

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

*Caracterización fenotípica y proteómica (MALDI-TOF MS) de Bacilos
Gram negativos multirresistentes aislados en un Hospital
Universitario Chileno*

Autor

Boris Barrera Vega

Directores/as:

Dr. Katherine García Jara

Dr. Vicente Gómez López

Murcia, enero de 2023

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

*Caracterización fenotípica y proteómica (MALDI-TOF MS) de
Bacilos Gram negativos multirresistentes aislados en un Hospital
Universitario Chileno*

Autor/a:

Boris Barrera Vega

Directores

Dr. Katherine García Jara

Dr. Vicente Gómez López

Murcia, enero de 2023



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. Katherine García y el Dr. Vicente Gomez Lopez como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización fenotípica y proteómica (MALDI-TOF MS) de Bacilos Gram negativos multirresistentes aislados en un Hospital Universitario Chileno” realizada por Boris Barrera Vega en el Programa de Doctorado En ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 07 de enero de 2023.

Vicente Gómez López

Katherine García Jara

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado

RESUMEN

Introducción: En la última década se ha observado un incremento en el número de bacilos Gram negativos multirresistente hospitalarios productores de β -lactamasas de tipo BLEE y Carbapenemasas que son codificadas en elementos genéticos móviles. Por lo anterior la premura de tener resultados se ha convertido en un desafío para los laboratorios de microbiología clínica. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta que ha revolucionado el diagnóstico microbiológico. La gran especificidad de los espectros obtenidos, la rapidez con que se obtienen resultados y su relativamente bajo costo por muestra analizada han hecho de MALDI-TOF la técnica preferida para realizar estudios de comparación de poblaciones y la identificación de clones epidemiológicos.

Materiales y métodos: Esta investigación fue un estudio experimental-retrospectivo no intervencional, que se realizó en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se recolectaron 193 cepas de Enterobacterales y Bacilos Gram negativos no fermentadores multirresistente aislados de pacientes, desde octubre 2018 hasta marzo 2019. Estas cepas se caracterizaron por su susceptibilidad a

diferentes antimicrobianos por sistema Vitek, mecanismos de resistencia por CIM, colorimetría, inmunocromatografía y espectrometría de masas. Finalmente, sus relaciones clonales se analizaron por espectrometría de masas y electroforesis de campo pulsado.

Resultados: La distribución de cepas con un perfil de multirresistencia, con resistencia a por lo menos 3 familias de antimicrobianos, fue: *Klebsiella pneumoniae* 64 (33.2%), *Escherichia coli* 57 (29.5%), *Pseudomonas aeruginosa* 33 (17.1%), *Enterobacter hormaechei* 9 (4.7%), *Enterobacter cloacae* 8 (4.2%), *Klebsiella oxytoca* 8 (4.2%), *Proteus mirabilis* 6 (3.1%), *Enterobacter aerogenes* 3 (1.5%) *Morganella morganii* 2 (1.0%), *Proteus vulgaris* 2 (1.0%), *Raoultella planticola*. 1 (0.5%). La determinación de BLEE y Carbapenemasas por sistema MALDI-TOF MS tuvo un 100 y 93% de sensibilidad respectivamente, la biotipificación proteómica no indicó brotes clonales de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y al comparar con electroforesis de campo pulsado no se encontró una relación de homogeneidad.

Conclusión: Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir que la metodología MALDITOF MS realizada en equipo VITEK® MS

detecta de forma efectiva las BLEE y carbapenemasas, además permite realizar dendrogramas proteómicos para estudios epidemiológicos en tiempo real con el potencial de convertirse en una herramienta comparable con electroforesis de campo pulsado. Finalmente, la tecnología MALDI-TOF MS ha comprobado ser una metodología de fácil implementación que permite una rápida identificación de microorganismos con resultados dentro de 24 horas posteriores al primer aislamiento de bacterias posiblemente de origen clonal, para así tener un control rápido y oportuno ante un brote infeccioso.

ABSTRACT

Introduction: In the last decade, there has been an increase in the number of clinical-isolated, multiresistant Gram-negative bacilli that produce ESBL-type β -lactamases and carbapenemases that are encoded in mobile genetic elements. Therefore, the urgency of obtaining results has become a challenge for the laboratories of clinical microbiology. MALDI-TOF mass spectrometry is a tool that has revolutionized microbiological diagnosis. The high specificity of the spectra obtained, the quickness with which results are obtained, and its relatively low cost per sample analyzed have made MALDI-TOF the preferred technique for population comparison studies and epidemiological clone identification.

Materials and methods: This research was a non-interventional experimental-retrospective study, which was carried out in the laboratory of Microbiology of the Clinical Hospital at Universidad de Chile. 193 strains of multiresistant Enterobacteriales and non-fermenting Gram-negative Bacilli were isolated from patients, from October 2018 to March 2019. These strains were characterized by their susceptibility to different antimicrobials by the Vitek system, resistance mechanisms by MIC, colorimetry,

immunochromatography and mass spectrometry. Finally, their clonal relationships were analyzed by mass spectrometry and pulsed field electrophoresis.

Results: The distribution of strains with a multiresistance profile, with resistance to at least 3 families of antimicrobials, was: *Klebsiella pneumoniae* 64 (33.2%), *Escherichia coli* 57 (29.5%), *Pseudomonas aeruginosa* 33 (17.1%), *Enterobacter hormaechei* 9 (4.7%), *Enterobacter cloacae* 8 (4.2%), *Klebsiella oxytoca* 8 (4.2%), *Proteus mirabilis* 6 (3.1%), *Enterobacter aerogenes* 3 (1.5%), *Morganella morganii* 2 (1.0%), *Proteus vulgaris* 2 (1.0%), *Rautella planticola*. 1 (0.5%). Determination of ESBL β -lactamases and carbapenemases by the MALDI-TOF MS system had a 100 and 93% sensitivity respectively, the proteomic biotyping did not indicate clonal outbreaks of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and when compared with pulsed field electrophoresis no homogenic relationship was found.

Conclusion: The results obtained in this study allow us to conclude that the MALDITOF MS methodology carried out in the VITEK® MS equipment effectively detects ESBL β -lactamases and carbapenemases, but also allows producing proteomic dendrograms for epidemiological studies in real time

with the potential to become a tool comparable to pulsed field electrophoresis. Finally, the MALDI-TOF MS technology has proven to be an easy-to-implement methodology that allows rapid identification of microorganisms with results within 24 hours after the first isolation of bacteria of possibly clonal origin, to have rapid and timely control before an infectious outbreak.

PALABRAS CLAVE

**Malditof, proteómica, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
Pseudomonas aeruginosa, clonalidad**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutora la Doctora Katherine García por el apoyo incondicional en la tesis, por su buena disposición, por el apoyo incondicional. Katherine es una joven científica e investigadora con una enorme sabiduría, siempre tenía una palabra de aliento, de ánimo. Agradecido infinitamente.

Agradezco también a mis compañeros y compañeras del laboratorio de microbiología de la Universidad de Chile, que siempre me apoyaron con su excelente disposición y amistad.

Agradecer a la Universidad Autónoma de Chile y a la Universidad Católica de Murcia por la oportunidad de realizar el doctorado, en vuestra institución y por la confianza depositada.

Y, por último, agradecer a mi familia por el apoyo incondicional en cada momento, especialmente a mi esposa Lorena (mi Castillito, te amo muchito) por estar siempre a mi lado, por escucharme y por ayudar muchas veces en la redacción de los escritos. Agradezco a mis 3 hijos Pablo, Maka y Monse por siempre estar ahí, por su cariño y amor, los amo hasta el infinito y mas allá. Agradezco a la vida por la llegada de mi nieta Julieta que me convirtió en Tata, bebida hermosa te estoy amando, hasta el infinito y mas allá.

"La manera como se presentan las cosas no es la manera como son. Si las cosas fueran como se presentan, la ciencia entera sobraría" (Karl Marx).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
I - INTRODUCCIÓN	31
II- MARCO TEORICO	38
1.1 Infecciones asociadas a la atención de salud.....	38
1.2 Programa nacional de prevención y control de IAAS.....	39
1.3 Microorganismos de importancia en salud pública en Chile.....	41
1.3.1 Prevalencia por tipo de infección.....	41
2.0 Enterobacteriales.....	42
2.1 Estructura de los enterobacteriales.....	44
2.2 Factores de virulencia.....	44
2.2.1 Endotoxina.....	45
2.2.2 Capsula.....	45
2.2.3 Variación de fase antigénica.....	45
2.2.4 Sistema de secreción tipo III.....	46
2.2.5 Secuestro de factores de crecimiento.....	46
2.2.6 Resistencia al efecto bactericida del suero.....	46
2.2.7 Resistencia antimicrobiana.....	46
2.3 <i>Escherichia coli</i>	47
2.4 <i>Klebsiella</i>	48

	15
3.0 Bacilos Gram negativos no fermentadores.....	49
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
4.0 Antibioticos y su mecanismo de acción.....	51
4.1 Clasificación de los antimicrobianos.....	52
4.1.1 Según su origen.....	52
4.1.2 Según la actividad que tengan sobre los microorganismos.....	52
4.1.3 Según su espectro de acción.....	53
4.1.4 Según su estructura química.....	53
4.1.5 Según mecanismo de acción.....	56
4.2 Antibióticos β - lactámicos.....	57
4.2.1 Penicilinas.....	58
4.2.2 β - lactámico con inhibidor de betalactamasas.....	59
4.3 Cefalosporinas.....	59
4.4 Monobactámicos y Carbapenémicos.....	61
5.0 Resistencia de las bacterias a los antibióticos betalactámicos.....	63
5.1 Tipos de betalactamasas.....	64
5.1.1 Betalactamasas de tipo BLEA.....	64
5.1.2 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).....	65
5.1.3 Carbapenemasas.....	67
6.0 Estudio de clonalidad y su importancia epidemiológica.....	77

6.1	Técnicas moleculares de tipificación.....	78
6.2	Espectrofotometría de masas y MALDITOF como herramientas para estudios de clonalidad bacteriana y detección de mecanismo de resistencia.....	81
7.0	Datos epidemiológicos en Chile.....	84
III -	OBJETIVOS.....	90
8.0	Objetivo General.....	92
9.0	Objetivos específicos.....	92
IV -	MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
10.0	Cepas, identificación, susceptibilidad y mecanismo de resistencia.....	96
11.0.	Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y Carbapenemasas utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.....	101
12.0	Biotipificación Proteómica de Bacilos Gram negativos multirresistentes utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.....	103
13.0	Estudio de clonalidad por Técnica de campo pulsado.....	105
V -	RESULTADOS.....	108
1.-	Cepas, susceptibilidad y mecanismo de resistencia.....	109
2.-	Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de tipo Carbapenemasas utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.....	120
3.-	Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de tipo betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.....	126
4.-	Biotipificación Proteomica de Bacilos Gram negativos multirresistentes utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.....	131
5.-	Estudio comparativo de 24 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> usando Biotipificación proteómica y Campo pulsado.....	143
VI -	DISCUSIÓN.....	147

1.- Detección de Enterobacteriales y Bacilos Gram negativos no fermentadores productoras de β eta-lactamasas de tipo carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS.....	151
2.- Detección Enterobacteriales productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante MALDI-TOF MS.....	154
3.- Estandarizar la tecnología MALDI-TOF MS en estudios epidemiológicos de las cepas basado en la hetero / homogeneidad de los espectros obtenidos, utilizando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado como patrón de comparación y detección de la distribución, frecuencia y clonalidad proteómica de las cepas en estudio (6 meses de recolección de cepas) en las diferentes unidades y servicios del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.	156
VII - CONCLUSIONES.....	167
IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
BGNMR	: Bacilos Gram negativos multirresistentes
BLEA	: Betalactamasas de espectro ampliado
BLEE	: Betalactamasa de espectro extendido
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EM	: Espectrometría de masas
IAAS	: Infecciones asociadas a la atención de salud
ITU	: Infecciones del tracto urinario
KPC	: Carbapenemasas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	: Lipopolisacarido
MALDITOF MS	: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MDR	: Multiple drug resistance
M.O	: Microorganismo
NDM	: Metalocarbapenemasas de tipo New Dheli
OXA	: Oxacilinas
PBP	: Penicillin binding protein
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PDR	: Pandrug resistance
PGGE	: Electroforesis de campo pulsado
UCI	: Unidad de cuidados intensivo
VISA	: <i>Staphylococcus aureus</i> intermedio a la vancomicina
VRSA	: <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la vancomicina
XDR	: Extensively drug resistance

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de carbapenemasas.....	68
Figura 2. Esquema de comunicación de los software y equipo Vitek MS	97
Figura 3. Procedimiento test comercial OKNVI Resist-5.....	100
Figura 4. Placa metálica que contiene 48 pocillos separados en 3 grupos.....	103
Figura 5. Ejemplo Data entry Screen.....	104
Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas <i>K. pneumoniae</i>	114
Figura 7. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas <i>E. coli</i>	115
Figura 8. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas <i>P.aeruginosa</i>	116
Figura 9. Test Carba NP Directo.....	117
Figura 10. Test de inmunoicromatografía (Coris®).....	117
Figura 11. Informe estudio de susceptibilidad sistema Vitek 2 Compact ®.....	119
Figura 12. Espectros correspondientes al ertapenem hidrolizado y no hidrolizado	120
Figura 13 Comparación del espectro del ertapenem incubados con las cepas controles productores de KPC y NDM versus el espectro del ertapenem no hidrolizado.....	121
Figura 14. Comparación de los espectros del ertapenem incubados con cepa productora de BLEE cepa control productora de de KPC y ertapenem no hidrolizado.....	121
Figura 15. Comparación de espectros del ertapenem incubado con cepa productora de KPC, cepa no productora de carbapenemasas y ertapenem no hidrolizado..	122
Figura 16. Cálculo sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.	125

Figura 17. Espectros correspondientes a la ceftriaxona hidrolizada y no hidrolizada.....	126
Figura 18. Espectros de la ceftriaxona incubada con <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (control negativo).....	127
Figura 19. Espectros de la ceftriaxona incubadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (Control positivo).....	127
Figura 20. Espectros de la ceftriaxona incubada con <i>Escherichia coli</i> ATCC (cepa clínica 2 BLEE +).....	128
Figura 21. Espectros de la ceftriaxona incubadas con <i>Klebsiella pneumoniae</i> (cepa clínica 14 BLEE +).....	129
Figura 22. Cálculo sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.....	130
Figura 23. Dendrograma total de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=38) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad.....	133
Figura 24. Dendrogramas con procedencias pertenecientes a la unidad de paciente crítico.....	134
Figura 25. Dendrogramas utiizando las muestras de urocultivo.....	134
Figura 26. Dendrograma del total de cepas de <i>Escherichia coli</i> (n=44) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad.....	138
Figura 27. Dendrogramas de cepas de <i>Escherichia coli</i> con procedencia del servicio de unidad de cuidados intensivo (UCI).....	138
Figura 28. Dendrograma de cepas de <i>Escherichia coli</i> con procedencia del servicio de Intermedio médico.....	139
Figura 29. Dendrograma de cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de urocultivos.....	139
Figura 30. Dendrograma del total de cepas de <i>P. aeruginosa</i> (n=26) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad.....	142
Figura 31. Dendrograma del total de cepas pertenecientes a la UCI.....	143
Figura 32. Dendrograma del total de cepas aisladas en AET.....	143
Figura 33. Dendrograma Proteómico de 24 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	144
Figura 34. Electroforesis de campo pulsado de 24 cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	145

Figura 35. Dendrograma proteómico y electroforesis de campo pulsado de cepas de *K. pneumoniae*.....146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación resultados Carba NP Directo.....	100
Tabla 2. Tipos de muestras biológicas.....	109
Tabla 3. Distribución de cepas de enterobacteriales, según tipo de muestra, servicio y resultado de estudio fenotípico de BLEE y Carbapenemasas.....	110
Tabla 4. Distribución de cepas de <i>K. pneumoniae</i> , según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE y Carbapenemasas y susceptibilidad...	111
Tabla 5. Distribución de cepas de <i>E. coli</i> , según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE y Carbapenemasas y susceptibilidad.....	112
Tabla 6. Distribución de cepas de <i>P. aeruginosa</i> , según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE y Carbapenemasas y susceptibilidad...	113
Tabla 7. Valores porcentuales del estudio de susceptibilidad de <i>K. pneumoniae</i> ...	114
Tabla 8. Valores porcentuales del estudio de susceptibilidad de <i>E. coli</i>	115
Tabla 9. Valores porcentuales del estudio de susceptibilidad de <i>P. aeruginosa</i>	116
Tabla 10. Detección de carbapenemasas.....	117
Tabla 11. Distribución de las carbapenemasas.....	118
Tabla 12. Detección de cepas productoras de BLEE.....	119
Tabla 13. Distribución de cepas productoras de BLEE.....	119
Tabla 14. Descripción de la presencia/ausencia del pico del ertapenem en las cepas estudiadas.....	123
Tabla 15. Identificación de cepas productoras de carbapenemasas, BLEE y no productoras de enzimas hidrolíticas con Carba NP y RUO-SARAMIS.....	124
Tabla 16. Resultados de la acción de las carbapenemasas por Vitek® MS.....	125
Tabla 17. Resultados de la acción de las cepas BLEE por Vitek (r) MS.....	130
Tabla 18. Porcentajes de resistencia a los antibióticos de <i>K. pneumoniae</i> BLEE+.....	131
Tabla 19. Tipo de muestras.....	131
Tabla 20. Total de muestras por procedencia.....	132
Tabla 21. Porcentajes de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a antibióticos.....	135

Tabla 22. Cantidad porcentual de cepas de <i>Escherichia coli</i> por procedencia del hospital.....	136
Tabla 23. Cantidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> por tipo de muestra.....	136
Tabla 24. Porcentajes de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a antibióticos.....	140
Tabla 25. Cantidad de cepas de <i>P. aeruginosa</i> por tipo de muestra.....	141
Tabla 26. Cepas <i>P. aeruginosa</i> por procedencia del Hospital.....	141

I – INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha observado un incremento en el número de bacilos Gram negativos multirresistente (BGNMR) productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y más recientemente, de carbapenemasas, aislados desde el medio hospitalario. Aunque la tecnología y los avances científicos son cada vez mayores, la resistencia producida por estas bacterias aún no puede ser controlada, debido a la capacidad de adaptación que poseen estos microorganismos (MO) a sobrevivir en medios adversos, lo que incluye generar mecanismos de resistencia a diversos antibióticos (1).

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública, ya que los MO evaden el tratamiento necesario en pacientes con patologías infecciosas, lo que puede llevar a una prolongación de la estadía hospitalaria como también en muchos casos a la muerte o a algún tipo de discapacidad. En consecuencia, si no se poseen antimicrobianos eficaces, ningún otro tratamiento será capaz de erradicar la infección (2).

Es alarmante la alta probabilidad que en un futuro cercano no existan tratamientos efectivos contra estas BGNMR. Por esta razón resulta relevante tomar medidas epidemiológicas de control en la propagación de estos MO multirresistentes y la caracterización de cada uno de sus diferentes mecanismos de resistencia y comportamiento clonal. Sin olvidar que el comportamiento de la población es primordial, ya que el uso indiscriminado o incorrecto de antibióticos es la mayor causa de MO multirresistentes, constituyendo una amenaza para la salud pública mundial,

siendo necesario tomar medidas por parte de los diferentes gobiernos y de la sociedad (2).

