coli</i>	2.28
12	0	F	S/D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.21
13	4	M	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.36
14	1	M	Hemofilia B	<i>Escherichia coli</i>	2.30
15	1	M	Sepsis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.46
16	1	F	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.34
17	0	F	S/D	<i>Klebsiella variicola</i>	2.21
18	2	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.34
19	7	M	S/D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.22
20	4	M	ERC	<i>Escherichia coli</i>	2.29
21	10	F	S/D	<i>Salmonella sp.</i>	1.99
22	16	M	Falla multiorgánica	<i>Escherichia coli</i>	2.30
23	17	M	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.22
24	0	M	Fiebre	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2.37
25	1	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.26
26	6	M	Bacteriemia	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.32
27	12	F	Infección asociada a cetéter	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.88
28	2	F	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.35
29	9	M	S/D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.37
30	0	F	S/D	<i>Escherichia coli</i>	2.34
31	0	M	Bacteriemia	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2.10
32	0	M	Neumonía	<i>Escherichia coli</i>	2.20
33	0	F	Colangitis	<i>Escherichia coli</i>	2.22
34	13	M	Bacteriemia	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.24
35	10	M	ERC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.18
36	1	M	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.49
37	10	F	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.22
38	1	M	Bacteriemia	<i>Escherichia coli</i>	2.35
39	16	M	S/D	<i>Escherichia coli</i>	2.04
40	0	M	Control	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.50
41	10	M	Apendicitis	<i>Escherichia coli</i>	2.50
42	17	M	Fiebre	<i>Klebsiella variicola</i>	2.24
43	13	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.07
44	3	F	S/D	<i>Citrobacter freundii</i>	2.21
45	6	M	Síndrome nefrótico	<i>Citrobacter freundii</i>	2.21
46	14	F	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.49
47	1	M	Ventriculitis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.30
48	0	M	Sepsis	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2.31
49	9	M	Bacteriemia	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.14
50	0	M	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.20
51	6	M	LLA	<i>Escherichia coli</i>	2.46
52	7	F	LLA	<i>Escherichia coli</i>	2.20
53	16	F	Trasplante	<i>Escherichia coli</i>	2.28
54	5	F	Fiebre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.18
55	0	M	Neumonía	<i>Escherichia coli</i>	2.22
56	3	F	S/D	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.93
57	2	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.27
58	0	M	Sepsis	<i>Escherichia coli</i>	2.41
59	12	F	Bacteriemia	<i>Escherichia coli</i>	2.19
60	2	F	Trasplante	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.21
61	16	M	Fiebre	<i>Escherichia coli</i>	2.41
62	4	M	LLA	<i>Escherichia coli</i>	2.25
63	14	M	Trasplante	<i>Escherichia coli</i>	2.19
64	16	F	Sepsis	<i>Escherichia coli</i>	2.19

Abreviaciones: ERC, enfermedad renal crónica; F, femenino; LLA, leucemia linfoblástica aguda; M, masculino; S/D, sin diagnóstico.

Tabla 3. Resultados de la prueba para la detección rápida de hidrólisis de antibióticos por enzimas cefalosporinas (DRHAECf) así como del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Muestra	Microorganismo	Prueba de hidrólisis de cefalosporinas (CEPHA)		Susceptibilidad Automatizada Ceftriaxona	
		logRQ	Interp	MIC (µg/mL)	Interp
1	<i>Escherichia coli</i>	-0.38	NH	<=1	S
2	<i>Salmonella sp.</i>	-0.04	NH	<=1	S
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.65	H	>4	R
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.44	H	>4	R
5	<i>Escherichia coli</i>	0.90	H	>4	R
6	<i>Escherichia coli</i>	0.63	H	>4	R
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.44	H	>4	R
8	<i>Escherichia coli</i>	1.31	H	>4	R
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.12	NH	>4	R
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.28	NH	<=1	S
11	<i>Escherichia coli</i>	0.00	NH	<=1	S
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.63	H	>4	R
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.37	H	>4	R
14	<i>Escherichia coli</i>	0.82	H	>4	R
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.81	H	>4	R
16	<i>Escherichia coli</i>	1.28	H	>4	R
17	<i>Klebsiella variicola</i>	-0.44	NH	<=1	S
18	<i>Escherichia coli</i>	1.04	H	>4	R
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.41	H	>4	R
20	<i>Escherichia coli</i>	-0.18	NH	<=1	S
21	<i>Salmonella sp.</i>	-0.35	NH	<=1	S
22	<i>Escherichia coli</i>	-0.20	NH	>4	R
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.57	NH	<=1	S
24	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-0.59	NH	<=1	S
25	<i>Escherichia coli</i>	1.12	H	>4	R
26	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-1.07	NH	<=1	S
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.23	H	>4	R
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.09	NH	<=1	S
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.99	H	>4	R
30	<i>Escherichia coli</i>	0.88	H	>4	R
31	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-0.26	NH	<=1	S
32	<i>Escherichia coli</i>	0.27	H	>4	R
33	<i>Escherichia coli</i>	-0.31	NH	>4	R
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.49	H	>4	R
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.28	H	>4	R
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.89	H	>4	R
37	<i>Escherichia coli</i>	-0.69	NH	<=1	S
38	<i>Escherichia coli</i>	1.04	H	>4	R
39	<i>Escherichia coli</i>	0.39	H	>4	R
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.21	H	>4	R
41	<i>Escherichia coli</i>	1.26	H	>4	R
42	<i>Klebsiella variicola</i>	-0.30	NH	<=1	S
43	<i>Escherichia coli</i>	0.67	H	>4	R
44	<i>Citrobacter freundii</i>	-0.05	NH	<=1	S
45	<i>Citrobacter freundii</i>	0.00	NH	<=1	S
46	<i>Escherichia coli</i>	0.93	H	>4	R
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.05	NH	<=1	S
48	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	0.85	H	<=1	S
49	<i>Enterobacter cloacae</i>	-0.11	NH	<=1	S
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.64	NH	<=1	S
51	<i>Escherichia coli</i>	1.09	H	>4	R
52	<i>Escherichia coli</i>	-0.22	NH	<=1	S
53	<i>Escherichia coli</i>	0.24	H	>4	R
54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.06	NH	>4	R
55	<i>Escherichia coli</i>	1.96	H	>4	R
56	<i>Pantoea agglomerans</i>	-0.24	NH	<=1	S
57	<i>Escherichia coli</i>	0.52	H	>4	R
58	<i>Escherichia coli</i>	1.71	H	>4	R
59	<i>Escherichia coli</i>	1.83	H	>4	R
60	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.99	H	>4	R
61	<i>Escherichia coli</i>	2.62	H	>4	R
62	<i>Escherichia coli</i>	0.98	H	>4	R
63	<i>Escherichia coli</i>	1.04	H	>4	R
64	<i>Escherichia coli</i>	0.45	H	>4	R

Abreviaciones: H, hidroliza; Interp, interpretación; MIC, concentración mínima inhibitoria; NH, no hidroliza; R, resistente; S, susceptible.

En la Tabla 3 se describen los resultados obtenidos de los 64 hemocultivos positivos, a los cuales se les realizó la prueba para la detección rápida de hidrólisis por enzimas cefalosporinasas (DRHAECf) con el kit MBT STAR-Cepha (Bruker Daltonics) y la sensibilidad antimicrobiana mediante un método automatizado en el sistema BD Phoenix™ M50 (Becton Dickinson), obteniéndose (39/64) 60.94% positivos para hidrólisis del antibiótico cefalosporina de tercera generación, mientras que (25/64) 39.06% resultaron negativos.