El problema de la multirresistencia en los bacilos Gram negativos, es especialmente preocupante ya que se han podido desarrollar resistencias a la totalidad de los antibióticos, limitando las opciones terapéuticas a estas infecciones. El CDC en su informe *Antimicrobial Resistance Threats* (3), incluyó a los enterobacteriales productoras de BLEE y carbapenemasas, junto con *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, como patógenos de especial interés epidemiológico, ya que con frecuencia causan infecciones en el ámbito hospitalario, asociadas a elevada morbimortalidad (4).

A nivel microbiológico, el proceso por el que una bacteria desarrolla un fenotipo de multirresistencia es complejo. La adquisición de resistencia a los antibióticos puede ser multifactorial, por ejemplo, por una mutación a nivel cromosómico o bien por adquisición de genes localizados en elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones). Este último mecanismo constituye una de las vías más eficaces para la propagación de las resistencias. La diseminación de las bacterias multirresistentes se ha asociado a los denominados clones de alto riesgo. Estos clones son capaces de acumular mutaciones y genes de resistencia localizados en elementos genéticos que permiten su persistencia (integrones) y transferencia (plásmidos y transposones) (5, 6).

El laboratorio de microbiología juega un rol fundamental en el diagnóstico a través de nuevos métodos, más sensibles, rápidos y que permiten la identificación de nuevas cepas resistentes evitando que éstas se propaguen a la comunidad. La entrega de este

diagnóstico certero permitirá que se puedan tomar medidas, por ejemplo, las precauciones de contacto para evitar infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS), entre otros.

Todo lo descrito anteriormente hace que la terapia antibiótica adecuada que va a requerir la mayor parte de los pacientes hospitalizados con un proceso infeccioso, necesite de un diagnóstico microbiológico eficaz (7). En la práctica clínica, este proceso puede tardar de 24 a 72 horas, en las cuales el médico aplica una terapia empírica basada en la sospecha del probable agente causal y la epidemiología local. El uso de métodos que sean capaces de detectar rápidamente la resistencia antibiótica en aislados clínicos, tiene el potencial de reducir la duración de la terapia empírica y así emplear un antibiótico dirigido al agente infeccioso. Esto es importante ya que estudios demuestran que la administración de una terapia antibiótica temprana y adecuada, mejora el pronóstico del paciente y que por el contrario el retraso en la instauración de una terapia antimicrobiana apropiada se relaciona con altos índices de morbilidad y mortalidad (8-9). Además, el diagnóstico temprano de la resistencia antibiótica ayuda a reducir los costos de hospitalización y contribuye al uso racional de los antibióticos (10).

Los métodos utilizados de rutina diagnóstica son los que se basan en la detección de la resistencia fenotípica midiendo el desarrollo bacteriano en la presencia de un antibiótico. La ventaja de estos métodos es su sensibilidad, ya que podemos detectar en la mayoría de los casos la resistencia a un antibiótico independiente del mecanismo de resistencia. El inconveniente, es que necesitan el desarrollo del patógeno para poder distinguir entre aislados sensibles y resistentes. La desventaja es la menor sensibilidad con respecto a los métodos moleculares y la necesidad de tener aislado el

microorganismo causal. El desarrollo de los métodos moleculares ha facilitado la detección precoz de la resistencia a los antibióticos con gran sensibilidad y especificidad, sin embargo, el alto costo de estas metodologías y la necesidad de personal entrenado para realizarlas, las deja al alcance de pocos laboratorios de microbiología clínica. Los métodos proteómicos, mediante espectrometría de masas (EM) *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* o *ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo* MALDI-TOF MS han demostrado ser una buena alternativa para la determinación de resistencias antibióticas con excelentes valores de sensibilidad y especificidad (11,12 y 13).

La EM es una técnica de determinación estructural que permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Un espectro de masas es una relación de las especies iónicas presentes en una muestra, expresadas en función de su masa/carga (m/z) y la abundancia relativa (intensidad) de cada una en la muestra (17). MALDI-TOF ha permitido la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (18). Fue a finales de los años noventa que se encontró que la aplicación de la espectrometría de masas en células bacterianas enteras producía espectros de proteínas característicos y reproducibles que podían utilizarse para la identificación bacteriana a nivel de género y especie (18).

La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies, siendo la

mayoría de los espectros de masas del MALDI-TOF proteínas muy conservadas que son afectadas en un grado mínimo por las condiciones ambientales y de cultivo (17). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes, por lo que la capacidad de agregar espectros y construir bases de datos personalizadas es importante para un análisis discriminatorio adicional usando MALDI-TOF MS que, además, permita la tipificación de cepas e investigaciones epidemiológicas.

El sistema MALDI-TOF se ha introducido en el laboratorio de Microbiología Clínica en el campo de la detección de la resistencia a los antibióticos, especialmente utilizándose como un método rápido. Así, se puede determinar la resistencia a través de la medida de la actividad enzimática, detección de la resistencia a través del análisis del perfil proteico microbiano y detección de la resistencia a través del análisis de los efectos antibióticos que se producen sobre el crecimiento microbiano.

Además, se puede utilizar esta tecnología para estudios de tipificación. Los sistemas de tipificación bacteriana permiten diferenciar cepas pertenecientes a una misma especie que poseen determinados vínculos epidemiológicos. La gran especificidad de los espectros de proteínas obtenidos mediante MALDI-TOF ha permitido realizar estudios de comparación de poblaciones y de identificación de clones epidemiológicos. Este tipo de análisis posibilita, entre otros aspectos, el estudio de brotes hospitalarios facilitando tanto su detección precoz como la caracterización de modelos de transmisión de infecciones entre personas, material inanimado y el diseño de medidas de control (19).

El análisis epidemiológico se puede realizar mediante comparación de los espectros generados con una librería construida con aislados caracterizados molecularmente. También se puede realizar la tipificación o caracterización proteica de un microorganismo a través de la identificación de pequeños péptidos o proteínas que aparecen en el espectro de masas. La presencia/ausencia de determinados picos de proteínas utilizados como biomarcadores y con ciertas características microbiológicas, pueden llegar a identificar clones epidemiológicos e incluso ser marcadores de resistencia a ciertos antimicrobianos (17).

Se ha demostrado que MALDI-TOF MS puede usarse para identificar *Staphylococcus aureus*, discriminando entre *S. aureus* resistente a la *meticilina* (MRSA) y algunos subtipos (20). En *Klebsiella pneumoniae* se logró realizar un estudio de resistencia analizando los perfiles mediante MALDI-TOF (21) y detectar grupos clonales en *Escherichia coli* productores de BLEE, teniendo alto rendimiento de detección (22).

Existen numerosos trabajos donde se ha comprobado que la EM es altamente eficiente en la identificación bacteriana y en la determinación de resistencia. Existen 2 líneas de proveedores que distribuyen mayoritariamente a nivel mundial esta metodología (MALDI-TOF). Uno de ellos el *BD™ Bruker MALDI Biotyper* en el cual existen diversos estudios de detección de carbapenemasas, BLEE y de proteómica bacteriana. El otro es el MALDI-TOF MS (VITEK® MS | BIOMÉRIEUX), sin embargo hay pocos estudios donde se involucra este equipo, principalmente porque es un equipo orientado principalmente al diagnóstico directo de las cepas bacterianas, sin embargo la empresa proveedora instaló una aplicación que permite desarrollar nuevas prestaciones (18, 19).

En consecuencia, en esta investigación se busca estandarizar un protocolo aplicable a VITEK® MS para la caracterización fenotípica y proteómica de aislados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (aislados de pacientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile), con la expectativa de encontrar información que permita caracterizar clones bacterianos en tiempo de real, además de implementar protocolos para la detección de mecanismos de resistencia (BLEE y Carbapenemasas). El análisis de la distribución de estos clones en los diferentes servicios y unidades del hospital permitirá determinar la viabilidad epidemiológica de este tipo de metodología para ser una herramienta eficaz en el tratamiento de los pacientes.

1.0 MARCO TEÓRICO

1.1 Infecciones Asociadas a la atención en salud

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) son un gran problema que requiere de vigilancia epidemiológica, debido a que estos generan un aumento en la morbilidad y mortalidad. Son infecciones que el paciente no presenta cuando se realizó la atención médica, ni se encuentran en período de incubación. Estas infecciones súbitamente se desarrollan cuando el paciente está hospitalizado por más de 48 horas o después de la hospitalización, generando un aumento considerable de días en el centro asistencial, aumentando así los costos, provocando un impacto en el enfermo y en su familia (29).

Otras consecuencias que generan las IAAS además de la prolongación de la estadía y del gasto que las familias deben soportar, es la complicación de la enfermedad inicial que llevó a ese paciente a necesitar hospitalización.

Los factores que pueden desencadenar una IAAS, van desde el estado inicial del paciente y las patologías que este posea, los procedimientos e intervenciones que necesite, incluso el ambiente hospitalario donde se encuentre.

1.2 Programa nacional de prevención y control de IAAS

Los programas de prevención que existen hoy en nuestro país van dirigidos a los procesos de atención, ya que estos son muy modificables para prevenir una IAAS.

El programa nacional de prevención y control de IAAS (PNCI), dirigido por el Ministerio de Salud, *“tiene por objetivo disminuir las tasas de infecciones asociadas a procedimientos de atención en salud y los brotes epidémicos”* (30).

En este informe se detalla que la Vigilancia Epidemiológica en el PNCI, es relevante para identificar la causa del problema, y una vez identificada la causa, analizar el impacto que provoca para poder crear las intervenciones correspondientes y tomar las medidas necesarias, permitiendo que exista el menor impacto posible dentro del centro hospitalario (30).

Los objetivos de la Vigilancia Epidemiológica de las IAAS son: *“permitir tener conocimiento sobre factores de riesgo involucrados, conocer la tasa mortalidad y la morbilidad que causa un cierto microorganismo en un período de tiempo, y también identificar los brotes epidémicos de manera precoz”* (30).

Así mismo, gracias a la vigilancia se podrán establecer medidas de prevención y control, con la información recopilada y compararlas con otros hospitales.

Según el informe de vigilancia de IAAS en Chile, las infecciones adquiridas en el hospital son en un 90% ocasionadas por bacterias, por lo general multirresistentes y son diseminadas por el personal de salud al paciente hospitalizado a través de sus propias

manos, fómites, sondas, guantes, pecheras las cuales no han sido bien manipuladas debido a malas prácticas de higiene (30).

Para que ocurra una IAAS, se debe tener en cuenta que el agente infeccioso debe transportarse del sitio donde sobrevive y se multiplica, denominado reservorio, a través de un mecanismo de transmisión e ingresar por una puerta de entrada a un sujeto susceptible que podrá o no desencadenar una infección (31).

Según redacta el Ministerio de Salud en la circular N°10 del 2019 “Recomendaciones sobre Aseo y Desinfección de Superficies Ambientales para la Prevención de IAAS”, puede ocurrir que el microorganismo esté presente en el hospedero, pero no desencadenará una infección, en este caso el paciente se denomina como colonizado (31).

Para prevenir las IAAS se debe tener una rigurosa desinfección de las superficies, de los instrumentos médicos y además un estricto lavado de manos del personal de salud.

1.3 Microorganismos de importancia en salud pública en Chile

En Chile, los principales microorganismos que causan IAAS son denominados agentes con resistencia a los antimicrobianos de importancia en Salud Pública (ARAISP), entre ellos podemos encontrar *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con mecanismos de producción de carbapenemasas que sean transferibles a otras bacterias de la misma o distinta especie.

Acinetobacter baumannii resistente a Colistin , enterobacteriales productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) como por ejemplo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* resistente a vancomicina, fenotipos VanA o VanB, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Staphylococcus aureus* con resistencia

intermedia a vancomicina (VISA) o resistente a vancomicina (VRSA), bacterias no mencionadas en este listado con mecanismos de resistencia a antimicrobianos que sean transferibles a otras bacterias de la misma o distinta especie y mecanismos de resistencia antimicrobiana no descritos anteriormente en el país (32).

Según la norma de contención de diseminación de ARAISP, cuando se sospecha de una infección por alguno de estos microorganismos, se debe recolectar y enviar la muestra al Instituto de Salud Pública, quienes confirmarán si se trata de un microorganismo con alguna de las resistencias ya descritas.

La información recopilada de las IAAS que se obtiene mediante un sistema de vigilancia activo, permite calcular tasas de incidencia que son enviadas cada mes para que se realice un análisis a nivel nacional (30).

1.3.1 Prevalencia por tipo de infección

Gracias a los estudios de Vigilancia Epidemiológica de las IAAS, se detectó que a nivel nacional las infecciones urinarias son las que más prevalencia tienen en el país, seguidas de las neumonías sin ventilación mecánica, infecciones de herida operatoria, infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia/septicemia), diarreas y neumonías asociadas a ventilación mecánica (30).

En este mismo informe, se detalla la prevalencia de los microorganismos que más causan IAAS. Los enterobacteriales más prevalentes encontradas en ITU asociadas a catéteres urinarios permanentes en adultos fueron; *Klebsiella pneumoniae* que se encontró en un 25,62%, *Escherichia coli* en un 24,22 % y *Pseudomonas aeruginosa* en un 12,43% (30).

Con respecto a las heridas operatorias, los bacilos Gram negativos que se encontraron fueron *Klebsiella pneumoniae* en un 11,02% y en cuarto lugar *Escherichia coli* con un 8.66% (30).

En relación con las infecciones del torrente sanguíneo, los microorganismos más prevalentes fueron *Klebsiella pneumoniae* con un 12,9 %, *Pseudomonas aeruginosa* 8,79 %, *Escherichia coli* 3,95% (30)

La neumonía asociada a ventilación mecánica invasiva, el agente más prevalente fue *Pseudomonas aeruginosa* 29,15%, *Klebsiella pneumoniae* 19,34% y *Escherichia coli* 3,91% (30).

El control de infecciones se encarga que las cepas junto a sus resistencias no se diseminen entre pacientes, creando medidas de control tales como el uso de precauciones estándar y de otras medidas, si fuera necesario.

Si bien la realización de la vigilancia de la sensibilidad a los antibióticos es compleja, ya que solo se estudian a los agentes que han causado enfermedad grave o que han presentado resistencia a los antibióticos, lo cual puede presentar un sesgo, la utilidad recae en identificar la presencia o aparición de perfiles de resistencia propios.

También puede ser de utilidad para identificar brotes y si estos comparten los mismos o similares patrones de sensibilidad que las IAAS que son vigiladas (30).

2.0 Enterobacterales

La familia de las enterobacterales son un grupo heterogéneo de microorganismos, que forman parte de la microbiota intestinal de los seres humanos y de animales, pero no solo conviven de manera simbiótica, también son capaces de infectar al ser humano a través de múltiples formas, ya sea por los alimentos, el agua, en hospitales o través del personal de salud.

Klebsiella pneumoniae y *Escherichia coli* son microorganismos ubicuos, a pesar de ser un grupo muy amplio, existen pocas especies que causan infección, forman parte de la microbiota intestinal principalmente y no producen ningún daño, sin embargo, se pueden transformar en agentes etiológicos de ITU, de esta manera son considerados patógenos primarios (33).

Microscópicamente se observan como bacilos Gram negativo. Los enterobacteriales tienen una característica en común que es su antígeno enterobacterial, que deriva de carbohidratos que no varían y que están presente en la membrana externa y en el periplasma. Su función es en gran parte desconocida, sin embargo, se cree que permite tener una resistencia a la sales biliares y resistencia a los ácidos orgánicos. Otra característica muy particular que tienen los enterobacteriales es la de no formar esporas. Algunas pueden ser inmóviles o con flagelos peritricos (34, 35). Son anaerobios facultativos. Pueden crecer en Agar sangre o en un Agar selectivo; como por ejemplo Mac Conkey.

La familia de los enterobacteriales reduce los nitratos a nitritos, son capaces de fermentar la glucosa, son catalasa positiva y oxidasa negativa, esta característica de no poseer citocromo oxidasa permite diferenciar a los enterobacteriales de otros bacilos Gram negativos, como lo son, por ejemplo; las *Pseudomonas* o los *Vibrio*, entre otras (24).

2.1 Estructura de los enterobacteriales.

Algunos miembros de esta familia presentan colonias mucoides, de aspecto viscoso y esto se debe a la cápsula que poseen, un ejemplo son las cepas de *Klebsiella spp.*

En la pared celular de los enterobacteriales se encuentra el principal antígeno lipopolisacárido (LPS) termoestable, el cual está compuesto por otros 3 componentes: el polisacárido O (importante para clasificar epidemiológicamente una cepa), un polisacárido central (antígeno común de los enterobacteriales) y el lípido A (el cual tiene actividad endotoxina).

Para estudios epidemiológicos se utilizan 3 grupos de antígenos. Los polisacáridos O somáticos, las proteínas H que son los flagelos, y los antígenos K que se encuentran en la cápsula.

Los enterobacteriales en su mayoría son móviles, poseen flagelos peritricos que permiten el movimiento, pero hay excepciones como *Klebsiella* y *Shigella*.

Las fimbrias o Pili son comunes en los enterobacteriales. Estas fimbrias se dividen en dos clases, Pili sexual o conjugativo que permiten la transferencia genética entre bacterias y las fimbrias comunes codificadas en el cromosoma, que facilitan la adhesión a receptores de la célula hospedera (24).

2.2 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia de la familia de los enterobacteriales son compartidos por algunos géneros, pero hay otros que son exclusivos.

2.2.1 Endotoxina

Dentro de los factores de virulencia, se encuentra la endotoxina. Esta endotoxina depende del lípido A, el cual se libera cuando ocurre una lisis en la bacteria Gram negativa.

Cuando se libera la endotoxina, se secretan citoquinas, además de leucocitosis, trombocitopenias, coagulación intravascular diseminada, fiebre, shock y muerte en los pacientes (24).

2.2.2 Cápsula

La cápsula es otro factor de virulencia. Esta permite a la bacteria evitar la fagocitosis, ya que tiene antígenos capsulares hidrofílicos; los que tienen la función de repeler a la célula fagocítica. También repelen la unión de los anticuerpos generados por el hospedero (24).

2.2.3 Variación de fase antigénica

Es un cambio en la expresión de los antígenos de superficie de las bacterias. En general, la variación de fase es un evento heredable, reversible, aleatorio, y que está regulado por factores externos. Es algo muy parecido a un sistema de interruptores, esto se da principalmente para evadir la respuesta humoral del hospedero.

La variación de fase está relacionada con la virulencia de las cepas bacterianas y se encuentra en estructuras como los pilis, las proteínas de membrana y la superficie como el LPS (24).

2.2.4 Sistema de secreción tipo III

Este sistema es muy útil para la transferencia de factores de virulencia a células blancas eucariotas. No todas lo poseen, pero es característica de algunos enterobacteriales como, por ejemplo; *Escherichia coli enteropatogena*, *Shigella*, *Pseudomonas* entre otras (24).

2.2.5 Secuestro de factores de crecimiento

Los enterobacteriales crean sus propios sideróforos competitivos o compuestos quelantes de hierro denominados enterobactina y aerobactina para secuestrar el hierro. (24).

2.2.6 Resistencia al efecto bactericida del suero

Con la cápsula que poseen pueden evitar el efecto bactericida del suero que generalmente se usa para eliminar las bacterias que han invadido el torrente sanguíneo (24).

2.2.7 Resistencia antimicrobiana

Los enterobacteriales tienen mecanismos de resistencia variados que se han adquirido con el paso de los años y gracias a la presión selectiva de estos.

La resistencia que se encuentra principalmente en los enterobacteriales es a los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos, entre otros. Estas pueden estar codificadas en elementos genéticos móviles, como transposones, integrones y plásmidos, los que pueden ser transferibles entre especies, géneros e incluso familias, transformándose en un grave problema de diseminación intrahospitalaria de estos mecanismos de resistencia (24).