De los 64 hemocultivos positivos, 5 mostraron resultados no concordantes, de los cuales 4 fueron falsos negativos y 1 falso positivo para la prueba DRHAECf en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana. A continuación, se describen dichas muestras en las que no se obtuvo concordancia: la muestra 9 (etiquetada en azul) tuvo un diagnóstico presuntivo de sepsis, se aisló una *K. pneumoniae*, mediante el método automatizado, la ceftriaxona fue resistente con una MIC >4 µg/mL y en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas se obtuvo un resultado de no hidrólisis. La muestra 22 (etiquetada en verde) tuvo un diagnóstico presuntivo de falla multiorgánica, se aisló una *E. coli*, la ceftriaxona por el método automatizado fue resistente con una MIC >4 µg/mL y en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas se determinó no hidrólisis. La muestra 33 (etiquetada en amarillo) tuvo un diagnóstico presuntivo de colangitis, se aisló una *E. coli*, el resultado por el método automatizado fue de resistencia para ceftriaxona con una MIC >4 µg/mL y en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas se determinó no hidrólisis. La muestra 48 (etiquetada en naranja) fue en la que se obtuvo un resultado falso positivo, teniendo un diagnóstico presuntivo de sepsis, se aisló un *Enterobacter*

*roggenkampii*, con el método automatizado la ceftriaxona fue sensible con una MIC  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  y en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas se obtuvo un resultado de hidrólisis. La muestra 54 (etiquetada en lila) tuvo un diagnóstico presuntivo de fiebre, se aisló una *K. pneumoniae*, resistencia a ceftriaxona con una MIC  $>4$   $\mu\text{g/mL}$  determinada por el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana y en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas se determinó no hidrólisis.

La exactitud obtenida a partir de la comparación de los resultados del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana y los de la prueba de DRHAECf fue de (59/64) 92.19%, con una kappa de Cohen calculada de  $k=0.83$  al 95% de confianza, cumpliendo con el planteamiento del problema y con la hipótesis.

Esta prueba mostró una sensibilidad del 90.48% y una especificidad del 95.45% tomando como referencia al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 4. Resultados de la prueba para la detección rápida de hidrólisis de antibióticos por enzimas carbapenemasas (DRHAECb), así como del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana (imipenem).

Muestra	Microorganismo	Prueba de carbapenemasas (CARBA)		Susceptibilidad Automatizada Imipenem	
		logRQ	Interp	MIC (µg/mL)	Interp
1	<i>Escherichia coli</i>	-0.06	NH	<=0.25	S
2	<i>Salmonella sp.</i>	-0.15	NH	<=0.25	S
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.36	H	>8	R
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.10	NH	0.5	S
5	<i>Escherichia coli</i>	0.05	NH	<=0.25	S
6	<i>Escherichia coli</i>	0.06	NH	0.5	S
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.06	NH	<=0.25	S
8	<i>Escherichia coli</i>	0.08	NH	<0.25	S
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.64	H	>8	R
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.13	NH	<=0.25	S
11	<i>Escherichia coli</i>	0.00	NH	<=0.25	S
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.25	NH	0.5	S
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.10	NH	<=0.25	S
14	<i>Escherichia coli</i>	-0.21	NH	<=0.25	S
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.10	NH	0.5	S
16	<i>Escherichia coli</i>	-0.14	NH	<=0.25	S
17	<i>Klebsiella variicola</i>	-0.12	NH	<=0.25	S
18	<i>Escherichia coli</i>	-0.05	NH	<=0.25	S
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.11	H	>8	R
20	<i>Escherichia coli</i>	-0.18	NH	<=0.25	S
21	<i>Salmonella sp.</i>	-0.27	NH	0.5	S
22	<i>Escherichia coli</i>	0.01	NH	<=0.25	S
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.20	NH	0.5	S
24	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-0.14	NH	0.5	S
25	<i>Escherichia coli</i>	0.03	NH	<=0.25	S
26	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-0.15	NH	1	S
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.08	NH	<=0.25	S
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.02	NH	0.5	S
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.08	NH	0.5	S
30	<i>Escherichia coli</i>	-0.86	NH	<=0.25	S
31	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-0.09	NH	<=0.25	S
32	<i>Escherichia coli</i>	-0.17	NH	<=0.25	S
33	<i>Escherichia coli</i>	-0.34	NH	<=0.25	S
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.97	H	>8	R
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.39	NH	0.5	S
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.45	NH	<=0.25	S
37	<i>Escherichia coli</i>	-1.31	NH	<=0.25	S
38	<i>Escherichia coli</i>	0.17	NH	<=0.25	S
39	<i>Escherichia coli</i>	-0.07	NH	<=0.25	S
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.49	H	2	R
41	<i>Escherichia coli</i>	-0.06	NH	<=0.25	S
42	<i>Klebsiella variicola</i>	-0.18	NH	<=0.25	S
43	<i>Escherichia coli</i>	-0.20	NH	<=0.25	S
44	<i>Citrobacter freundii</i>	-0.04	NH	0.5	S
45	<i>Citrobacter freundii</i>	-0.17	NH	0.5	S
46	<i>Escherichia coli</i>	-0.04	NH	<=0.25	S
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.13	NH	0.5	S
48	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	-0.09	NH	1	S
49	<i>Enterobacter cloacae</i>	-0.30	NH	0.5	S
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.14	NH	<=0.25	S
51	<i>Escherichia coli</i>	-0.04	NH	<=0.25	S
52	<i>Escherichia coli</i>	-0.23	NH	<=0.25	S
53	<i>Escherichia coli</i>	-0.06	NH	<=0.25	S
54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.73	NH	<=0.25	S
55	<i>Escherichia coli</i>	0.12	NH	<=0.25	S
56	<i>Pantoea agglomerans</i>				
57	<i>Escherichia coli</i>	-0.15	NH	0.5	S
58	<i>Escherichia coli</i>	-0.75	NH	<=0.25	S
59	<i>Escherichia coli</i>	-0.07	NH	<=0.25	S
60	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-0.10	NH	0.5	S
61	<i>Escherichia coli</i>	0.82	H	>8	R
62	<i>Escherichia coli</i>	0.07	NH	<=0.25	S
63	<i>Escherichia coli</i>	-0.05	NH	<=0.25	S
64	<i>Escherichia coli</i>	-0.18	NH	27 mm	S

Abreviaciones: H, hidroliza; Interp, interpretación; MIC, concentración mínima inhibitoria; mm, milímetros; NH, no hidroliza; R, resistente; S, susceptible.

En la Tabla 4 se describen los resultados obtenidos de la prueba de DRHAECb con el kit MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics) y del método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana con el sistema BD Phoenix™ M50 (Becton Dickinson) para 63 de los 64 hemocultivos positivos debido a que, para el microorganismo recuperado del hemocultivo 56 (*Pantoea agglomerans*), no se obtuvo el resultado de la MIC para imipenem por el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

De los 63 hemocultivos positivos se obtuvo (57/63) 90.48% negativos para la prueba la DRHAECb, mientras que (6/63) 9.52% resultaron positivos, sin ningún falso negativo ni positivo

La exactitud entre el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana en comparación con la prueba DRHAECb, fue de 100.00%, con una kappa de Cohen calculada de  $k=1.00$  al 95% de confianza, cumpliendo así con el planteamiento del problema y la hipótesis.

Esta prueba mostró una sensibilidad del 100.00% y una especificidad del 100.00% tomando como referencia al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se realizó la DRHAECfyCb en bacterias del orden *Enterobacterales* directo de hemocultivos positivos y se comparó con un método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana. En el análisis de resultados se encontró que las pruebas de DRHAECfyCb tienen una exactitud de acuerdo a los establecido con el fabricante, con una kappa de Cohen calculada de 0.83 y 1.00, respectivamente, indicando que éstas pruebas presentan una alta exactitud respecto al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Estas pruebas comerciales permiten la obtención de resultados de manera rápida, ya que el tiempo de proceso es de 2 horas aproximadamente para hemocultivos. Rapp et al. (2018) reporta un tiempo para obtener resultados de entre 1h 15min y 2h, mientras que Tsubasa et al. (2023) indica un tiempo de 2 horas, permitiendo reportar resultados un día antes que con métodos de detección de resistencia a antimicrobianos convencionales. Por lo anterior es que estas pruebas son de gran utilidad como resultado preliminar para la detección de resistencia a antibióticos como son las cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, lo cual es de importancia para desescalar la terapia antimicrobiana o realizar cambios en la misma, así como para disminuir la morbi-mortalidad de los pacientes con bacteriemia en comparación con el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana en la cual se obtienen los resultados en 48 horas aproximadamente. De acuerdo con otras publicaciones se ha comprobado que estas pruebas llevan a una disminución en el tiempo para la aplicación de una terapia antimicrobiana adecuada, disminución de la morbilidad y



mortalidad, así como beneficios en el control de infecciones, descrito por O'Donnell et al. (2022), Lasserre et al. (2015) y Ota et al. (2023).