2.3 *Escherichia coli*

Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo corto, no esporulado, además de presentar fimbrias, flagelos peritricos y una variedad de factores de virulencia, como las adhesinas y exotoxinas. Pertenece al microorganismo más frecuente del género *Escherichia* y de la familia *Enterobacteriaceae* (24, 36).

Se encuentra formando parte de la microbiota gastrointestinal de los seres humanos. Si bien la mayor parte de las cepas no son patógenas, cuando se trata de pacientes que presentan un sistema inmunológico disminuido, estas bacterias pueden generar complicaciones graves.

Se relacionan con numerosas enfermedades infecciosas, las que van desde una diarrea autolimitada hasta infecciones que ponen en peligro la vida de las personas como lo son infecciones del tracto urinario, bacteriemias, meningitis, entre otras (37).

Se ha detectado en el último tiempo un aumento de la resistencia de esta bacteria a los antimicrobianos más utilizados en la práctica clínica, en especial a las quinolonas. Esto ha llevado que el tratamiento adecuado de las infecciones por *Escherichia coli* sea un importante desafío a resolver (38, 39).

Desde una perspectiva diagnóstica fenotípica, *Escherichia coli* es indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol positivo además de tener la capacidad de producir gas a partir de la glucosa (40).

2.4 *Klebsiella*

El género *Klebsiella*, perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos. Se pueden observar en el Agar Mac Conkey, con una característica muy especial en sus colonias debido a la cápsula que posee. Sus colonias son de color rosado y de aspecto mucoso. Se pueden encontrar dos especies muy frecuentes: *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*.

Klebsiella pneumoniae es la más conocida por ocasionar IAAS, ya que tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir en el ambiente y en las manos del personal de salud, debido a que tiene una cápsula hidrófila, logrando mantenerse frente a la desecación y condiciones adversas del medio ambiente.

La cápsula también tiene actividad antifagocitaria y protege a la bacteria de los factores bactericidas del hospedero (33).

En la medida que avanza el tiempo, *Klebsiella pneumoniae* se ha convertido en el agente causal de 14-15% de las infecciones de las vías respiratorias, de heridas, y vías urinarias. Posee una variedad de factores de virulencia tales como fimbrias, cápsula anti fagocítica, LPS, sideróforos y transportadores de membrana.

Es capaz de formar biopelículas, que les confieren protección frente a las respuestas inmune del hospedero (42).

Klebsiella pneumoniae es parte de un grupo denominado ESKAPE, que junto a otras bacterias como *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp* y *Staphylococcus aureus* comparten la característica de ser resistente a los antibióticos más importantes que existen (44).

La problemática más relevante de *Klebsiella pneumoniae* es la resistencia a los antimicrobianos. Actualmente, se han descrito dos tipos principales de mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos. Un mecanismo que implica la expresión de BLEE, que hacen que las bacterias sean resistentes a cefalosporinas y monobactams.

El otro mecanismo de resistencia que es más preocupante y corresponde a la expresión de carbapenemasas lo que hace que sean resistentes a casi todos los antibióticos betalactámicos disponibles, incluidos los carbapenémicos (43).

Klebsiella pneumoniae presenta diversas formas de resistencia, una de ellas corresponde a las codificadas cromosómicamente que son capaces de reducir la susceptibilidad de este microorganismo a diferentes antibióticos, algunos de los cuales han sido transferidos a otras bacterias, entre las más importantes son la betalactamasa SHV, el gen de resistencia a fosfomicina *fosA* y a la bomba de expulsión del ácido nalidíxico OqxAB. Además, *Klebsiella pneumoniae* también puede adquirir resistencia a través de la adquisición de genes por medio de transferencia horizontal. Hay evidencia que sustenta que *Klebsiella pneumoniae* juega un rol importante en la transferencia de resistencia a los antibióticos hacia y desde otros microorganismos, incluyendo betalactamasas del tipo carbapenemasas como KPC, OXA o NDM (44).

3.0 Bacilos Gram negativos no fermentadores

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es la especie más importante dentro del género *Pseudomonas*. Este género contiene genomas de aproximadamente 5 a 7 Mbp. Se puede encontrar en múltiples superficies: suelo, agua, vegetación, en compuestos orgánicos en descomposición, en lavados, baños, recintos hospitalarios, entre otros. No es frecuente

encontrarlo en la microbiota del ser humano, salvo en paciente hospitalizados o pacientes inmunodeprimidos, y en funcionarios de la salud. Las infecciones causadas por esta especie son principalmente oportunistas, debido a la destrucción de la microbiota del hospedero por el uso de antibióticos de amplio espectro, lo que deja espacio a *Pseudomonas aeruginosa* para que pueda colonizar en el ser humano. Las infecciones que ocasiona corresponden a infecciones respiratorias, urinarias, de piel, tejidos blandos, oculares, auditivas, así como también bacteriemias y endocarditis. Se pueden identificar con gran facilidad en el laboratorio debido a su desarrollo y olor característico de sus cepas, además que tienen reacción positiva a la oxidasa una prueba bioquímica sencilla de aplicar. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* contienen un número significativo de genes conservados que codifican proteínas reguladoras. Esto sugiere que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de responder a condiciones de estrés del medio ambiente. Además, tiene resistencia intrínseca a los antibióticos debido a la presencia de bombas de expulsión, de impermeabilidad asociadas a la modificación o desaparición de las porinas presentes en su membrana externa principalmente de *pbr22*. Por otra parte, es capaz de formar biopelículas que actúan como barrera protectora contra la penetración de antibióticos. Genéticamente, *Pseudomonas aeruginosa* también puede adquirir resistencia a los antibióticos través de mutaciones o de transferencia horizontal de genes por medio de elementos genéticos móviles (45,46,47,48).

Como tratamiento, se utiliza principalmente antibióticos combinados (Ej, aminoglucósidos y betalactámicos) para tener mayor eficacia debido a sus múltiples mecanismos de resistencia (48).

4.0 Antibióticos y su mecanismo de acción

El uso de antibióticos como terapia para las infecciones de tipo bacterianas, data del siglo pasado y hasta el día de hoy es usado para combatir las infecciones provocadas por bacterias (49).

Un antibiótico es una sustancia química que puede ser sintética o secretada por el metabolismo de un ser vivo como una bacteria o un hongo microscópico.

El primer producto antibacteriano de origen natural fue descubierto por E. de Freudenreich al estudiar la piocianina, el pigmento liberado por la *Pseudomonas aeruginosa*, la misma que impedía el crecimiento de otras bacterias (49).

Rudolf Emmerich y Oscar Loew en 1889, demostraron que el pigmento no solamente inhibe el crecimiento de bacterias, sino también las destruye. En ese mismo año, Paul Vuillemin presenta un concepto llamado “influencias antibióticas”, la cual indica que los seres vivos son capaces de producir ciertos tipos de sustancias químicas que pueden inactivar e incluso terminar con la vida de otros seres vivos (49).

En el año 1908 Paul Ehrlich fue el primero que creó un compuesto sintético llamado arsfenamina, el cual ayudó a curar la sífilis causada por *Treponema pallidum* (49).

Veinte años más tarde, Alexander Fleming mientras estudiaba las variantes cromógenas de *Staphylococcus aureus*, descubrió que en una placa donde se encontraba esta bacteria, había una lisis de la colonia de *Staphylococcus aureus* donde se encontraba un hongo llamado *Penicillium notatum*, el cual además impedía el crecimiento de este. Así Fleming llamó a la sustancia que lisaba la bacteria como “penicilina” (49).

Pero fue Selman Waksman quien, en 1941, se refirió como “antibiótico” a las sustancias que impedían el crecimiento de las bacterias, o sea, sustancias antibacterianas (49).

4.1 Clasificación de los antimicrobianos

Los antimicrobianos que se utilizan pueden ser clasificados según su origen, actividad que tengan sobre los microorganismos, espectro de acción, estructura química que poseen o sus mecanismos de acción (50).

4.1.1 Según su origen

Naturales

Los antimicrobianos pueden ser obtenidos de una fuente de origen natural, como bacterias u hongos que secretan el antibiótico.

Un ejemplo de esto es el hongo del género *Penicillium*, donde se obtiene la Penicilina. Otros ejemplos de microorganismos que producen antibióticos son la bacteria *Paenibacillus polymyxa*, la cual produce el antibiótico llamado Polimixina producido de forma natural por la bacteria. (50).

Sintéticos

Son producidos mediante una síntesis química. Un ejemplo de este tipo de antimicrobiano son las sulfamidas (50).

Semisintéticos

Los antibióticos de origen semisintéticos son los que pertenecen a un origen natural, al cual se les realiza modificaciones químicas en sus moléculas para mejorar su espectro de acción. Ejemplo de estos antibióticos, son la ampicilina y cefalosporinas (50, 51).

4.1.2 Según la actividad que tengan sobre los microorganismos

Se pueden clasificar como bactericida o bacteriostático. La diferencia entre ambos es que un antibiótico con acción bactericida, que ejercen una acción letal para la bacteria por

completo sin necesidad de lizarlos o destruirlos; mientras que los antibióticos de acción bacteriostática solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano, sin embargo los antibióticos pueden actuar muchas veces como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en el sitio de la infección o por su afinidad que tenga en el sitio de unión de un determinado microorganismo (50, 51, 52).

4.1.3 Según su espectro de acción

Los antibióticos de espectro reducido, los cuales actúan selectivamente. Por ejemplo, los antibióticos Macrólidos actúan preferentemente frente a cocáceas Gram positiva.

Los antibióticos de amplio espectro actuarán frente a un grupo diverso bacteriano como por ejemplo las cefalosporinas que tienen acción frente a cocáceas Gram positivas y negativas; también actúa frente a bacilos Gram positivos.

Ampicilina, es otro antibiótico de espectro amplio que actúa frente a cocos Gram positivo y negativo; también algunos bacilos Gram negativo. (50, 51, 52).

4.1.4 Según su estructura química

Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son los más utilizados en clínica y a medida que ha pasado el tiempo, estos han ido mejorando su espectro de actividad.

Este tipo de antibióticos posee químicamente un anillo β -lactámico. Son bactericidas, actúan a nivel de la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) de manera tal que inhiben la síntesis de la pared celular en la etapa de la transpeptidación, produciendo un bloqueo en esta, por lo cual la bacteria no puede sintetizar su pared bacteriana lo que permite la activación de un sistema de enzimas

líticas (autolisinas) que, a la inversa de las PBP, están implicadas en la degradación del peptidoglicano, produciendo la muerte bacteriana (51, 52).

Macrólidos

Son antibióticos hidrofóbicos, producidos por los géneros bacterianos *Streptomyces* y *Micromonospora*. Los macrólidos más representativos son la Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina (52).

En su estructura química compuesta por un anillo lactónico macrocíclico que se encuentra unido a dos azúcares, desosamina y cladinosa (52).

Su mecanismo de acción es unirse de forma reversible al dominio V de la peptidiltransferasa, en el ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma, interfiriendo en el proceso de elongación de la síntesis proteica (51, 52).

Quinolonas

Las quinolonas, estructuralmente poseen dos anillos, con un nitrógeno en la posición uno, un carbonilo en posición cuatro y un grupo carboxilo en posición tres (53).

El ácido nalidíxico, fue la primera Quinolona. Se utilizó ampliamente para tratar las infecciones producidas a nivel urinario, las que en su mayoría eran producidas por bacterias Gram negativas, hasta que se produjo resistencia y se dejó de utilizar (24).

Las quinolonas actúan bloqueando las topoisomerasas II y IV. Estas enzimas están compuestas por dos subunidades A y 2 subunidades B, que son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la topoisomerasa II y *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV. Las topoisomerasas se unen al ADN, generando cortes en las hebras de ADN que posteriormente es reparado, y quedan nuevamente libres. Las fluoroquinolonas, se unen al ADN roto y a la topoisomerasa formando un complejo

ternario quinolona-ADNtopoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúen. Las quinolonas constituyen en la actualidad, junto a los beta-lactámicos, los antibióticos de mayor uso (52).

Aminoglucósidos

Son compuestos naturales obtenidos del género *Actinobacteria* que se encuentran principalmente en el suelo o productos semisintéticos derivados de ellos. Poseen un anillo aminociclitol al que se unen diferentes azúcares (20). Entre los Aminoglucósidos podemos encontrar la Gentamicina, Estreptomicina, Amikacina, entre otras (24).

Los aminoglucósidos son moléculas cargadas positivamente, lo que le permite una atracción de las cargas negativas de la superficie bacteriana (membrana externa) por lo cual hay un desplazamiento de los iones de magnesio y calcio que se encuentran adyacentes al lipopolisacárido; generando una desagregación de la membrana externa permitiendo el paso de los aminoglucósidos. Aquí el antibiótico pasa por membrana interna gracias a sistemas enzimáticos del metabolismo aerobio, que crea un gradiente eléctrico a ambos lados de la membrana. En el ribosoma, los aminoglucósidos tienen su acción en la subunidad 30S, donde se unen a diferentes proteínas y al ARN 16S. bloqueando la actividad normal del complejo de iniciación, impiden el inicio de la síntesis y provocan también una lectura errónea del ARNm. Los aminoglucósidos tienen un efecto bactericida. (52, 53).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas poseen una estructura tetracíclica lineal, compuesta de cuatro anillos unidos que derivan de la naftacenocarboxamida policíclica. al que se pueden unir distintos radicales que dan origen a diferentes tetraciclinas, estas penetran en el

citoplasma bacteriano y se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma (proteínas S7, S14, S19), bloqueando el acceso de los complejos aminoacil-ARN-t, e impidiendo la continuación de la síntesis proteica (52, 54).

Sulfonamidas

Las sulfonamidas tienen un átomo de nitrógeno amídico, que solo en una parte se encuentra sustituido por un fragmento heteroarilo, el cual le permite que presente las propiedades farmacocinéticas características de este antimicrobiano (55). Son análogos del ácido paraaminobenzoico y, por tanto, compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Estos antibióticos no afectan a las células humanas, que obtienen ácido fólico de la dieta, sulfametoxazol es el compuesto más usado en clínica (52).

4.1.5 Según mecanismo de acción

Que alteran la síntesis de la pared celular

Los antimicrobianos que tienen como función alterar la síntesis de la pared celular, son los betalactámicos. Estos no dejan que ocurra la transpeptidación del peptidoglicano, por inactivación de las PBP. Los antibióticos más característicos de este grupo son: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes, monobactams, inhibidores de β -lactamasas.

La vancomicina, por otro lado, inhibe la transpeptidación durante la síntesis de la pared bacteriana uniéndose al dipetido D – alanina- D-alanina terminal que no permite la síntesis de la pared bacteriana (56).

Que inhiben la síntesis proteica

Este grupo de antimicrobianos tiene como función inhibir la traducción y la transcripción del material genético de la bacteria. El proceso de la síntesis de proteínas tiene 4 pasos: iniciación, elongación, terminación y reciclaje del ribosoma.

El antibiótico inhibirá las etapas de la transcripción, uniéndose a los ribosomas de origen bacteriano, obteniendo así un bloqueo de la acción del RNAm (57).

Que inhiben la síntesis de DNA y RNA

Este mecanismo de acción inhibe la enzima RNA polimerasa, la que es dependiente del DNA que cataliza la transcripción de la información genética que contiene el RNA mensajero, como resultado este mecanismo de acción puede ser un potente bactericida (58).

Alteran la permeabilidad celular

Este mecanismo afecta la membrana de la bacteria. La pristanamicina y Polimixina, pertenecen a este grupo que altera la permeabilidad de la membrana.

Las polimixinas producen la ruptura de la membrana celular gracias a la unión del lípido del lipopolisacárido con esta, produce ciertas toxinas, las que son letales para la bacteria (58).

4.2 Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos, en su estructura química poseen un anillo β -lactámico, que será parte fundamental para que realice su mecanismo de acción. Este anillo es el principal blanco de las betalactamasas producidas por las bacterias como mecanismo de resistencia.

Son bactericidas y actúan frenando la síntesis de la pared bacteriana, a través de la inhibición de la transpeptidación.

Ejercen una inhibición por competencia con la enzima transpeptidasa o PBP, que tiene como efecto impedir la unión y entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. Estas cadenas le dan rigidez, estabilidad y forma a la membrana celular bacteriana, pero con la inhibición, esto no ocurre y el microorganismo no puede sintetizar la pared bacteriana (59).

Dentro de los antibióticos de tipo betalactámicos se encuentran las Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactámicos y Carbapenémicos y los inhibidores de betalactamasas.

4.2.1 Penicilinas

La penicilina que se origina del hongo *Penicillium chrysogenum*, inhibe la multiplicación del *Staphylococcus aureus*

Las penicilinas como antibióticos fueron muy eficaces, con una toxicidad muy baja que le otorgaba la seguridad al ser administrada. El compuesto básico es un ácido orgánico con un anillo β -lactámico (24).

Penicilinas resistentes a penicilinas

En el año 1940 aparece una cepa de *Escherichia coli* que producía penicilinasas, dos años después se descubrieron cepas de *Staphylococcus aureus* hospitalarias que eran resistentes a las penicilinas. Con el pasar de los años esto se diseminó y a finales del año 1960 con la Meticilina semisintética de segunda generación mejora ostensiblemente, al ser este tipo de antibiótico resistente a la acción de las penicilinas, sin embargo, en el transcurso de pocos años, surgieron cepas resistentes a la metilina, esto determina

resistencia a todos los antibióticos betalactámicos debido a la modificación del sitio de unión que es común para la mayoría de los antibióticos betalactámicos (62).

Las carboxipenicilinas, Ureidopenicilinas, Piperaciclina, se consideran dentro de las Penicilinas de amplio espectro. Estas pueden tratar infecciones que involucran a cocáceas Gram positivas, y solo algunos bacilos Gram negativo, como por ejemplo las *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (24).

4.2.2 β - lactámico con inhibidor de betalactamasas

Dentro de este grupo se encuentra la combinación de Ampicilina-Sulbactam, Amoxicilina - Ácido clavulánico, Ticarcilina- Ácido clavulánico, Piperacilina-Tazobactam.

Los inhibidores como el ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam no tienen actividad por sí solos, se deben utilizar junto a un antibiótico betalactámicos. Estos pueden ser usados cuando ocurren infecciones que son ocasionadas por bacterias productoras de betalactamasas.

El inhibidor es quien se unirá a la betalactamasa producida por el agente, así permite que el antibiótico que lo acompaña actúe y cumpla la función sobre la pared bacteriana inhibiendo su síntesis (24).

4.3 Cefalosporinas

Son antibióticos semejantes a las penicilinas. Tienen modificaciones en su estructura química, en el anillo 7-amino-cefalosporánico, los que fueron sintetizados a partir de un hongo del género *Cephalosporium* (50).

Las cefalosporinas se dividen por generación. La primera generación de cefalosporinas actúa sobre bacterias Gram positivas (con excepción de *Enterococcus spp*) y muy pocas contra las bacterias Gram negativas (66).

Entre ellas encontramos cefazolina, cefalotina, cefradina, cefapirina, cefalexina, cefradina, cefadroxilo.

Las cefalosporinas de segunda generación tienen una mayor resistencia contra las betalactamasas, que las de primera generación.

Entre las cefalosporinas de segunda generación se encuentran: cefuroxima, cefprozil, cefoxitina, cefonicid, cefotetan, cefamandol, cefaclor que tiene una actividad antimicrobiana con bacterias del género *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, *Neisseria spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp* y *Haemophilus influenzae*, sin embargo, hay algunos bacilos Gram negativos que la pueden inhibir utilizando betalactamasas (60).

Entre las cefalosporinas de tercera generación de mayor importancia se encuentran; cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefdinir, cefpodoxima y cefixima. Estas cefalosporinas de tercera generación tienen mayor estabilidad frente a las betalactamasas producidas por agentes como; *Klebsiella spp*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli*, que las de primera y segunda generación.