En la prueba de DRHAECf se obtuvieron 4 falsos negativos, 2 en los que el microorganismo aislado fue *K. pneumoniae* y 2 en los que se aisló *E. coli*. La primera causa de los falsos negativos (particularmente en los de *K. pneumoniae*) se debe a que es un microorganismo que se caracteriza por una elevada producción de cápsula, los pellets obtenidos directamente de los hemocultivos positivos tienen una consistencia mucoide, dificultando la división del pellet para llevar a cabo las pruebas de detección de DRHAECfyCb, situación que pudo influir en que no hubiera suficiente muestra para realizar la prueba, dando así un resultado falso negativo y no concordante respecto al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana. Por lo anterior, considero que una de las acciones que se pueden llevar a cabo para incrementar el rendimiento de la prueba de DRHAECf es que, para el caso de pellets de consistencia mucoide (frecuentemente obtenidos en muestras de *K. pneumoniae*), las pruebas de detección de DRHAECfyCb se realicen de manera individual, es decir, realizar una extracción con el kit para identificación directa de hemocultivos positivos MBT Sepsityper® RUO (Bruker Daltonics) para cada prueba, sin embargo, esto puede implicar el uso de una mayor cantidad de reactivos, lo cual en última instancia resulta en la elevación del costo de la prueba para el Instituto, por lo que se deberá analizar el costo-beneficio de realizar dichos cambios.

La segunda causa de los 4 resultados falsos negativos es que el mecanismo de resistencia para el antibiótico cefalosporina de 3ª generación no estaba mediado por enzimas cefalosporinasas, sino por algún otro mecanismo como puede ser la

alteración del sitio blanco, disminución en la permeabilidad de la pared celular, bombas de eflujo o porinas, tal como menciona la casa comercial de la prueba, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.

La tercera causa por la cual se presentaron 4 falsos negativos se pudo deber a lo observado durante el procesamiento de las muestras, ya que la cantidad de pellet no está estandarizada, pero lo anterior considero importante su estandarización para aumentar el rendimiento de las pruebas de DRHAECfyCb, como sugiere Anantharajah et al. (2019).

También se obtuvo un resultado falso positivo en la prueba de detección de hidrólisis de cefalosporinas, en el cual se identificó *Enterobacter roggenkampii*, el único de 4 aislamientos de especies del complejo *Enterobacter cloacae* en el cual se obtuvo un resultado no concordante respecto al método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana.

Para la prueba de DRHAECf realizada con el kit MBT STAR-Cepha (Bruker Daltonics) en hemocultivos positivos, Ota et al. (2023) reporta una sensibilidad de 45.8% y una especificidad de 100.0% de un estudio realizado en Japón, mientras que Tsubasa et al. (2023) reporta para un estudio realizado en Japón con cepas aisladas de muestras clínicas, pero no necesariamente hemocultivos, una sensibilidad de 100.0% y una especificidad de 66.1%, sin embargo, no. Esto muestra una variabilidad entre los valores de sensibilidad y especificidad para dicha prueba en comparación con los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, es posible que estas variaciones puedan estar dadas por las distintas condiciones de trabajo y el tipo de muestra que se utilizaron en dichos estudios.

En los últimos años se han publicado diferentes estudios donde se demuestran porcentajes altos de sensibilidad y especificidad para ambas pruebas, siendo estos hasta del 100%, como lo establecen Cordovana et al. (2020), Rapp et al. (2018), Tsubasa et al. (2023) y Anantharajah et al. (2019).

Respecto a la prueba de DRHAECb, y como se mencionó previamente, la muestra 56 se eliminó del análisis de los datos debido a que el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana no emite resultados de MIC para imipenem para *Pantoea agglomerans* y, dado que éste es el antibiótico empleado para la prueba de DRHAECb en el kit MBT STAR-Carba (Bruker Daltonics), no se puede realizar la comparación de los resultados de ambos métodos.

Para la muestra 64, el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana determinó resistencia a imipenem, por lo que, de acuerdo con lo establecido en la metodología, este resultado se confirmó mediante la técnica de Kirby-Bauer (difusión en disco), obteniéndose un halo de inhibición de 27 mm de diámetro que, de acuerdo con la guía CLSI M100 edición 33, indica sensibilidad a imipenem, razón por la cual en la Tabla 4, la MIC para esta muestra está expresada en milímetros (mm). Debido a lo anterior, la muestra se consideró como concordante con la prueba de DRHAECb

Los resultados demuestran que la prueba de DRHAECb es útil ya que ha sido probada bajo distintas condiciones de trabajo y tipos de muestra, mostrando valores de exactitud, sensibilidad y especificidad semejantes a lo reportado por el fabricante.

En este estudio solo se realizó la prueba de DRHAECb para bacterias del orden *Enterobacterales*, sin embargo, también resulta de utilidad para otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, como en el estudio

realizado por Rapp et al. (2018) aunque para este último se han reportado resultados no satisfactorios debido a la baja permeabilidad de su membrana externa a los carbapenémicos, resultando en la liberación de una pequeña cantidad de moléculas hidrolizadas, de acuerdo a lo planteado por Miltgen et al., (2018).

Es importante considerar que las pruebas rápidas de DRHAECfyCb poseen algunas limitaciones como son que no se garantiza la detección de la actividad hidrolítica en hemocultivos mixtos, el resultado depende de que la enzima cefalosporinasa o carbapenemasa se encuentre expresada, funcional y en cantidad suficiente, y un resultado de no hidrólisis, no asegura que no esté presente otro mecanismo de resistencia como, bombas de flujo, alteración del sitio blanco, cambios en la permeabilidad de la membrana, porinas modificadas, etc., es por ello que los médicos deben evaluar la historia clínica de los pacientes para interpretar correctamente el resultado de estas pruebas de apoyo diagnóstico.

## CONCLUSIÓN

Las pruebas comerciales para la DRHAECfyCb se correlacionan con los resultados obtenidos mediante el método automatizado de susceptibilidad antimicrobiana y permiten obtener resultados en un menor tiempo (2 horas aproximadamente). Por lo anterior, estas pruebas preliminares se pueden utilizar como apoyo para realizar cambios en la antibioticoterapia de pacientes con hemocultivos positivos en los que se identifiquen bacterias del orden *Enterobacterales* y de esta manera contribuir a la disminución de la resistencia antimicrobiana, el uso indiscriminado de antibióticos, así como de posibles brotes o diseminación de patógenos resistentes. Sin embargo, el clínico debe evaluar el estado del paciente para la interpretación y aplicación de dichos resultados ya que se debe tomar en cuenta que estas pruebas detectan la presencia de enzimas que hidrolizan antibióticos cefalosporinas y carbapenémicos, pero no consideran que otros mecanismos de resistencia pueden estar presentes.

Estos kits poseen poco tiempo en el mercado, por lo que existen pocas publicaciones, la mayoría de ellas sobre estudios realizados en países de Europa y Asia, sin embargo, hasta el momento no existen publicaciones en América Latina, por lo tanto con este trabajo se puede empezar a recopilar información sobre las ventajas del uso de estos kits como prueba complementaria para la toma de decisiones en la terapia antimicrobiana empírica en población pediátrica con hemocultivos positivos con bacterias del orden *Enterobacterales*.