Son recomendadas de manera empírica en muchas patologías infecciosas en especial cuando se trata de infecciones que afectan al sistema nervioso central, ya que tienen la ventaja de atravesar la barrera hematoencefálica.

Asimismo, es recomendada cuando se trata de infecciones del tracto genitourinario, de neumonías de la comunidad, infecciones de tejidos, entre otras (64).

Las cefalosporinas a medida que evolucionan a una siguiente generación, son más eficaces con los bacilos Gram negativos, pero no así contra las cocáceas Gram positiva.

En las cefalosporinas de cuarta generación se encuentran cefepime, cefpiroma, cefozopran. Esta generación de cefalosporina demuestra una alta eficacia contra bacilos Gram negativos que son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, y también presenta una destacada efectividad frente a *Pseudomonas spp.* (65).

Las cefalosporinas no tienen actividad en el género *Enterococcus spp*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (33).

4.4 Monobactámicos y Carbapenémicos

Entre los carbapenémicos encontramos Imipenem, Meropenem, Doripenem, Ertapenem y como Monobactámicos podemos encontrar a Aztreonam.

Ciertos enterobacteriales que producen BLEE, tendrán resistencia a Aztreonam, pero sensibilidad a carbapenémicos (50).

Los carbapenémicos, son los betalactámicos que poseen un amplio espectro frente a agentes y son considerados los más estables frente a las β -lactamasas. Pero no tienen acción frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina, *Enterococcus spp* resistentes a Ampicilina y *Stenotrophomomas maltophilia* (33).

5.0 Resistencia de las bacterias a los antibióticos betalactámicos

Las bacterias son organismos que han habitado la tierra desde hace aproximadamente 3500 millones de años y que han sobrevivido gracias a su extraordinaria manera de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales.

A medida que aparecen nuevos antimicrobianos junto con su evolución, las bacterias también adaptan su manera de resistir a nuevos fármacos antimicrobianos.

Cuando se introduce la cefotaxima en la década de los ochenta, las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran susceptibles; sin embargo, esto fue cambiando en la medida del uso indiscriminado de cefotaxima y hoy existen cepas resistentes a las cefalosporinas de 3° generación debidos a diferentes mecanismos de resistencia principalmente por BLEE (66).

Existen categorías para detallar la resistencia a los antibióticos y se clasifican según el número y tipo de antimicrobianos afectados, la multirresistencia o MDR por su sigla en inglés (*multiple drug resistance*), es definida como la pérdida de sensibilidad a por lo menos, un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos; por otro lado se define la resistencia extrema o XDR (*extensively drug resistance*), como la ausencia de sensibilidad a por lo menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos, excepto en dos de ellas o menos, y finalmente la resistencia a todos los antimicrobianos o panresistencia o PDR (*pandrug resistance*), se define como resistencia a todas las categorías de antibióticos (67).

Las bacterias frente a los antimicrobianos han desarrollado distintos mecanismos con el fin de impedir su acción. Estos mecanismos se dividen en:

A. Mecanismo de hidrólisis

La bacteria produce ciertas enzimas las cuales son capaces de unirse al anillo β -lactámico del antibiótico, lo hidrolizan e inactivan, imposibilitando su mecanismo de acción.

B. Mecanismo de bombas de expulsión

Los microorganismos mediante las bombas de expulsión remueven los antimicrobianos desde el espacio intracelular. Estas bombas de expulsión corresponden a proteínas de

membrana, las que son fundamentales para excretar sustancias hacia el exterior de la bacteria, así como también productos nocivos como los antimicrobianos.

Esto permite que los antibióticos no alcancen las concentraciones adecuadas que puedan afectar a la bacteria, por lo tanto, genera resistencia (68).

C. Cambios en el sitio activo

Gracias a una modificación ya sea por alteración o mutación, lo que permite que no ocurra la unión del β -lactámico a la proteína PBP, debido a que no la reconoce como tal (33).

La resistencia ocurre cuando se lleva a cabo la presión selectiva provocada por el tratamiento antibiótico. Existen ciertas bacterias que adquieren mutaciones de resistencia o determinantes móviles de resistencia, como plásmidos o transposones, que les conferirá la resistencia hacia los antimicrobianos (69).

D. Disminución de la permeabilidad de la pared celular

Reducir el ingreso de los antibióticos a través de las proteínas denominadas porinas que se encuentran en membrana externa, es una forma de resistencia entre las bacterias Gram negativas.

Las porinas son proteínas que establecen la permeabilidad de la membrana externa. Mediante estos canales hidrofílicos, las bacterias permiten el ingreso de diversas moléculas según carga y tamaño, entre estas moléculas se encuentran los antibióticos.

Las bacterias pueden modificar éstas, incluso perderlas de tal manera que el antibiótico no podrá ejercer su función.

Que las bacterias Gram negativas modifiquen sus porinas, afecta directamente a los antibióticos β -lactámicos, Carbapenémicos, Cefalosporinas y también a las fluoroquinolonas (68).

5.1 Tipos de Betalactamasas

5.1.1 Betalactamasas de tipo BLEA

Las primeras β -lactamasas que se aislaron fueron llamadas β -lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1). Estas generaban resistencia a la ampicilina y amoxicilina, pero no a las cefalosporinas de tercera generación, se pueden dividir en clases A, B, C y D (50), (69).

Las Betalactamasas plasmídicas TEM-1, TEM-2, SHV-1 pertenecen a la clase A, según clasificación de Ambler, que las clasifica en base a las similitudes que poseen los aminoácidos.

Las de clase A, han sufrido modificaciones que les ha permitido aumentar su espectro de acción. Gracias a estos cambios en las enzimas se confiere una acción disminuida a las penicilinas, un ejemplo de esto; son las TEM. (20) Este tipo de betalactamasas, son sensibles a la acción de los inhibidores de β -lactamasas, como, por ejemplo; el ácido clavulánico.

Las de clase B son inhibidas por EDTA, y no tienen acción sobre los monobactam como el aztreonam (50).

Las β -lactamasas de clase C, por lo general son codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por betalactámicos (50).

Las enzimas de clase D, constituyen un grupo reducido de enzimas de codificación plasmídica y cromosomal con actividad incrementada sobre oxacilina (50).

5.1.2 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Estas Betalactamasas son las que provienen de mutaciones de las BLEA TEM-1, TEM-2, SHV-1 y CTX-M (70).

Hidrolizan cefalosporinas de primera a cuarta generación y Monobactámicos, pero no Cefamicinas ni Carbapenemes (70).

Se pueden observar frecuentemente en bacterias como *Klebsiella* y *Escherichia coli*, pero también se pueden observar en otras bacterias Gram negativas (70).

Estas enzimas, han tenido un rol importante en la multirresistencia de los bacilos Gram negativos, generando complicaciones en pacientes que se encuentran hospitalizados, y también en la comunidad (70).

Las bacterias que producen BLEE, generalmente se encuentran en muchas Infecciones del tracto urinario (ITU), también produciendo neumonías las cuales son adquiridas cuando el paciente está hospitalizado, presentes en septicemias, abscesos cerebrales, infecciones intraabdominales (70).

Las bacterias productoras de BLEE también son conocidas por colonizar equipos e instrumentos médicos, lo que traerá como consecuencia graves problemas al paciente al no tener una terapia adecuada de antimicrobianos, que puede llevar a la muerte, además de la diseminación de cepas resistentes (40).

En los últimos cinco años, se ha evidenciado en todo el mundo un aumento considerable de aislamientos de enterobacteriales productoras de BLEE con tasas tan altas que llegan hasta 55 y 79% en países como China e India, respectivamente. (70)

Las BLEE, se encuentran clasificadas en el grupo 2b, en el subgrupo 2be correspondiente a la clasificación de clase molecular A. Existen ciertas Oxacilinas que figuran en el grupo 2d de la clase molecular D.

Se han descubierto más de cien variantes de BLEE, que derivan de los genes *blatem1* y *blatem2* y más de cincuenta variaciones del gen *blahv-1* (69).

BLEE tipo TEM

Las BLEE son derivadas de los genes *tem1* y *tem2* y han modificado sus secuencias aminoacídicas, lo que ha permitido un cambio en el espectro hidrolítico, sin embargo, se sabe que las enzimas codificadas por el gen *blaTem-1*. le confiere resistencia a ampicilina, penicilina y cefalosporinas de primera generación como cefalotina. (70), Además las BLEE provienen de estos genes sumado a que el aumento de la resistencia se debe a mutaciones en el sitio activo de la proteína (50).

BLEE tipo SHV

El género *Klebsiella* es la principal bacteria de la cual derivan este tipo de betalactamasas, pero también se pueden encontrar en otros enterobacteriales.

Estas betalactamasas, son similares a las TEM en cuanto a su mecanismo de acción y a su estructura y gracias a modificaciones en su estructura, el centro activo de la enzima cambiará su conformación permitiendo un mejor acoplamiento a las cadenas laterales R de las cefalosporinas, y así tendrá un mejor espectro de acción (69).

BLEE tipo OXA

Estas se pueden encontrar en la clasificación molecular de tipo D. Tienen la capacidad de hidrolizar cloxacilinas y oxacilinas. Degradan muy bien a las ampicilinas, cefalotinas, y el ácido clavulánico la inhibe muy poco.

En este tipo de BLEE solo destaca OXA-10, que puede hidrolizar muy poco cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam, con esto provoca una disminución de la sensibilidad de las bacterias frente a estos tipos de antibióticos (69).

BLEE tipo CTX-M

Este tipo de Betalactamasa tiene una gran capacidad para hidrolizar las Cefalosporinas sobre todo Cefotaxima y Ceftriaxona (50).

Las CTX-M, tienen actividad BLEE intrínseca movilizada desde su predecesora cromosómica en *Kluyvera ascorbata*, y son las BLEE de mayor reporte mundial, predominando en agentes que producen IAAS como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* (50).

Este tipo de betalactamasas son inhibidas más eficientemente por tazobactam que por ácido clavulánico (50).

5.1.3 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas del tipo betalactamasas que son capaces de hidrolizar carbapenémicos de manera muy eficiente como otros antibióticos betalactámicos como las cefalosporinas (45).

Las carbapenemasas se pueden clasificar dependiendo de la homología de las secuencias de aminoácidos propuesta por Ambler en 1980 (Figura 1). Existen 2 clases de carbapenemasas: serin carbapenemasas, donde se encuentran a las de tipo A y D, y

las metalo β lactamasas (dependientes de zinc) donde encontramos a las de tipo B (45, 71).

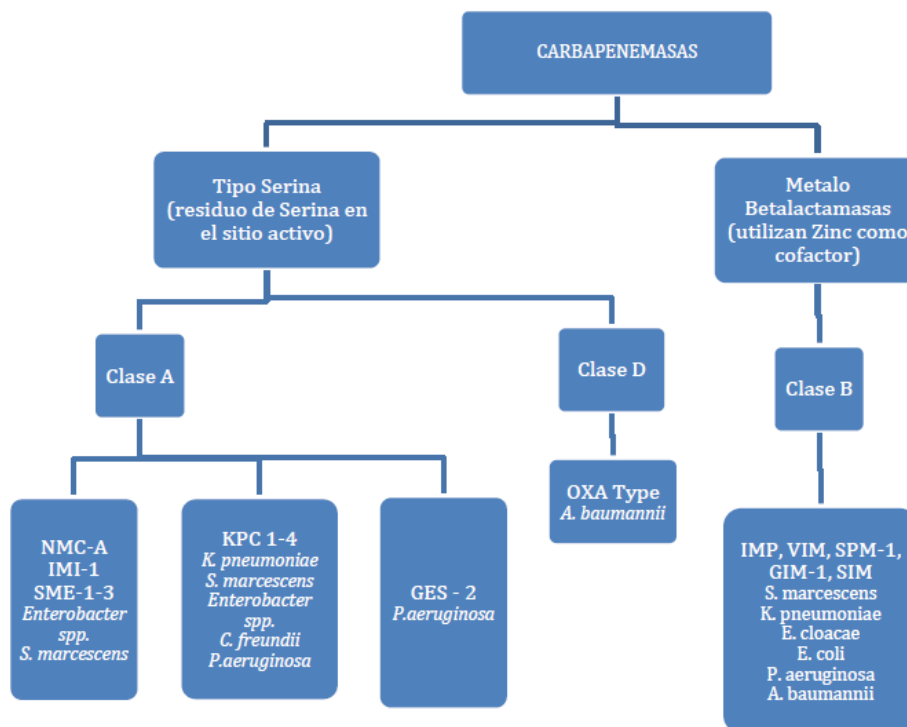


FIGURA 1: Clasificación de carbapenemasas. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase(KPC), New Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM), Verona integrin encoded Metallo- β -lactamasa (VIM), oxacilinas (OXA), imipenem-hidrolizando β -lactamasa (IMP), Guayana espectro extendido (GES), no metalo enzima carbapenemasa (NMC), *Serratia marcescens* enzima (SME), Imipenemasa Germana (GIM), Seoul imipenemasa (SIM), Sao Paulo metalo- β -lactamasa (SPM) (72, 73).

Carbapenemasas clase A de Ambler

Ambler originalmente las divide en dos clases: clase A y D las cuales presentan una serina en su sitio activo (6). Las de clase A incluyen las enzimas de SME, IMI, NMC, GES y KPC que se encuentran de forma más prevalente en *Klebsiella pneumoniae*, las enzimas SME, NMC y IMI hidrolizan las penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos, estas enzimas son codificadas por los cromosomas de las bacterias; por otra parte, las enzimas de tipo GES son codificadas en elementos genéticos ubicados en el plásmido de la bacteria siendo identificadas en *Pseudomona aeruginosa*, y las enzimas

KPC son codificadas principalmente en *Klebsiella pneumoniae*, aunque también en *Pseudomonas aeruginosa* (75).

SME (*Serratia marcescens*)

Fue detectada por primera vez en 1982 en Inglaterra, en dos aislamientos de *Serratia marcescens*. La primera enzima fue nombrada SME-1 y a lo largo del tiempo se logró identificar SME-2 y SME-3 las cuales han sido encontradas mayoritariamente en la población de los Estados Unidos (75), estas enzimas hidrolizan penicilinas y cefalosporinas (en menor grado cefalosporinas de tercera y cuarta generación), monobactámicos y carbapenémicos, la capacidad de hidrolizar dependerá del sustrato. Las de clase SME-3 hidrolizan de mejor manera a imipenem, estas enzimas son inhibidas levemente por el ácido clavulánico y el tazobactam (76).

IMI (*imipenem-hydrolyzing B-lactamase*)

Enzima que ha sido detectada en *Enterobacter cloacae* en los Estados Unidos, Francia y Argentina, los genes para la codificación de esta enzima son de localización cromosómica, sin evidencia asociada a elementos genéticos móviles, la variante IMI-2 fue encontrada en plásmidos de *Enterobacter asburiae* en Estados Unidos y en plásmidos de *Enterobacter cloacae* en China (75).

NMC-A (*non-metallo-beta lactamase enzyme*)

Las enzimas NMC-A fueron identificadas en primera instancia en *Enterobacter cloacae* en Francia en el año 1990 (85). Los cromosomas que albergan el gen de esta enzima son activados como respuesta a la presencia de imipenem y cefoxitina, existe una delección en el gen que induce la producción de esta enzima. Presenta dos estructuras de NMC-A, una natural y otra de un complejo que está compuesto por un ácido inhibidor de

penicilina. Estas enzimas difieren de las IMI-1 y IMI-2 por la sustitución de 8 aminoácidos y posee un Lys-R regulador tal como el tipo de enzimas IMI (85). Estas enzimas en conjunto a SME-1 y IMI-1 son altamente homólogas, comparten un amplio e inusual perfil de sustrato, los cuales incluyen penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, la enzima NMC-A es inhibida por un set de inhibidores monobactámicos (82).

GES (*Guiana extended spectrum*)

La familia de betalactamasa de tipo GES es una familia infrecuentemente encontrada, GES-1 fue descrita en el año 2000 en la Guyana Francesa en una *Klebsiella pneumoniae*, los genes que codifican para la familia de los GES se encuentran en el integrón de los plásmidos, estas enzimas tienen un amplio espectro de hidrólisis que incluye a las penicilinas y cefalosporina de espectro extendido. En el año 2001 se incluye a los imipenem, como otro fármaco que se ve afectado por la hidrólisis de esta enzima. La enzima GES-2 fue encontrada en *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes en África del Sur (75).

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasa*)

El primer informe de KPC-1 se realizó en el año 1996, en Carolina del Norte, en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* (de ahí el nombre de la enzima). En Colombia en el año 2006 se reportó la primera KPC-2, luego en el mismo país se encontró un brote de KPC-3, en Chile se detectó por primera vez en el año 2012 en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* de un paciente chileno que residía en Italia y que estaba de paso por el país. (86). En otras partes de Hispano América se han reportado la presencia de KPC en *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Serratia marcescens* y

Klebsiella oxytoca (74) Las carbapenemasas tipo KPC hidrolizan a los betalactámicos de todas las clases, con mayor eficiencia para carbapenémicos, nitrocefín, cefalotina, cefalosporina, bencilpenicilina, ampicilina y piperacilina (75). Entre los factores microbiológicos, se ha determinado que el gen *blaKPC* está ubicado en el transposón *Tn4401* que es el encargado de codificar para esta enzima, las variantes KPC-2, KPC-3 son más comunes en aislados clínicos producidos en brotes epidémicos, siendo KPC-2 la enzima más predominante en el mundo. KPC-3 ha sido principalmente detectada en Estados Unidos, Israel y América Latina. Además de la diferencia en su secuencia aminoacídica que presentan entre ellas, las variantes se diferencian por su cinética, lo que causa que tengan una diferencia hidrolítica frente a los distintos antimicrobianos. La enzima KPC está presente en más de 100 secuenciotipos (ST) diferentes, pero la pandemia de KPC es debido, principalmente, a la propagación de miembros del complejo clonal (CC) 258 con el ST258 y las variantes ST11, ST340 y ST512 (74). En Chile, la enzima KPC está presente en muchas secuencias de tipo (ST) diferentes, los miembros de este linaje son resistentes a todos los antimicrobianos excepto colistin, tigeciclina y gentamicina, el ISP ha identificado el ST 1161, este ST se ha considerado autóctono, ya que solo ha sido identificado en este país (74).

Carbapenemasas Ambler Clase B

Las metalo betalactamasas (MBLS) o también llamadas carbapenemasas de clase B es un grupo que se puede caracterizar por presentar una gran diversificación estructural y/o funcional. Son enzimas que hidrolizan todos los betalactámicos excepto los monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos tales como EDTA (76). El espectro de acción es bastante amplio, sumando a los carbapenémicos, con

mayor acción hidrolítica hacia las cefalosporinas y penicilinas, pero con poca capacidad de hidrolizar aztreonam. (75).

Los genes para MBLS se encuentran en integrones, transposones y plásmidos, dentro de los MBLS se distinguen, IMP, VIM, NDM siendo éstas las más diseminadas (76).

VIM (Veronese imipenemase)

La enzima VIM-1 se detectó en 1997 en Italia, asociado a integrones situados en el cromosoma bacteriano. En la actualidad se han descrito 27, siendo VIM-2 y de las más informadas. En Colombia, Chile, Venezuela, Brasil y Argentina se han encontrado aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, la variante VIM-2, se identificó en el gen *blaVIM2* (77), en cuanto a las demás VIM han sido detectadas en *Pseudomonas aeruginosa*, VIM-1 hidroliza de mejor manera prácticamente a todos los betalactámicos por sobre todo algunas cefalosporinas más que VIM-2 (78).