Finalmente, como perspectivas de este estudio, consideramos que se podrían realizar las secuenciaciones del genoma completo de las muestras en las que no se obtuvieron

resultados concordantes para así conocer el mecanismo de resistencia que presentaban dichas muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anantharajah, A., Tossens, B., Olive, N., Kabamba-Mukadi, B., Rodriguez-Villalobos, H., & Verroken, A. (2019). Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01413>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Aydin Teke, T., Tanır, G., Bayhan, G. İ., Öz, F. N., Metin, Ö., & Özkan, Ş. (2017). Clinical and microbiological features of resistant gram-negative bloodstream infections in children. *Journal of Infection and Public Health*, 10(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.04.011>
- Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS). Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). (2022). Secretaría de Salud, Gobierno de México.
- Bravo, A. (2023). Informe Anual 2022 de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS). Instituto Nacional de Pediatría, Comité de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (CIAAS). Ref.: CIAAS-006-2022
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>

- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum  $\beta$  - lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- CLSI. (2017). *Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, M58. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100, 33rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cordovana, M., Abdalla, M., & Ambretti, S. (2020). Evaluation of the MBT STAR-Carba Assay for the Detection of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and Hafniaceae with a Large Collection of Routine Isolates from Plate Cultures and Patient-Derived Positive Blood Cultures. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1298–1306. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0466>
- Costa, S. P., & Carvalho, C. M. (2022). Burden of bacterial bloodstream infections and recent advances for diagnosis. *Pathogens and Disease*, 80(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftac027>
- Fernández-García, O. A., González-Lara, M. F., Villanueva-Reza, M., de-León-Cividanes, N., Xancal-Salvador, L. F., Esteban-Kenel, V., Cárdenas-Ochoa, A., Cervantes-Sánchez, A., Martínez-Gamboa, A., Ochoa-Hein, E., Galindo-Fraga, A., Bobadilla-del-Valle, M., Sifuentes-Osornio, J., & Ponce-de-León, A. (2022).



Outbreak of NDM-1-Producing *Escherichia coli* in a Coronavirus Disease 2019 Intensive Care Unit in a Mexican Tertiary Care Center. *Microbiology Spectrum*, 10(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02015-21>

Finello, M., Suasnabar, D. F., García, M. de J., Díaz, M. V., Richetta, L., Toranzo, A., Hernández, D., Cometto, M. A., Vázquez, S. M., Caeiro, J. P., Sierra, J., & Saad, E. J. (2021). Características clínicas y microbiológicas de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes adultos neutropénicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(3), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.11.001>

Garza-González, E., Bocanegra-Ibarias, P., Bobadilla-del-Valle, M., Ponce-de-León-Garduño, L. A., Esteban-Kenel, V., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., López-Jácome, L. E., Colin-Castro, C. A., Franco-Cendejas, R., Flores-Treviño, S., Morfín-Otero, R., Rojas-Larios, F., Mena-Ramírez, J. P., Fong-Camargo, M. G., Morales-De-la-Peña, C. T., García-Mendoza, L., Choy-Chang, E. V., Camacho-Ortiz, A. (2021). Drug resistance phenotypes and genotypes in Mexico in representative gram-negative species: Results from the infivar network. *PLOS ONE*, 16(3), e0248614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248614>

Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Instrucciones de uso MBT STAR-Carba IVD Kit. Alemania: Bruker Daltonics GmbH & Co. KG; 2021. REF 1848467

Instrucciones de uso MBT STAR-Cepha IVD Kit. Alemania: Bruker Daltonics GmbH & Co. KG; 2021. REF 1858555

- Instructions for Use MBT Sepsityper IVD Kit. Alemania: Bruker Daltonics GmbH & Co. KG; 2022. REF 1834338
- Iyer, R. N. (2022). Beta lactam. In *Comprehensive Pharmacology* (pp. 3–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00212-7>
- Kaprou, G. D., Bergšpica, I., Alexa, E. A., Alvarez-Ordóñez, A., & Prieto, M. (2021). Rapid Methods for Antimicrobial Resistance Diagnostics. *Antibiotics*, 10(2), 209. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020209>
- Lasserre, C., de Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., & Tandé, D. (2015). Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2163–2171. <https://doi.org/10.1128/JCM.03467-14>
- Yu, J., Liu, J., Li, Y., Yu, J., Zhu, W., Liu, Y., & Shen, L. (2018). Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0274-9>
- Marroki, A., & Bousmaha-Marroki, L. (2022). Antibiotic Resistance Diagnostic Methods for Pathogenic Bacteria. In *Encyclopedia of Infection and Immunity* (pp. 320–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00133-6>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>