IMP (Imipenemase)

Fue identificado en un plásmido de conjugación con un perfil de resistencia a imipenem y a cefalosporinas de espectro extendido. En Japón, IMP-1 marcó el primer hallazgo de una carbapenemasa de la familia de las metalo-betalactamasas en una *Pseudomonas aeruginosa* (77). Taiwán también informó sobre IMP-1, detectándose en dos aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (75). Los genes que codifican para las IMP se encuentran principalmente en forma de integrones plasmídicos, en su mayoría de clase 1, aunque se han observado casos en clase 3 (10). En Latinoamérica, el primer registro de esta enzima se realizó en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*. (77).

NDM (New Delhi MBL)

La enzima NDM se describió por primera vez en Suecia, en un paciente que provenía de la India en el año 2008 (79). Se ha descrito que el gen *blaNdm* codifica para la enzima que se moviliza fácilmente entre las diferentes cepas bacterianas generando una considerable preocupación en el ámbito de la salud pública. Con relación a los países, se observa con mayor frecuencia en aquellos que están ubicados en el continente asiático. En cuanto a las bacterias de mayor propagación, destacan *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Estos dos microorganismos no solo son los más ampliamente distribuidos, sino que también albergan el mayor número de genes de resistencia asociados a NDM-1. Es importante tener en cuenta que la presencia de la enzima NDM-1 no se limita exclusivamente a estas dos bacterias, ya que su rápida y fácil diseminación facilita la adquisición de nuevos genes de resistencia, complicando considerablemente el tratamiento. Además de NDM-1, se han detectado con mayor frecuencia otros genes de resistencia, como *bla-ctx-M*, *bla-tem* y *bla-oxa*, lo que indica un aumento en la expresión de betalactamasas de este tipo. Estos genes codifican mecanismos que generan resistencia al inactivar el antibiótico mediante la modificación del sitio blanco, y su presencia simultánea en una bacteria es un fenómeno que se observa con mayor frecuencia (80). NDM ha tenido una rápida diseminación mundial por su habilidad de expresarse en numerosos patógenos Gram negativos y *bla-ndm* se ha posicionado como uno de los genes de resistencia de mayor distribución a nivel mundial (81). El subtipo más frecuente de esta enzima es el NDM-1 que es codificada por un gen de origen plasmídico, es una enzima transferible, que puede hidrolizar a todos los betalactámicos a excepción de los monobactámicos, esta capacidad se la brinda el hecho que tiene un

Zinc en su sitio activo, así mismo suelen causar otros mecanismo de resistencia frente a antibióticos de diversas familias como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y trimetoprima-sulfametoxazol, pese a que principalmente están descritas en *Klebsiella pneumoniae*, también se han hallado en otros enterobacteriales (79).

A nivel mundial, desde el año 2008, se ha detectado la expansión de la circulación portadores del mecanismo de resistencia NDM, actualmente en la Región de las Américas, son (80) los países que han detectado este mecanismo de resistencia. El Instituto de Salud Pública (ISP) realiza la vigilancia de carbapenemasas en enterobacteriales desde el año 2012, en mayo del 2014 el Laboratorio de Referencia de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud de ISP confirmó la primera cepa de *Klebsiella pneumoniae* portadora de la carbapenemasa tipo NDM-1 en nuestro país (84).

Carbapenemasas Ambler tipo D

OXA (oxacillin-hidrolizing)

Se denominaron a las enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina, sus genes están integrados en el cromosoma, en plásmidos o en integrones, poseen por lo demás una gran variabilidad de aminoácidos. Se han identificado una gran variedad de estas enzimas, las OXA se caracterizan por ser poco inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas y EDTA (77). Dentro de la clasificación de Ambler, estas pertenecen a las de clase D, que fueron descritas en 1980, su característica es la de hidrolizar la cloxacilina y oxacilina. Las OXAs no pueden hidrolizar a los carbapenémicos de espectro extendido ni a aztreonam, exceptuando la variante OXA-27, que si tiene una capacidad de hidrolizar estos fármacos. En general, las OXAs son inhibidas por ácido clavulánico, excepto OXA-23 que es resistente a ácido

clavulánico. Estas betalactamasas se encuentran principalmente en *Acinetobacter baumannii* y también se ha hallado, en forma muy ocasional en *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies. Los genes que codifican para esta enzima se encuentran dentro de los integrones situados en los plásmidos, en Francia se han aislado en cepas de *Proteus mirabilis* que producen OXA-23 a partir de un gen cromosómico y no plasmidial (76).

Dentro de las OXAs, las variantes OXA-2 y OXA-10 se engloban por su comportamiento hidrolítico dentro de las BLEE, pues afectan a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y también a los monobactámicos, este tipo de betalactamasas se caracterizan por su alta capacidad de hidrólisis contra las cloxacilinas y oxacilinas y son pobremente inhibidas por ácido clavulánico. La presencia de este gen fue reportada por primera vez en *Pseudomonas* en Francia. (78, 85).

La primera betalactamasa tipo OXA con actividad carbapenémica fue descrita en 1993. La enzima fue purificada desde *Acinetobacter baumannii* multirresistente, en un principio fue denominada ARI-1 (por *Acinetobacter* resistant to imipenem) y más tarde se demostró por medio de secuenciación un residuo a lo largo del plásmido, que reveló que pertenecía a las OXA de la familia D de las betalactamasas, y finalmente fue renombrada como OXA-23. La gran cantidad de OXA carbapenemasas han sido descubiertas en *Acinetobacter baumannii* (patógeno oportunista Gram negativo) (75).

Las carbapenemasas tipo OXA muestran una actividad significativamente mayor contra los carbapenémicos, especialmente en el caso del imipenem en comparación con el meropenem. Sin embargo, su capacidad para hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos es prácticamente nula. En cuanto a la inhibición de estas enzimas por parte de los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y el

tazobactam, varía en su eficacia, pero en general, suele ser bastante efectiva (78). La hidrólisis de carbapenémicos por parte de las oxacilina carbapenemasas es fuerte, algunos investigadores han demostrado que la codificación del plásmido en enzimas OXA-23 y OXA-58 contribuyen a la resistencia de carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* después de la transformación de los plásmidos de OXA dentro de cepas de *Acinetobacter baumannii* que son sensibles a carbapenémicos (75).

OXA-48 fue originalmente identificada en aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en Turquía. Reportes tempranos sugieren que esta enzima fue geográficamente restringida a Turquía, sin embargo, con el paso de algunos años se ha recuperado desde variados enterobacteriales y ha presentado una circulación fuera de este país, con reportes en aislamientos en Medio Oriente, África del Norte, Europa y más recientemente USA. OXA-48 es por lejos la enzima más diseminada mundialmente. La evaluación de un brote demostró que una variedad de cepas ha contribuido a la diseminación de esta emergente carbapenemasa en *Klebsiella pneumoniae* (81). Las OXA-48 hidrolizan de forma eficiente penicilinas y débilmente, carbapenémicos, con muy poca actividad contra las cefalosporinas (77). En mayo del 2014 el ISP confirmó que por medio de distintas pruebas logró establecer la primera cepa de *Klebsiella pneumoniae* portadora de una carbapenemasa tipo OXA-370 (es una variante de la OXA-48) en Chile, éste es el primer caso de esta OXA en nuestro país, que corresponde a un paciente estudiado en dos centros asistenciales de la región metropolitana, cultivando dicha cepa desde orina e hisopado rectal, la presencia de esta OXA-370 es inusual, solo se había descrito su presencia en enterobacteriales, en Brasil (83, 84).

6.0 Estudio de clonalidad y su importancia epidemiológica

La aparición de un cuadro infeccioso en un paciente o de un brote en un hospital pone en marcha distintas medidas de control, aislándose el patógeno y clasificándolo, para luego definir su origen y cadena epidemiológica que ha conducido a la infección y las medidas de control adecuadas. En ocasiones, se requiere determinar las similitudes o diferencias filogenéticas entre diversos aislados y así determinar si los microorganismos analizados se encuentran genéticamente relacionados y por lo tanto ser representantes de una misma cepa o clon. Así los estudios de tipificación en las investigaciones epidemiológicas de patógenos hospitalarios apunta a ayudar en la disminución en las tasas de infección endémica y así poder ahorrar costos, por ejemplo:(89).

- Discriminar infección versus contaminación
- Evaluar el origen clonal frente a infecciones recurrentes determinando si hay reinfección por un mismo clon o infección por un clon distinto.
- Evaluar clonalidad entre aislados cuando se estudian brotes infecciosos intra o extrahospitalarios

Los estudios de clonalidad microbiana buscan básicamente determinar si dos bacterias son idénticas o diferentes. Para esto a través de los años se han desarrollado diferentes metodologías tanto fenotípicas como genotípicas. En general el primer paso para evaluar si dos bacterias tienen un origen clonal común, está dada por las características fenotípicas de ellas mismas, entre las cuales el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos o antibiograma es el más usado, pero para la evaluación de clonalidad a

partir del antibiograma no hay una metodología específica común a todas las especies bacterianas, así como tampoco hay herramientas generales que se puedan aplicar a grupos comunes de especies bacterianas (88, 86, 90). La biotipificación basada en un panel extendido de pruebas bioquímicas y de cultivo, la serotipificación basada en la clasificación según los antígenos de la cápsula y tipificación de bacteriosinas, son algunas de las técnicas básicas que se han aplicado para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*, pero presentan algunas limitaciones las que las hace poco discriminativas y reproducibles para fines epidemiológicos (88, 91). En la actualidad existen una gran variedad de técnicas de tipificación molecular, todas se pueden utilizar en el estudio de brotes y de rutas de transmisión entre pacientes y hospitales, ofreciendo resultados con un buen nivel discriminatorio (18), sin embargo, estas técnicas son laboriosas, requieren personal entrenado y su nivel discriminatorio no es suficiente en algunas especies. Las nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva, son técnicas con un excelente nivel discriminatorio y que ofrecen el máximo nivel de información. Aunque por el momento, su utilidad es limitada ya que el precio es elevado, necesitan personal especializado y entrenado y recursos informáticos para el análisis de la información generada (17, 92).

6.1 Técnicas moleculares de tipificación.

Las técnicas de tipificación molecular son útiles en la vigilancia y control de brotes porque permiten conocer la clonalidad entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión (93). Entre las técnicas moleculares para la tipificación bacteriana existentes, se incluyen la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), tipificación por secuencias de locus múltiples (MLST), el perfil plasmídico, la ribotipificación y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

como la detección de elementos extragénicos repetitivos palindrómicos (REP), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) o ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) (92, 94, 95, 96, 97).

El PFGE, considerado el estándar de oro, permite evaluar la mayor parte del ADN cromosomal y es hoy día la técnica que tiene el mejor poder discriminatorio y la mejor reproducibilidad, además de que permite tipificar la mayor cantidad de especies bacterianas, es relativamente económico con una excelente tipificación y reproducibilidad intralaboratorio, además, se han logrado establecer bases de datos internacionales de huellas dactilares, lo que permite la detección rápida de clones emergentes y el monitoreo de la propagación de cepas bacterianas patógenas en diferentes regiones o países. La muestra que se utiliza es ADN genómico purificado que luego se escinde con una endonucleasa de restricción que va a reconocer todos los sitios de restricción que ocurren con poca frecuencia en el genoma de las especies bacterianas. Los fragmentos de restricción resultantes, que en su mayoría son grandes, se pueden separar en un gel de agarosa mediante electroforesis de campo pulsado en la que la orientación del campo eléctrico a través del gel se cambia periódicamente. Los fragmentos de ADN separados se pueden visualizar en el gel como bandas, que forman un patrón particular en el gel, el patrón PFGE, resolviendo fragmentos de ADN con tamaños que van desde aproximadamente 30 kb a más de 1 Mb. La ventaja del método PFGE es que aborda una gran parte de un genoma (> 90%). En consecuencia, las inserciones o eliminaciones de elementos genéticos móviles, así como grandes eventos de recombinación dentro del ADN genómico, resultarán en cambios en los patrones de PFGE (92), (94). En general, el método es técnicamente exigente, requiere mucho trabajo

y consume mucho tiempo, además que puede carecer de poder de resolución para distinguir bandas de tamaño casi idéntico, por ejemplo, fragmentos que difieren entre sí en tamaño en menos del 5%.

Por otro lado, las técnicas basadas en PCR como la amplificación aleatoria RAPD o REP PCR carecen de reproducibilidad suficiente interlaboratorio debido a la variabilidad en reactivos y sistemas de electroforesis en gel (92). En el caso de AFLP se requiere mucha mano de obra y un análisis típico podría tomar aproximadamente tres días. La MLST está basada en la secuencia de nucleótidos caracterizando relaciones genéticas entre los aislados bacterianos, determinando las secuencias de fragmentos internos de solo siete genes de mantenimiento. Para cada gen, las diferentes secuencias se asignan como alelos y los alelos en los siete loci proporcionan un perfil alélico, que define inequívocamente el tipo de secuencia (ST) de cada aislado. La gran ventaja de MLST es que todos los datos producidos por este método son inequívocos debido a una nomenclatura estandarizada internacionalmente, altamente reproducible. Además, las secuencias de alelos y los perfiles ST están disponibles en grandes bases de datos centrales que se pueden consultar a través de internet. Estas bases de datos también proporcionan software en línea (eBURST) (98) para la determinación de la relación genética entre cepas bacterianas dentro de una especie, así como mapas MLST para rastrear los aislamientos de cada ST que se han recuperado de cada país más los detalles de estos aislamientos. La gran desventaja de MLST es su alto costo (92, 97).

6.2 Espectrofotometría de Masas y MALDI-TOF como herramientas para estudios de clonalidad bacteriana y detección de mecanismos de resistencia

La espectrometría de masas es una técnica de determinación estructural que permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Un espectro de masas es una relación de las especies iónicas presentes en una muestra, expresadas en función de su masa/carga. El nombre MALDI-TOF obedece a las siglas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo y ha permitido la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (18, 95).

Fue a finales de los años noventa que se encontró que la aplicación de la espectrometría de masas en células bacterianas enteras producía espectros de proteínas característicos y reproducibles que podían utilizarse para la identificación bacteriana a nivel de género y especie. (91).

Con este método, las bacterias se mezclan con un disolvente que contiene una matriz (una sustancia orgánica sólida de moléculas). A continuación, se evapora el disolvente y queda una disolución sólida cristalizada de los microorganismos en la matriz. Luego, pasa por una cámara de ionización en donde se irradia la mezcla cristalina con un breve pulso láser, así se desorbe e ioniza los iones característicos y la matriz facilitará que en la ionización no se produzcan demasiadas rupturas de la estructura ni se destruya la molécula problema. (95). El analizador de tiempo de vuelo (TOF) es en una región donde se establece un potente campo magnético perpendicular

a la trayectoria rectilínea común de todas las partículas cargadas. De este modo, se dispersan en tantas trayectorias circulares como clases de partículas existan. Los iones poseen la misma energía cinética, pero al tener distinta masa, llegan al detector a velocidades distintas. El último elemento de un espectrómetro de masas es el detector. Son dispositivos que convierten una corriente de iones en una corriente eléctrica, cuya intensidad permite evaluar la abundancia relativa de cada tipo m/z de fragmentos catiónicos. Estas abundancias aparecen expresadas en el espectro de masas, como picos de masas expresadas en porcentajes relativos respecto al porcentaje de la altura del pico base.

La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS se basa en que las huellas digitales espectrales que posee cada microorganismo, existiendo picos específicos de género, otros de especie y otros, a veces, de la subespecie, siendo la mayoría de los espectros de masas del MALDI-TOF proteínas muy conservadas que son afectadas en un grado mínimo por las condiciones ambientales y de cultivo. (17, 91, 99). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes, por lo que la capacidad de agregar espectros y construir bases de datos personalizadas es importante para un análisis discriminatorio adicional usando MALDI-TOF MS que, además, permite la tipificación de cepas e investigaciones epidemiológicas. Uno de los sistemas comerciales más empleados en la actualidad que usan la tecnología MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos es el Sistema VITEK® MS (bioMérieux, Durham, NC) (99).

Una de las principales ventajas de la tecnología MALDI-TOF MS es la facilidad de uso y la automatización del procedimiento que conlleva a mejorar el tiempo de entrega de los resultados. La capacidad para analizar un gran número de aislamientos simultáneamente permite incrementar el rendimiento; además, una vez cargado el instrumento, las identificaciones se pueden realizar en menos de un minuto. Esta mejora en el tiempo de respuesta representa un beneficio sustancial en la oportunidad del resultado y la atención del paciente.

Gracias a su versatilidad, el MALDI-TOF se ha introducido en el laboratorio de microbiología clínica en el campo de la detección de la resistencia a los antibióticos, especialmente utilizándose como un método rápido. Así, se puede determinar la resistencia a través de la medida de la actividad enzimática, detección de la resistencia a través del análisis del perfil proteico microbiano y detección de la resistencia a través del análisis de los efectos antibióticos que se producen sobre el crecimiento microbiano. Además, se puede utilizar esta tecnología para estudios de tipificación. Los sistemas de tipificación bacteriana permiten diferenciar cepas pertenecientes a una misma especie que poseen determinados vínculos epidemiológicos (25). La gran especificidad de los espectros de proteínas obtenidos mediante MALDI-TOF ha permitido realizar estudios de comparación de poblaciones y de identificación de clones epidemiológicos. Este tipo de análisis posibilita, entre otros aspectos, el estudio de brotes hospitalarios facilitando tanto su detección precoz como la caracterización de modelos de transmisión de infecciones entre personas, material inanimado y el diseño de medidas de control (19). El análisis epidemiológico se puede realizar mediante comparación de los espectros generados con una librería construida con aislados caracterizados molecularmente.

También se puede realizar la tipificación o caracterización proteica de un microorganismo a través de la identificación de pequeños péptidos o proteínas que aparecen en el espectro de masas. (91). La presencia/ausencia de determinados peaks de proteínas utilizados como biomarcadores y con ciertas características microbiológicas, pueden llegar a identificar clones epidemiológicos e incluso ser marcadores de resistencia a ciertos antimicrobianos (17, 19).

Se ha demostrado que MALDI-TOF MS puede usarse para identificar *Staphylococcus aureus*, discriminando entre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y algunos subtipos (67). En *Klebsiella pneumoniae* se logró realizar un estudio de resistencia analizando los perfiles mediante MALDI-TOF y de clonalidad de diferentes cepas de esta bacteria en muestras pediátricas. (100). Bajo esta misma tecnología se logró detectar grupos clonales en de *Escherichia coli* productores de BLEE, teniendo alto rendimiento de detección (22) y detectar brotes de *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii* (41), demostrando la introducción de nuevas cepas y las transmisiones intrahospitalarias ocurridas en un hospital en Alemania.

7.0 Datos epidemiológicos en Chile

Chile cuenta con una vigilancia epidemiológica de las IAAS, siendo esto uno de los principales instrumentos para conocer la situación de las infecciones en el país, programando acciones de prevención y control, contribuyendo a la disminución de tasas de infecciones asociadas a la atención en salud y brotes epidémicos (87).

De acuerdo con el último reporte de vigilancia descrito por el Instituto de Salud Pública, *Klebsiella pneumoniae* se encuentra dentro de los agentes infecciosos intrahospitalarios

más frecuentes en el año 2017, tanto en las infecciones del tracto urinario, infecciones de herida operatoria, bacteriemias y neumonías asociadas a ventilación mecánica (102).