- Miltgen, G., Plésiat, P., Mille, A., Chatelain, P., & Fournier, D. (2018). Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Microbiological Methods*, 145, 66–68. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.12.011>
- Mun, S. J., Kim, S.-H., Kim, H.-T., Moon, C., & Wi, Y. M. (2022). The epidemiology of bloodstream infection contributing to mortality: the difference between community-acquired, healthcare-associated, and hospital-acquired infections. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 336. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07267-9>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nomura, F., Tsuchida, S., Murata, S., Satoh, M., & Matsushita, K. (2020). Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clinical Proteomics*, 17(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12014-020-09278-7>
- O'Donnell, J. N., Rhodes, N. J., Miglis, C. M., Zembower, T. R., Qi, C., Hoff, B. M., Barr, V. O., Gilbert, E. M., Bolon, M. K., Malczynski, M., Gener, J., Tran, C., Catovic, L., Postelnick, M. J., Sutton, S. H., & Scheetz, M. H. (2022). Impact of early antimicrobial stewardship intervention in patients with positive blood cultures:

results from a randomized comparative study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(2), 106490.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106490>

Ota, Y., Furuhashi, K., Hirai, N., Ishikawa, J., Nagura, O., Yamanaka, K., & Maekawa, M. (2021). Evaluation of MBT STAR-Cepha and MBT STAR-Carba kits for the detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemase producing microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 183, 106166. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106166>

Ota, Y., Furuhashi, K., Hirai, N., Nagao, Y., Ishikawa, J., Nagura, O., Yamashita, K., & Maekawa, M. (2023). Utility of the MBT STAR-Cepha kit in detecting extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producers in clinical urine samples and positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 211, 106756. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106756>

Ota, Y., Furuhashi, K., Nagao, Y., Nanba, T., Yamanaka, K., Ishikawa, J., Nagura, O., Iwaizumi, M., Hamada, E., & Maekawa, M. (2019). Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing Enterobacteriaceae using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based MBT STAR-BL software module with  $\beta$ -lactamase inhibition assay depends on the bacterial strains. *Journal of Microbiological Methods*, 167, 105734. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105734>

- Oviaño, M., Rodríguez, B., Caballero, J. & Muñoz, J. (2019). 65. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISBN: 978-84-09-10307-2
- Palzkill, T. (2018). Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00016>
- Pai, S., Enoch, D. A., & Aliyu, S. H. (2015). Bacteremia in children: epidemiology, clinical diagnosis and antibiotic treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(9), 1073–1088. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1063418>
- Patel, R. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), 564–572. <https://doi.org/10.1093/cid/cit247>
- Rapp, E., Samuelsen, Ø., & Sundqvist, M. (2018). Detection of carbapenemases with a newly developed commercial assay using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.008>
- Schöneweck, F., Schmitz, R. P. H., Reißner, F., Scherag, A., Löffler, B., Pletz, M. W., Weis, S., Brunkhorst, F. M., & Hagel, S. (2021). The epidemiology of bloodstream infections and antimicrobial susceptibility patterns in Thuringia, Germany: a five-year prospective, state-wide surveillance study (AlertsNet).

Antimicrobial Resistance & Infection Control, 10(1), 132.

<https://doi.org/10.1186/s13756-021-00997-6>

Serna, C., & Gonzalez-Zorn, B. (2022). Antimicrobial resistance and One Health.

Revista Española de Quimioterapia, 35(Suppl3), 37–40.

<https://doi.org/10.37201/req/s03.09.2022>

Tsubasa Y., Kentaro K., Yumiko F., Takahiro Y., Osamu U., Kentaro W., & Zenzo N.

(2023). Performance Evaluation of MBT STAR-Carba / MBT STAR-Cepha Kit

by MALDI Biotyper for Carbapenemase or Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase

Producing Gram Negative Bacilli. Biomed J Sci & Tech Res, 53(3). BJSTR.

MS.ID.008416

WHO policy guidance on integrated antimicrobial stewardship activities. Geneva: World

Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.