En el 2017 se notificó un incremento en el porcentaje de cepas con estudios de sensibilidad respecto al año 2016 para todos los antimicrobianos, observándose también un aumento significativo de la proporción de cepas notificadas como no sensible a amikacina, ertapenem y meropenem respecto a la información del año 2016 (87, 102). Así mismo, se reportaron 13 brotes por agentes identificados como multiresistentes de acuerdo con los criterios establecidos, identificados localmente o con mecanismos de resistencia antimicrobiana de relevancia para la Salud Pública. Los brotes reportados fueron por bacilos Gram negativos, siete de ellos por enterobacteriales y tres brotes de infecciones por *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas KPC en pacientes adultos en UPC.

La importancia de conocer los brotes radica principalmente en que la mayoría de ellos se producen por infecciones prevenibles mediante la implementación de medidas básicas de prevención y control de infecciones, como son las precauciones estándares y las adicionales basadas en el mecanismo de transmisión de los agentes involucrados. Además, la vigilancia epidemiológica en Chile es una actividad fundamental para identificar problemas, orientar las medidas de intervención y evaluar su impacto aportando información valiosa sobre las infecciones y sus tendencias. El análisis de las etiologías y el conocimiento que los agentes tienen reservorios y vías de transmisión predominantes permite un acercamiento a los mecanismos de transmisión y son útiles para afinar las medidas destinadas a interrumpir la cadena de transmisión. La vigilancia de las tasas y de las etiologías de las infecciones genera información que permite

identificar brotes epidémicos y también genera información que permite identificar grupos de pacientes de mayor riesgo que requieran intervenciones especiales (87).

Es por esto por lo que los laboratorios de microbiología toman un rol importante en desarrollar metodologías de tipificación bacteriana con buen poder discriminatorio, fáciles de implementar y que logre entregar resultados confiables y rápidos, para así pesquisar los posibles brotes de importancia clínica asociados a los diferentes mecanismos de resistencia transmisibles, participando activamente de los procesos de vigilancia de las infecciones asociadas a la atención en salud.

II – OBJETIVOS

8.0 OBJETIVO GENERAL

Establecer la utilidad de la tecnología MALDI-TOF MS en los análisis de resistencia antimicrobiana y epidemiológicos de bacilos Gram negativos multirresistentes aislados en pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile

9.0 Objetivos específicos:

9.1. Detectar *Enterobacterales* y Bacilos Gram negativos no fermentadores productoras de β -lactamasas de tipo carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS.

9.2. Detectar *Enterobacterales* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante MALDI-TOF MS.

9.3. Estandarizar la tecnología MALDI-TOF MS en estudios epidemiológicos de las cepas basado en la hetero / homogeneidad de los espectros obtenidos, utilizando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado como patrón de comparación.

9.4. Determinar la distribución, frecuencia y clonalidad proteómica de las cepas en estudio en las diferentes unidades y servicios del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

IV - MATERIALES Y MÉTODOS

10.0 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue un estudio experimental-retrospectivo no intervencional, que se realizó en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Se recolectaron 193 cepas de enterobacterales y Bacilos Gram negativos no fermentadores multirresistente aislados de pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile desde octubre 2018 hasta marzo 2019. Las cepas corresponden a un aislado por paciente. Todas estas muestras ingresaron al laboratorio clínico, al área de microbiología y siguieron los protocolos de siembra, cultivo, identificación y antibiograma establecidos por el Manual de procedimientos del laboratorio del Hospital. La identificación bacteriana se realizó en el equipo Vitek MS[®] y los estudios de susceptibilidad a través de Vitek 2 Compact[®].

Los criterios de inclusión definidos para este estudio fueron los siguientes: Todas aquellas cepas de enterobacterales y Bacilos Gram negativos no fermentadores aisladas de pacientes hospitalizados y que sean al menos resistentes a cefotaxima para los enterobacterales y resistente a los carbapenémicos en el caso de los Bacilos Gram negativos no fermentadores. Mientras que los criterios de exclusión consideraron aquellas cepas de enterobacterales y Bacilos Gram negativos no fermentadores que sean sensibles a cefotaxima o carbapenémicos respectivamente.

10.1 Cepas, identificación, susceptibilidad y mecanismo de resistencia.

10.1.1 Cepas

Las cepas seleccionadas se almacenaron en leche Svelty descremada al 20%, que se preparó agregando 1 ml de esta solución a un criotubo., luego se esterilizaron en autoclave Huxley HL – 340 a 121°C durante 15 minutos; se dejó enfriar y se almacenaron a 4°C. Finalmente, se tomaron 2 a 3 colonias de la cepa bacteriana que se disolvieron y homogenizaron en el criotubo con leche descremada y se congelaron a -80°C hasta la realización de los estudios proteómicos.

10.1.2 Identificación

Para la identificación bacteriana se utilizó la técnica de espectrometría de masas mediante el sistema MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) usando el equipo VITEK® MS de la empresa Biomerieux, que es un dispositivo médico para diagnóstico *in vitro* cualitativo, que se utiliza junto con otras pruebas de laboratorio como ayuda en el diagnóstico de infecciones bacterianas, de levaduras y otros hongos.

La identificación se realizó a partir de una colonia aislada del microorganismo en estudio junto con la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 que sirve como calibrador, donde se tomó un inóculo bacteriano de cada cepa con un asa calibrada estéril de 1 µl a partir de una colonia aislada en cultivo puro desde una placa de agar Müller Hinton solo, luego se realizó una fina capa con la muestra en cada pocillo correspondiente, de acuerdo a una planilla de trabajo. A medida que se inoculan las muestras se va agregando 1 µL de matriz (solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico, acetonitrilo y ácido

trifluoroacético), con el fin de facilitar la vaporización y la ionización de las proteínas mediante un haz de láser pulsante ultravioleta con longitud de onda de 337 nm.

Una vez seca la matriz se procedió a la lectura en el espectrómetro, el cual tiene asociado un programa informático “VITEK® MS Acquisition Station Software” que está conectado al servidor Myla™ que contiene la base de datos suministrada por el fabricante que permiten la comparación de los espectros proteómicos del aislado a identificar con la base de datos y obtener la identificación de género y especie bacteriana (Figura 2)

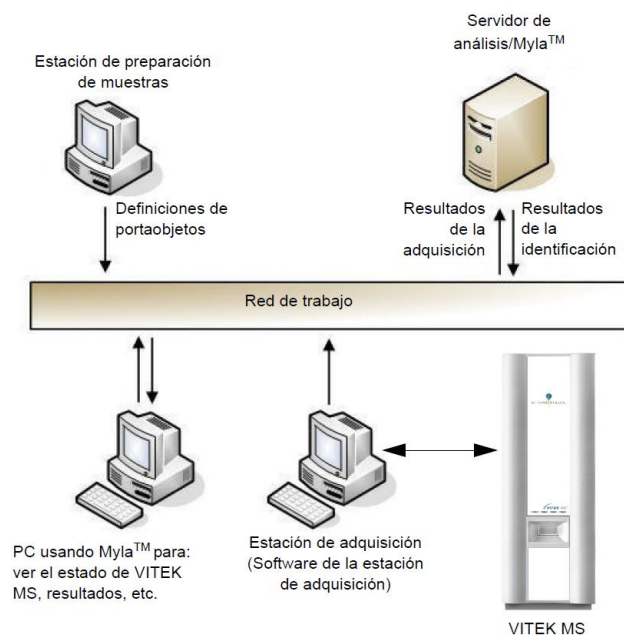


Figura 2: Esquema de comunicación de los software y equipo Vitek MS

10.1.3 Susceptibilidad

El estudio de susceptibilidad se realizó en equipo Vitek 2 Compact®, utilizando las tarjetas AST N249 para bacilos Gram negativos con los criterios de CLSI 2018. Se tomó una asada de cultivo fresco que se resuspendió en 1.8 mL de solución salina estéril (0.45%) para obtener una concentración entre 0.5 y 0.63 en la escala de Mac Farland.

Para esto se utilizó un turbidímetro DensiChek™. Se hidrataron los pocillos de las tarjetas con 100 µl de la suspensión del microorganismo equivalente a 1×10^6 UFC/mL, incubándolos en el equipo según instrucciones del fabricante. Los antibióticos testeados fueron: amikacina, cefazolina, cefotaxima, ciprofloxacina, ertapenen, imipenen, meropenem, gentamicina, piperacilina/tazobactan, ampicilina/sulbactam y trimetropin/sulfametoxazol. Para *Pseudomonas aeruginosa* fueron, amikacina, ciprofloxacina, ceftazidima, cefepime, imipenen, meropenem, gentamicina, piperacilina/tazobactan. Los resultados de sensibilidad y resistencia, fueron interpretados por sistema Experto Avanzado (*Advanced Expert System*™) de VITEK®

10.1.4 Mecanismo de resistencia

10.1.4.1 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las BLEE se detectaron por medio sistema Experto Avanzado (*Advanced Expert System*™) de VITEK 2 compact ® usando las tarjetas AST N249. Esta tarjeta contiene micropocillos con antibióticos y sus inhibidores (ceftazidima, cefotaxima, ceftazidima/ácido clavulánico y cefotaxima/ácido clavulánico) que permiten determinar los puntos de cortes a través de la CIM y ver la diferencia entre el antibiótico y su inhibidor de BLEE.

10.1.4.2 Carbapenemasas

Se utilizó el ensayo de Carba Np Directo que es un método colorimétrico usado en la rutina de los laboratorios de microbiología para determinar la producción de carbapenemasas por cepas resistentes a los carbapenémicos. Se basa en una reacción de

hidrolisis *in vitro* de un lisado bacteriano expuesto a imipenem, esta reacción produce un cambio en el pH, acidificando el medio virando de color rojo a naranja / amarillo.

Protocolo de trabajo:

Se preparó una solución concentrada de rojo fenol al 0.5% p/v. Se tomaron 2 ml de esta solución concentrada bien agitada con 16.6 ml de agua destilada. Se agregó 180 μ l de ZnSO₄ 10 mM a la solución de rojo fenol pH 7.8 para obtener una concentración de ZnSO₄ 0.1 Mm, a esta solución de agregan 100 microlitros de Triton X-100 en concentración final 0.1% vol/vol. y se ajusta a pH 7.8 con NaOH 1 N, obteniendo la solución denominada A (103).

La solución B se preparó agregando 1 ml de solución A en un tubo eppendorf que contiene 6 mg de Tienam® (Imipenem)

Procedimiento:

Se utilizaron cepas frescas, previamente incubada a 37°C por 18 a 24 h, en placa de agar sangre o Müller-Hinton. Para cada determinación se utilizaron 2 tubos Eppendorf, uno con 100 μ l de solución A y el otro con 100 μ l de solución B tubo, a cada tubo se agregó una asada (1 a 2 colonias) de la cepa en estudio, se resuspendió y agitó por 5 segundos, se incubó a 37° C por 2 horas. Se usó un control negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706) y un control positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705). Las interpretaciones de los resultados se basan según lo descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Interpretación resultados Carba NP Directo

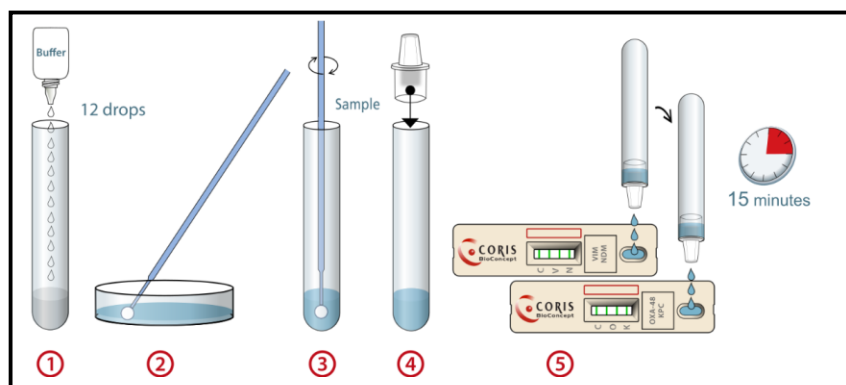
Tubo A (Sin imipenem)	Tubo B (con imipenem)	Interpretación
Rojo	Naranja	Carbapenemasa Positivo
Rojo	Amarillo	Carbapenemasa Positivo
Naranja	Amarillo	Carbapenemasa Positivo
Rojo	Rojo	Carbapenemasa Negativo
Naranja	Naranja	Carbapenemasa Negativo
Amarillo	Rojo/naranja	Test Invalido

Test inmunocromatográfico:

Se utilizó el test comercial OKNVI Resist-5 de Coris BioConcept (Figura 3), el cual permite confirmar un resultado positivo de Carba NP directo y que además permite la detección *in vitro* de carbapenemasas de tipo OXA-48, KPC, NDM, IMP y VIM en cultivos bacterianos. El set trae 2 cassettes de identificación (uno con OXA-48, NMD y KPC; el otro con IMP y VIM), buffer LY-A, cuentagotas.

Procedimiento:

En un tubo plástico se agregaron 12 gotas del buffer LY-A incluido en el set, con un asa estéril, se toma una colonia de cada cepa a estudiar y se homogeniza dentro del tubo con el buffer, luego se coloca el cuentagotas, incluido en el set, en el tubo con la mezcla agregan 3 gotas de la solución a cada uno de los cassettes y la lectura se realizó pasado los 15 minutos.

**Figura 3:** Procedimiento Test comercial OKNVI Resist-5

11.0.- Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y Carbapenemasas utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.

El método utilizado fue el análisis de células intactas, seleccionando colonias de interés, puras (10^5 - 10^7 UFC/ml), detectando directamente la actividad de las BLEE y carbapenemasas capaces de hidrolizar una cefalosporina de 3° generación o un carbapenémico, mediante la comparación de los diferentes espectros generados por los antibióticos intactos o en su forma hidrolizada

El resultado es positivo para la producción de BLEE o carbapenemasas cuando en el espectro obtenido hayan desaparecido los picos correspondientes a la cefalosporina de 3° generación o al carbapenémico de sus formas hidrolizadas o permanezcan intacto característico de su forma natural no hidrolizada (104).

Se utilizó el equipo de BIOMERIEUX VITEK® MS para detectar moléculas de bajo peso molecular, además para el análisis de los espectros se utilizó el software RUO-SARAMIS. Se utilizaron 2 soluciones de antibiótico (Ceftriaxona y ertapenem). La ceftriaxona se preparó a una concentración de 0.5 mg/dl en agua destilada estéril. El ertapenem se preparó a una concentración 0.25 mg/dl en buffer de reacción que se preparó a una concentración de 20 mmol/l Tris-HCl, 0,01% Dodecil sulfato de sodio (SDS), pH 7,0 ajustado con NaOH (utilizando un pHmetro Thermo Scientific™ Orion™ 3-Star Benchtop pH Meter). Los antibióticos se guardaron en alícuotas congeladas a -80 para evitar su degradación.

Para el ensayo de hidrólisis mediante MALDI-TOF MS, se utilizaron cultivos puros de 18 a 24 horas en agar Muller-Hinton con los cuales se realizó una suspensión lechosa en tubos eppendorf con la solución de ceftriaxona o ertapenem respectivamente. La

suspensión se homogeneizó utilizando vortex (Thermolyne Maxi Mix II) por 10 segundos. Posteriormente se incubó durante 4 horas en estufa a 37°C en agitación constante (Agitador Orbital VRN-360, ARQUIMED). Luego de la incubación se centrifugaron (Centrifuga M-240R, BOECO) los tubos eppendorf por 2 min a 12000 g y finalmente con una micropipeta automática se depositó 1 ul del sobrenadante sobre la placa del MALDI-TOF y se dejó secar entre 20 a 24°C. A continuación, se agregó 1 ul de la solución matriz alfa-ciano-4 hidroxí-ácido cinámico (HCCA) de 10 mg/ml y se dejó secar en las mismas condiciones que el sobrenadante. Posteriormente se introdujo la placa al equipo para ser analizada.

El software RUO está constituido por dos programas. El primero "Saramis Target Manager" cumple la función de crear el proyecto para su posterior lectura. El segundo llamado "Shimadzu" en el cual será disparado el láser a cada una de las muestras antes cargadas al proyecto. En este último se creó una calibración específica para la lectura la cual se realizó con la matriz HCCA que permite obtener dos picos, uno de 100 y el otro de 500 Da, lo que sirve para calibrar el equipo en el rango de lectura adecuado para la ceftriaxona y el ertapenem.

La programación utilizada fue la siguiente:

- SHIMADZU" → Acquisition
- Exp Tech: → Mass Range: 100.0 – 500.0
- Firing: → Profiles: 100
- Blank: 50.0
- Pulsed Extraction optimised at (Da): 250.
- La tolerancia utilizada en la calibración fue de 700 ppm.

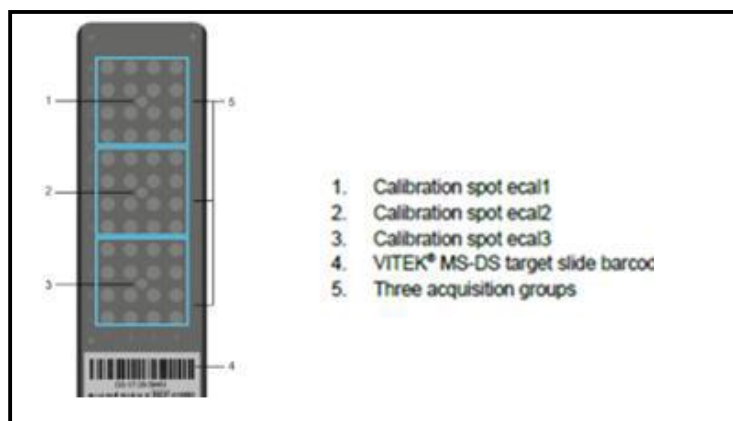
La lectura inicial se realizó en el primer pocillo ya que este contenía la matriz HCCA utilizada como calibrador y así proseguir con la lectura de las muestras.

Finalizada la lectura se comparó el espectro obtenido del antibiótico con los controles y las muestras, buscando la presencia y/o ausencia del pico de 111 Da para ceftriaxona y el de 491 Da para el ertapenem. (106) (107)

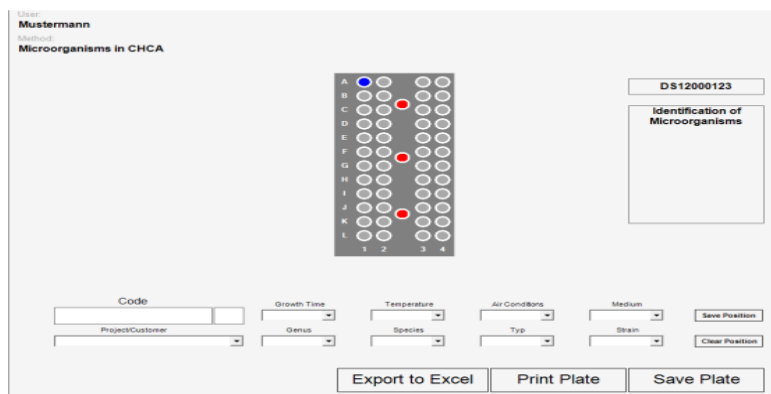
12.0 Biotipificación Proteómica de Bacilos Gram negativos multirresistentes utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.

El análisis se realizó a través del sistema Vitek MS®, el cual usa la tecnología de identificación mediante MALDI-TOF MS usando el soporte informático RUO SARAMIS (bioMerieux®). De acuerdo a los protocolos de Vitek MS® para realizar el estudio, se utilizó una placa que consta de 48 pocillos separados en 3 grupos de adquisición con 16 pocillos (imagen 4). Cada grupo de adquisición posee un pocillo central para la inoculación del control de calibración.

Figura 4: Placa metálica que contiene 48 pocillos separados en 3 grupos



La calibración se realizó utilizando la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 8739, la cual se colocó en los pocillos centrales de la lámina. La placa se dejó secar por unos minutos, mientras que en paralelo se realizó la programación en el Software Target Manager configurando las posiciones de las muestras en las láminas de acuerdo a la planilla de trabajo (figura 5).

Figura 5 Ejemplo Data Entry Screen

Una vez que se configuró la lectura de la placa, usando el software Launchpad, Shimadzu, bioMérieux®, se cargó la lámina en el equipo para que esta pueda realizar la lectura de los pocillos. El equipo permite observar en tiempo real mediante una cámara como se va impactando la muestra, y se visualizan los espectros a medida que se efectúan los disparos. Cada muestra debe cumplir 100 impactos efectivos para obtener un promedio de masas que indicará posteriormente a que microorganismo corresponde.

El análisis de los espectros se realizó mediante el servidor SARAMIS™ Premium (bioMérieux®), el cual permite ver qué porcentaje de impactos resultaron efectivos. Este programa posibilita elegir que muestras usar para realizar un análisis de Taxonomía, por lo que se eligieron aquellas muestras catalogadas con una confiabilidad entre 99.9 a 90%. Luego se eligen las muestras más confiables, y serán importados los espectros a la base de datos del mismo software, el cual realiza las comparaciones y los dendrogramas de acuerdo con el porcentaje de similitud entre las cepas elegidas.

Los espectros se importaron a la base de datos RUO SARAMIS (bioMérieux®) como un listado de peak en el modo “resultados” de SARAMIS™ Premium (bioMérieux®). Para el análisis de agrupaciones de MALDI-TOF MS se evaluaron distintos parámetros, entre

ellos la comparación de los espectros individuales con los espectros de consenso, la definición de un límite de similitud para la identificación de clonalidad y la variación del rango m/z. Luego, se cambia al modo “espectro” del software SARAMIS™ Premium (bioMérieux®), realizando el análisis de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Vitek MS Plus SARAMIS *premium user manual*, bioMérieux®). Los espectros importados se agruparon en una carpeta separada de la base de datos utilizando la función de búsqueda que presenta el software. Se utilizaron tres espectros simples para generar un espectro de consenso para cada cepa. Los peak se definieron como idénticos mediante la aplicación de una precisión de masa del 0,08% como ajuste estándar de SARAMIS™ Premium (bioMérieux®), donde se promediaron las intensidades relativas de las señales. Por último, para el análisis final se eligió un rango de peaks de valores de 2.000 a 20.000 m/z, y se utilizó el análisis de taxonomía relativa del software SARAMIS™ Premium (bioMérieux®) para mostrar el dendrograma resultante, en base a sus diferencias y similitudes en términos relativos (porcentaje de masas coincidentes).

13.0 Estudio de clonalidad por Técnica de campo pulsado

Se procesaron 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* elejidas aleatoriamente y se procesaron de acuerdo a lo establecido en “Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non- O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*” (108) con algunas modificaciones. En breve, se generó una suspensión bacteriana de 0.4 de densidad óptica (O.D) a 420 nm. Se prepararon bloques con agarosa “SeaKem Gold” al 1% (Lonza, Rockland, ME USA) y SDS al 1%. Las células incluidas en el bloque fueron lisadas con 1mg/mL de proteinasa K (Invitrogen, Waltham, MA USA) por 3 hrs a 55 °C. Posteriormente el genoma fue digerido con 50 U

de la enzima de restricción XbaI (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA USA) a 37 °C por 3 hrs. Luego los bloques agarosa se cargaron en un gel de agarosa "Pulse Field Certified" al 1% (Bio-Rad, Hercules, CA USA) con tampón TBE al 0,5% (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). La electroforesis se realizó en un equipo CHEF-DR III system (Bio-Rad) a 14°C por 18.5 hrs, 6 V/cm con un pulso inicial de 6 s y un pulso final de 36 s. En cada gel se incluyeron bloques de la cepa de referencia *Salmonella* Braenderup H9812, los cuales, tratados de la misma forma anteriormente mencionada, con el fin de permitir la normalización de cada gel. Finalmente, los perfiles de las 24 cepas y de la cepa de *Salmonella* Braenderup, fueron analizadas con el programa "Gel Compare II" ver. 5.10 (Applied Maths, SintMartens-Latem, Belgica). Finalmente, los dendrogramas se generaron utilizando el coeficiente de similitud de Dice basado en las bandas y el método UPGMA, con un 1% de tolerancia en la posición de las mismas. (109, 110).

V – RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Cepas, susceptibilidad y mecanismo de resistencia

Las cepas recolectadas a partir de distintos tipos de muestras biológicas (Tabla 2), la distribución según especie fue la siguiente: *Klebsiella pneumoniae* 64 (33.2%), *Escherichia coli* 57 (29.5%), *Pseudomonas aeruginosa* 33 (17.1%), *Enterobacter hormachei* 9 (4.7%), *Enterobacter cloacae* 8 (4.2%), *Klebsiella oxytoca* 8 (4.2%), *Proteus mirabilis* 6 (3.1%), *Enterobacter aerogenes* 3 (1,5%) *Morganella morganii* 2 (1.0%), *Proteus vulgaris* 2 (1.0%), *Rautella planticola*. 1 (0.5%).

Tabla 2. Tipos de muestras biológicas

Muestra	Cantidad	Porcentaje
Urocultivo	77	39,9%
Aspirado endotraqueal	26	13,5%
Hemocultivo	24	12,4%
Tejido Biopsia	18	9,3%
Colección	8	4,1%
Líquido peritoneal	8	4,1%
Herida	5	2,6%
Expectoración	4	2,1%
Secreciones varias	4	2,1%
Secreción traqueostomía	4	2,1%
Punta de catéter (Maki)	3	1,6%
Bilis	2	1,6%
Hemocultivo Cuantitativo	2	1,6%
Lavado bronqueoalveolar	2	1,6%
Líquido ascítico	2	1,6%
Tejido	2	1,6%
Secreción nasotraqueal	1	0,6%
Secreción uretral	1	0,6%
TOTAL	193	100,0%

La distribución de enterobacteriales no considerando *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, fue de 39 cepas, donde el género más aislado fue los *Enterobacter* con 20 aislamientos, siendo el *E. hormachei* con 9 la especie más aislada, se observa de las

muestras que 13 son orinas siendo la más frecuente (tabla 3)

Tabla 3: Distribución de cepas de enterobacteriales, según tipo de muestra, servicio y resultado de estudio fenotípico de BLEE y carbapenemasas

N°	CEPA BACTERIANA	OT	N° ATB	MUESTRA	SERVICIO	BLEE	CARBA	GEN
29	<i>Enterobacter aerogenes</i>	4141736	5479	UROCULTIVO	GERIATRIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
161	<i>Enterobacter aerogenes</i>	4225503	1602	PTA CATETER (MAKI)	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
181	<i>Enterobacter aerogenes</i>	4235957	1811	UROCULTIVO	NEUROLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
60	<i>Enterobacter cloacae</i>	4164465	5806	HEMOCULTIVO	HEMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
120	<i>Enterobacter cloacae</i>	4207254	1305	TEJIDO BIOPSIA	CIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
126	<i>Enterobacter cloacae</i>	4213633	1400	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
129	<i>Enterobacter cloacae</i>	4213946	1405	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
135	<i>Enterobacter cloacae</i>	4215525	1432	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
184	<i>Enterobacter cloacae</i>	4236630	1835	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
185	<i>Enterobacter cloacae</i>	4236995	1863	TEJIDO BIOPSIA	TRAUMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
196	<i>Enterobacter cloacae</i>	4243229	1965	COLECCION ABDOMINAL	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	KPC
70	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4170075	5886	UROCULTIVO	INT QX	NEGATIVA	NEGATIVA	
80	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4179535	6053	BIOPSIA	CIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
102	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4193922	1112	BIOPSIA	GASTRO	NEGATIVA	NEGATIVA	
107	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4193894	1137	COLECCION ABDOMINAL	INT MED	NEGATIVA	NEGATIVA	
114	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4202621	1243	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
133	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4214520	1417	UROCULTIVO	UROLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
152	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4223541	1567	UROCULTIVO	INT MEDICO	NEGATIVA	NEGATIVA	
183	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4326989	1832	TEJIDO BIOPSIA	TRAUMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
186	<i>Enterobacter hormaechei</i>	4236995	1864	TEJIDO BIOPSIA	TRAUMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
111	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4201051	1214	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA	
142	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4218131	1478	COLECCION PELVIANA	UNI	POSITIVA	NEGATIVA	
143	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4218309	1480	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA	
174	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4234055	1786	SECRECION TRAQUEOSTOMIA	INT NEURQX	NEGATIVA	NEGATIVA	
198	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4247384	2036	AET	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA	
201	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4247384	2036	AET	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA	
213	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4254196	2139	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA	
218	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4256063	2186	TEJIDO BIOPSIA	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA	
18	<i>Morganella morganii</i>	4133355	5349	PIEL DE PIERNA	MEDICINA	NEGATIVA	NEGATIVA	
180	<i>Morganella morganii</i>	4234928	1810	HERIDA	NEFRO	NEGATIVA	NEGATIVA	
58	<i>Proteus mirabilis</i>	4162560	5781	BIOPSIA	CIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
154	<i>Proteus mirabilis</i>	4224289	1584	UROCULTIVO	GASTRO	NEGATIVA	NEGATIVA	
166	<i>Proteus mirabilis</i>	4230487	1684	TEJIDO BIOPSIA	TRAUMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
168	<i>Proteus mirabilis</i>	4230494	1707	PROTESIS DE CADERA	TRAUMATOLOGIA	NEGATIVA	NEGATIVA	
192	<i>Proteus mirabilis</i>	4241030	1925	TEJIDO BIOPSIA	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
211	<i>Proteus mirabilis</i>	4253205	2128/2130	TEJIDO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA	
110	<i>Proteus vulgaris</i>	4198605	1198	UROCULTIVO	MEDICINA	NEGATIVA	NEGATIVA	
175	<i>Proteus vulgaris</i>	4234055	1788	SECRECION TRAQUEOSTOMIA	INT NEURQX	NEGATIVA	NEGATIVA	
195	<i>Raultella planticola</i>	4243229	1966	COLECCION ABDOMINAL	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	KPC

La distribución de *Klebsiella pneumoniae* fue de 64 cepas donde 60 eran productoras de BLEE y 1 de carbapenemasas de tipo KPC, donde la muestra de orina fue la más frecuente (30 muestras) y los servicios clínicos donde se aislaron principalmente estas cepas fue de UCI e intermedio con 20 y 10 aislamientos respectivamente (tabla 4)

Tabla 4: Distribución de cepas de *Klebsiella pneumoniae*. según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE, carbapenemasas y susceptibilidad

N°	CEPA BACTERIANA	MUESTRA	SERVICIO	BLEE	CARBA	GEN	AMK	SAM	CZO	CTX	CIP	ETP	GEN	IPM	MEM	NIT	TZP	SXT
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
123	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO PERITONEAL	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	S	N/C	R	R
159	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
194	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEJIDO BIOPSIA	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	N/C	I	R
204	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO PERITONEAL	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVO		S	R	R	R	R	R	S	S	S	N/C	R	R
216	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO PERITONEAL	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	N/C	R
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	I	N/C	R	R
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMO CUANTITATIVO	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	I	N/C	R	R
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	S
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	I	N/C	R	R
165	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HERIDA	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	S	S	S	S	S	S	S	N/C	S	S
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO	GASTRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	R	S
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	GASTRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	R	R
101	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BIOPSIA	GASTRO	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	N/C	R	S
169	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO ASCITICO	GASTRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	R	R
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	GERIATRIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
59	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CATETERISMO (SONDEO)	GERIATRIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S
108	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO	GERIATRIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	I	S
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	R
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S
73	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R
86	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R
103	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
219	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	INT MED	POSITIVO	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	I	R
74	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT QX	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
190	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	INT QX	POSITIVO	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
214	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MATERNIDAD	POSITIVO	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MED FISICA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NECROSIS PANCREATICA	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	N/C	R	R
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BIOPSIA	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	I	N/C	R	R
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SECRECION LESION	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	I	N/C	R	R	R
127	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	R
128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	R
148	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R
67	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S
89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	COLECCION ABDOMINAL	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	N/C	R	S
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UC	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HERIDA	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	R	R
61	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	R	N/C	R	R
64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
79	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	KPC	R	R	R	R	R	R	S	R	R	N/C	R	S
96	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO PERITONEAL	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	I	N/C	R	S
98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
137	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	R	N/C	R	R
138	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LBA	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	N/C	S	R
151	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
158	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R
173	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PUNTA DE CATETER (MAKI)	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	R	S	S	N/C	R	R
189	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LIQUIDO ASCITICO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	N/C	R	R
191	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEJIDO BIOPSIA	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	I	S	S	S	N/C	I	R
212	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEJIDO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	N/C	R	R
221	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	I	R	N/C	R	R
222	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO PAREADO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	S	I	R	N/C	R	R
153	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HEMOCULTIVO	UHO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	I	S	S	S	S	N/C	I	R
155	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UHO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UROCULTIVO	UROLOGIA	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible, N/C: No corresponde. AMK: amikacina, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, , TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

La distribución de *Escherichia coli* fue de 57 cepas donde 54 eran productoras de BLEE y 1 de carbapenemasas de tipo KPC, donde las muestras de mayor frecuencia de aislamiento fueron orina y hemocultivos con 25 y 10 aislamientos respectivamente los servicios clínicos donde se aislaron principalmente estas cepas fue de UCI e intermedio ambas con 12 aislamientos respectivamente (tabla 5)

Tabla 5: Distribución de cepas de *Escherichia coli*. según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE, carbapenemasas y susceptibilidad

N°	CEPA BACTERIANA	MUESTRA	SERVICIO	BLEE	CARBA	GEN	AMK	SAM	CZO	CTX	CIP	ETP	FOS	GEN	IPM	MEM	NIT	TZP	SXT	
1	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2	<i>Escherichia coli</i>	BILIS	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	S	S	S	N/C	I	S	
6	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	URGENCIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
9	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
10	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	IQX	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
16	<i>Escherichia coli</i>	OLECCIÓN ABDOMINAL	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	S	S	S	N/C	I	S	
26	<i>Escherichia coli</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
31	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	NEUROCIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	S	S	
41	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
45	<i>Escherichia coli</i>	AET	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
48	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	TOMA MUESTRA	POSITIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	S	R	
51	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
54	<i>Escherichia coli</i>	SECRECIÓN URETRAL	TOMA MUESTRA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
55	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	S	
56	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	N/C	S	R	
57	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	S	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
62	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
63	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	HEMATOLOGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
66	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	GASTRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
69	<i>Escherichia coli</i>	RECION TRAQUEOSTO	INT QX	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	R	R	
71	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	I	S	
76	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	
77	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	GASTRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
81	<i>Escherichia coli</i>	BIOPSIA	MEDICINA	NEGATIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
88	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
90	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	INT QX	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	R	S	S	S	S	R	
91	<i>Escherichia coli</i>	LIQUIDO PERITONEAL	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	S	
92	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	I	S	
93	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	S	
94	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	S	S	
99	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	I	R	
100	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R		R	
104	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	S	R	
105	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
106	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	ENSENADA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	S	S	R	
117	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
118	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	
119	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	MEDICINA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	
122	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	GERIATRIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	
125	<i>Escherichia coli</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
131	<i>Escherichia coli</i>	AET	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	S	S	N/C	I	S	S	N/C	S	R	
134	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	GERIATRIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	
149	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	
150	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	
163	<i>Escherichia coli</i>	OLECCION PERI RECTA	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
164	<i>Escherichia coli</i>	LIQUIDO PERITONEAL	CIRUGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	S	S	S	N/C	S	S	
167	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
170	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
171	<i>Escherichia coli</i>	LIQUIDO PERITONEAL	GINECOLOGIA	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
172	<i>Escherichia coli</i>	NTA DE CATETER (M)	UCI	POSITIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	S	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
176	<i>Escherichia coli</i>	HERIDA	INT MED	POSITIVA	NEGATIVA		S	I	R	R	S	S	N/C	R	S	S	N/C	S	R	
178	<i>Escherichia coli</i>	HERIDA	NEFRO	POSITIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	R	S	N/C	R	S	S	N/C	S	S	
206	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	NEUROCIRUGIA	POSITIVO	NEGATIVO		S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	
207	<i>Escherichia coli</i>	LIQUIDO PERITONEAL	CIRUGIA	POSITIVO	NEGATIVO		S	S	R	R	R	S	N/C	S	S	S	N/C	S	R	
208	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	UC	POSITIVO	NEGATIVO		S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	
209	<i>Escherichia coli</i>	UROCULTIVO	CIRUGIA	POSITIVO	NEGATIVO		S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
210	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	NEGATIVA	POSITIVO	KPC	I	R	R	R	R	R	N/C	S	R	R	N/C	R	R	

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible, N/C: No corresponde. AMK: amikacina,, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, , TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

La distribución de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 33 cepas donde 16 eran productoras de carbapenemasas, 2 de de tipo KPC y 14 de tipo VIM, donde las muestras de mayor frecuencia de aislamiento fueron aspirado endotraqueal y orina con 11 y 7 aislamientos respectivamente los servicios clínicos donde se aislaron principalmente estas cepas fueron de UCI e intermedio con 19 y 8 aislamientos respectivamente (tabla 6)

Tabla 6: Distribución de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* según tipo de muestra, servicio, resultado de estudio fenotípico de BLEE, carbapenemasas y susceptibilidad

N°	CEPA BACTERIANA	MUESTRA	SERVICIO	BLEE	CARBA	GEN	AMK	FEP	CAZ	CIP	COL	GEN	IPM	MEM	TZP
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	R	R	R	I	R	R	R	R	R
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HEMOCULTIVO	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	R	R	R	R	S	R	R	R	R
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BIOPSIA	CIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	-	R	R	R	R
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	R	R	R	R	-	R	R	R	R
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UC	NEGATIVA	NEGATIVA		R	I	I	S	-	I	R	R	S
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		R	I	I	R	S	R	R	R	R
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	S	R	R	R	R
38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	S	S	I	S	S	R	R	S	S
39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	NEGATIVA	NEGATIVA		S	S	I	S	S	R	R	S	S
42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	INT MED	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	S	S	I	R	R	R
46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BIOPSIA	MEDICINA	NEGATIVA	POSITIVA	KPC	S	R	R	R	S	S	R	R	R
53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	S	R	R	S	S	R	S	S
65	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	INT NQX	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	R	S	S	R	R	I
68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RECION NASOTRAQUEAL	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		R	R	R	R	S	R	R	I	R
72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	R	R	R	R	R	R	R	R	R
78	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	S	I	S		S	R	R	S
82	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	S	R	R	S	S	R	R	R	R
87	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	I	R	R	S	S	R	R	R	R
112	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HEMOCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	S	I	S	S	S	R	R	R
113	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LBA	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	S	I	S	S	S	R	R	R
115	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TEJIDO BIOPSIA	CIRUGIA	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	I	R	S	S	R	R	I
116	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RECION TRAQUEOSTOMIA	MEDICINA	NEGATIVA	POSITIVA	KPC	S	R	R	R	R	I	R	R	R
141	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	S	R	R	S	S	R	R	R	R
145	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BILIS	DAD CORONA	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	I	R	R	S	S	R	R	R	R
147	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		S	R	R	S	S	I	R	R	R
187	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	NEGATIVA	POSITIVA	VIM	I	R	R	S	S	R	R	R	R
193	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	COLECCION	INT QX	NEGATIVA	NEGATIVA		R	R	R	I		I	R	R	I
197	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		I	S	I	S	S	I	R	R	S
199	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	INT QX	NEGATIVA	POSITIVO	VIM	I	R	R	R	S	I	R	R	R
203	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UCI	NEGATIVA	NEGATIVA		I	I	I	R	S	I	R	R	R
205	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	POSITIVO	VIM	R	I	I	I		R	R	R	R
215	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	NEGATIVA	POSITIVO	VIM	S	I	I	S	S	R	R	R	I
217	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	NEGATIVA	POSITIVO	VIM	R	I	R	S		R	R	R	S

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, GEN: gentamicina CEZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CEP: cefepime, IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, COL: Colistin.

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron un perfil de multirresistencia, con un 100% de resistencia a cefazolina, ampicilina-sulbactam y cefotaxima (resistencia evaluada por CIM) con respecto a los carbapenemicos el resultado fue variable meropenem, se obtuvo una resistencia de 20.7% de resistencia a diferencia de imipenem con solo 1.6% y el ertapenem con una resistencia de 50.7% (91,0%). Con respecto a los antimicrobianos no β -lactámicos ensayados, los microorganismos presentaron 89% de resistencia a ciprofloxacina y amikacina. (Figura 6 y tabla 7).

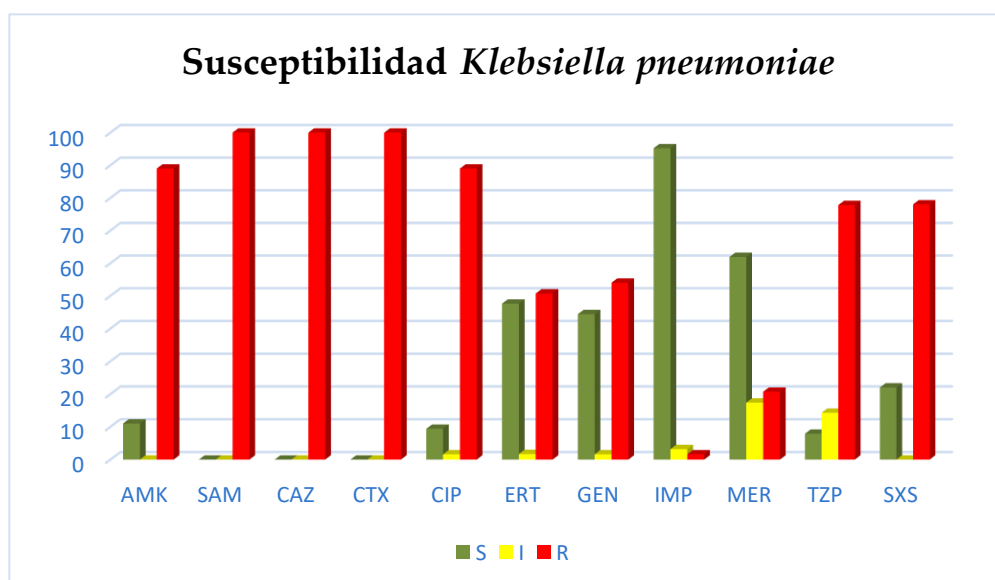


Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, , TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

Tabla 7: Valores porcentuales estudio susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae*

	S	I	R	% Total
AMK	11	0	89	100
SAM	0	0	100	100
CAZ	0	0	100	100
CTX	0	0	100	100
CIP	9,4	1,6	89	100
ERT	47,6	1,7	50,7	100
GEN	44,4	1,6	54	100
IMP	95,2	3,2	1,6	100
MER	61,9	17,4	20,7	100
TZP	7,9	14,3	77,8	100
SXS	22	0	78	100

. AMK: amikacina, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

Las cepas de *Escherichia coli* presentaron un perfil de multirresistencia, con un 100% de resistencia a cefazolina y cefotaxima (resistencia evaluada por CIM), para ampicilina-Sulbactam 71.9 % de resistencia. Con respecto a los carbapenemicos el resultado fue semejante obteniendo imipenem, meropenem y ertapenem solo un 1.8% de resistencia. Con respecto a los antimicrobianos no β -lactámicos ensayados, los microorganismos presentaron resistencia a ciprofloxacina, amikacina, gentamicina de 66.7%, 96.6% y 50.9% respectivamente. (figura 7 y tabla 8)

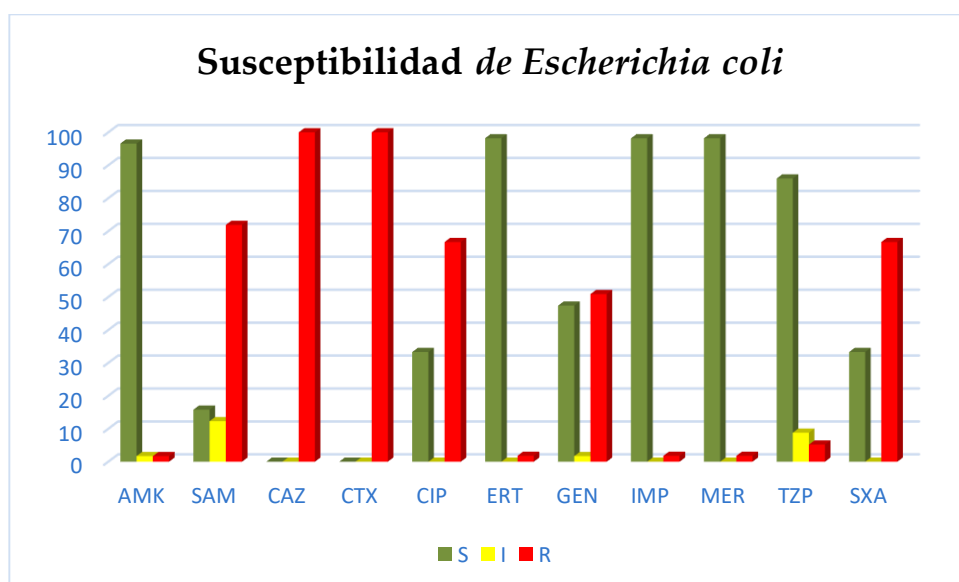


Figura 7: Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli*

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

Tabla 8: Valores porcentuales del estudio de susceptibilidad de *Escherichia coli*

	S	I	R	% Total
AMK	96,6	1,7	1,7	100
SAM	15,8	12,3	71,9	100
CAZ	0	0	100	100
CTX	0	0	100	100
CIP	33,3	0	66,7	100
ERT	98,2	0	1,8	100
GEN	47,4	1,7	50,9	100
IMP	98,2	0	1,8	100
MER	98,2	0	1,8	100
TZP	86	8,8	5,2	100
SXA	33,3	0	66,7	100

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, SAM: ampicilina/ sulbactam, CAZ: cefazolina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, ERT: ertapenem, GEN: gentamicina IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, SXS: trimetoprim/sulfametoxazol

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron un perfil de multiresistencia con un 100% de resistencia a imipenem, 63.6% de resistencia y 36.4 de susceptibilidad intermedia al antibiótico ceftazidima, meropenem con una resistencia 87.9%. Con respecto a los antimicrobianos no β -lactámicos ensayados, los microorganismos presentaron 42.4% de resistencia a ciprofloxacina, 45.4 % a amikacina, 54.5% a gentamicina y colistin 11.5 %. (figura 8 y tabla 9)

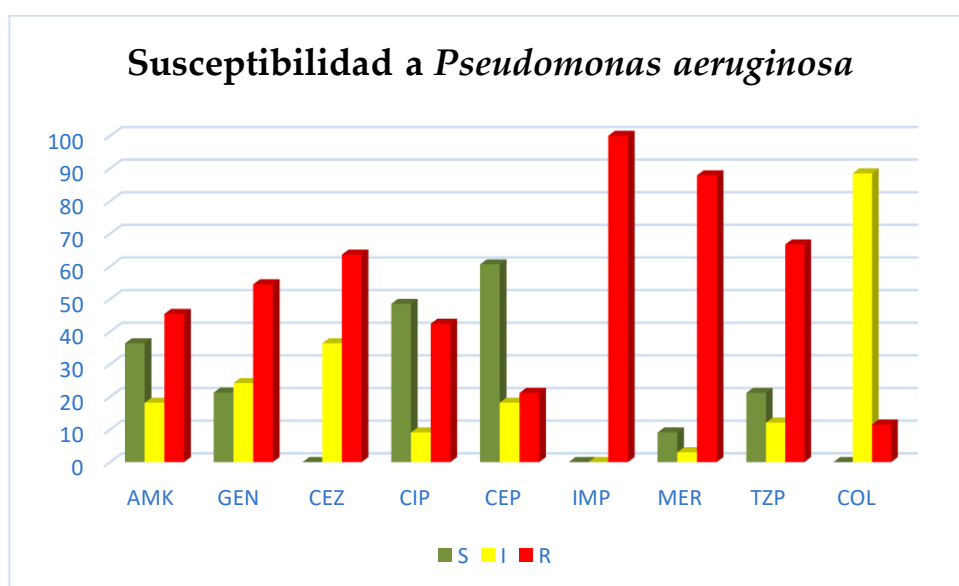


Figura 8. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, GEN: gentamicina CEZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CEP: cefepime, IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, COL: Colistin.

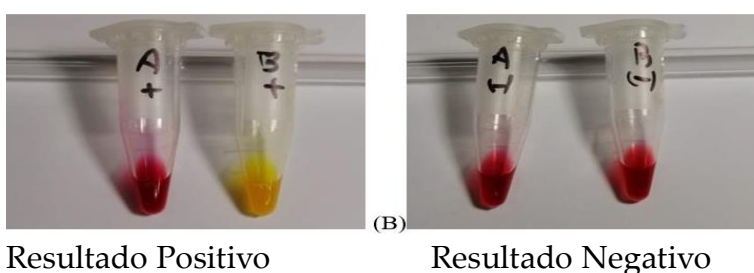
Tabla 9: Valores porcentuales del estudio de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiótico	S	I	R	% Total
AMK	36,4	18,2	45,4	100
GEN	21,3	24,2	54,5	100
CEZ	0	36,4	63,6	100
CIP	48,5	9,1	42,4	100
CEP	60,6	18,2	21,2	100
IMP	0	0	100	100
MER	9,1	3	87,9	100
TZP	21,2	12,1	66,7	100
COL	0	88,5	11,5	100

R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMK: amikacina, GEN: gentamicina CEZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CEP: cefepime, IMP: imipenem, MER: meropenem, TZP: piperacilina/tazobactam, COL: Colistin

De las 193 cepas testeadas se determinaron 20 cepas productoras de carbapenemasas, 5 de tipo KPC y 15 de tipo VIM (tabla 10) (figura 9 y 10) donde *Pseudomonas aeruginosa* es la bacteria más prevalente productora carbapenemasas aisladas de servicio críticos de pacientes con ventilación mecánica (tabla 11)

Figura 9: Test Carba NP Directo



Resultado Positivo

Resultado Negativo

Figura 10: Test de inmunocromatografía (Coris®)



Resultados positivos para carbapenemasas de tipo VIM y KPC

Tabla 10: Detección de carbapenemasas

Total Cepas	Cepas Carbapenamsas (+)	KPC	VIM	Total porcentual
193	20	5	15	10,40%

Tabla 11: Distribución de las carbapenemasas

N°	CEPA BACTERIANA	MUESTRA	SERVICIO	CARBA	GEN
79	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AET	UCI	POSITIVA	KPC
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	POSITIVA	VIM
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	POSITIVA	VIM
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	POSITIVA	VIM
35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	POSITIVA	VIM
42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	UCI	POSITIVA	VIM
68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AET	INT MED	POSITIVA	VIM
39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BILIS	UC	POSITIVA	VIM
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BIOPSIA	TRAUMA	POSITIVA	VIM
196	<i>Enterobacter cloacae</i>	COLECCION ABDOMINAL	UCI	POSITIVA	KPC
195	<i>Raultella planticola</i>	COLECCION ABDOMINAL	UCI	POSITIVA	KPC
78	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UCI	POSITIVA	VIM
72	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EXPECTORACION	UCI	POSITIVA	VIM
210	<i>Escherichia coli</i>	HEMOCULTIVO	UCI	POSITIVA	KPC
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HEMOCULTIVO	INT MED	POSITIVA	VIM
38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SECRECION TRAQUEOSTOMIA	MEDICINA	POSITIVA	VIM
46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	INT QX	POSITIVA	KPC
33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	VIM
53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	VIM
65	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UROCULTIVO	UCI	POSITIVA	VIM

La detección de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se realizó en equipo automatizado Vitek 2 compact® (figura 11). De las 137 cepas testeadas se determinaron 121 cepas BLEE positiva (tabla 12). Donde se observa que *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* tienen 60 y 54 cepas BLEE positiva. (tabla 13)

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis: 10,17 horas		Estado: Final		
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	POS	+	Ertapenem	<= 0,5	S
Ampicilina/Sulbactam	>= 32	R	Imipenem	<= 0,25	S
Piperacilina/Tazobactam	>= 128	R	Meropenem	<= 0,25	S
Cefazolina	>= 64	R	Amicacina	16	S
Cefuroxima	>= 64	R	Gentamicina	<= 1	S
Cefuroxima Axetil	>= 64	R	Ciprofloxacino	>= 4	R
Cefotaxima	>= 64	R	Tigeciclina	<= 0,5	S
Ceftazidima	16	*R	Colistina		
Cefepima	>= 64	R	Trimetoprima/Sulfametoxazol	>= 320	R

+= Antibiótico deducido * = AES modificado ** = Usuario modificado

Conclusiones de AES	
Nivel de confianza:	Coherente

Figura 11: Informe estudio de susceptibilidad sistema Vitek 2 compact ®, positivo para BLEE

Tabla 12: Detección de cepas productoras de BLEE

Total Cepas	BLEE (+)	BLEE(-)	Total porcentual
137	121	17	88,30%

Tabla 13: Distribución de cepas productoras de BLEE

Bacteria	Total cepas	BLEE (+)	BLEE (-)	% cepas BLEE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	60	4	43,80%
<i>Escherichia coli</i>	57	54	3	39,40%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	7	1	5,10%
<i>Proteus mirabilis</i>	6	0	6	0%
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	2	0%
Total	137	121	17	88,30%

2.- Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de tipo Carbapenemasas utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF

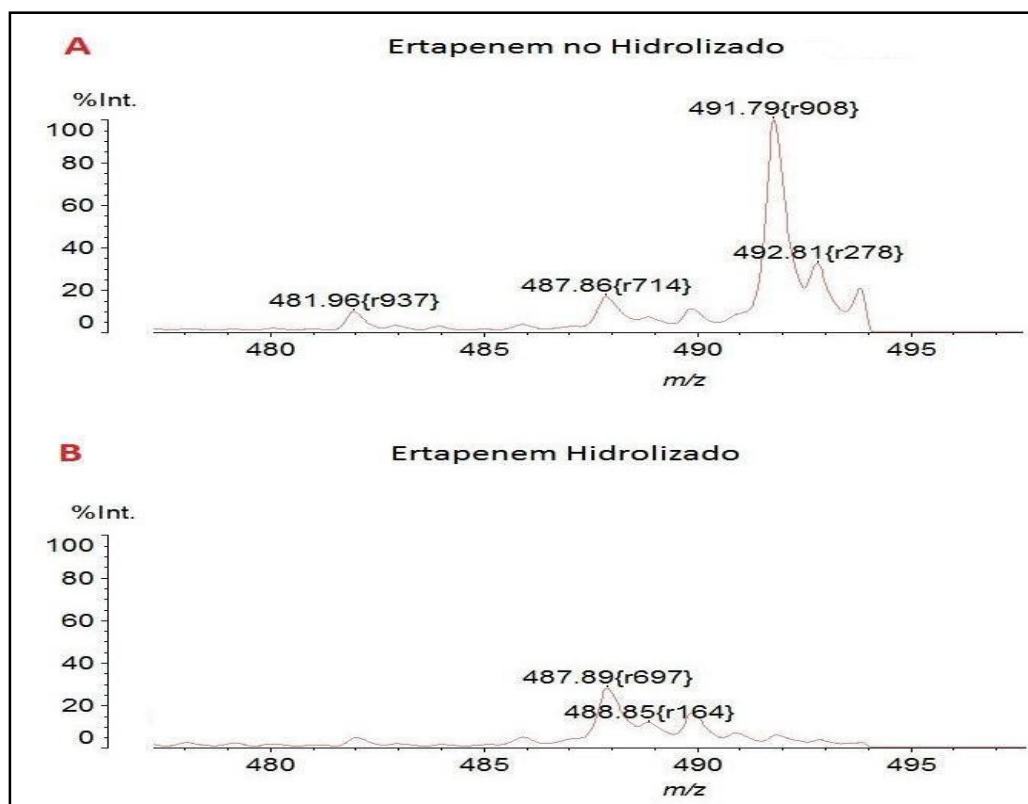


FIGURA 12. Espectros correspondientes al ertapenem hidrolizado y no hidrolizado

En el análisis de los espectros obtenidos en MALDITOF MS del antibiótico ertapenem, se observa la presencia del pico de 491 Da correspondiente al ertapenem no hidrolizado (figura 12 A). Cuando el ertapenem es hidrolizado por acción de una carbapenemasas se observa la ausencia del pico de 491 Da correspondiente al ertapenem hidrolizado. (figura 12 B)

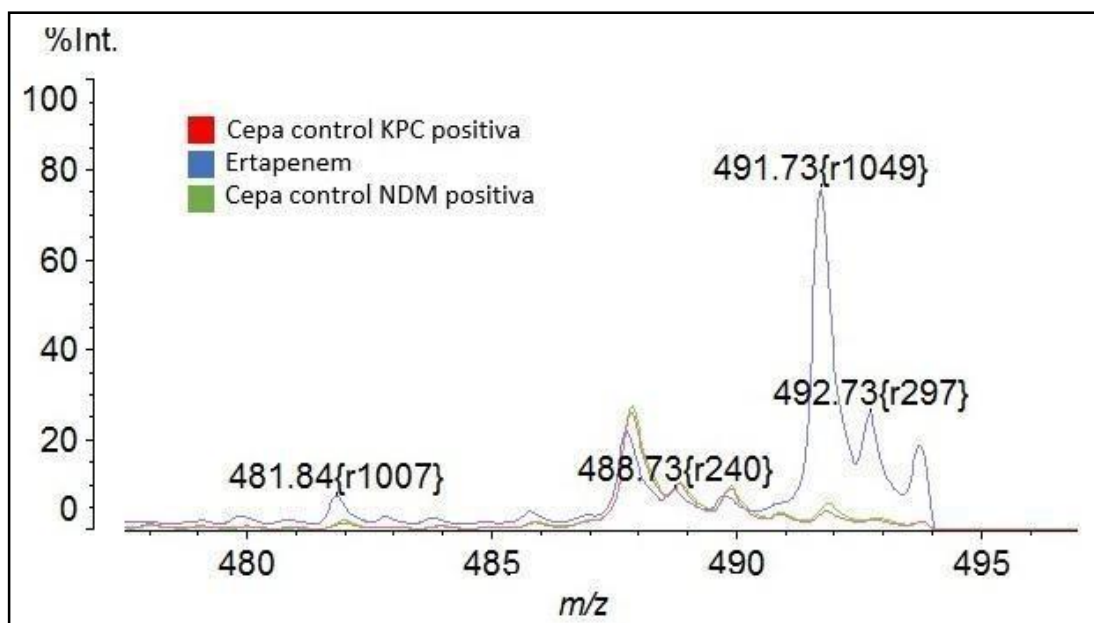


FIGURA 13. Comparación espectros del ertapenem incubado con las cepas controles productoras de KPC y NDM vs. el espectro del ertapenem no hidrolizado. Al analizar los espectros correspondientes al ertapenem incubado con las cepas controles productoras de carbapenemasa tipo KPC y NDM se logra observar la desaparición del pico a los 491 Da en comparación con el antibiótico solo. (figura 13)

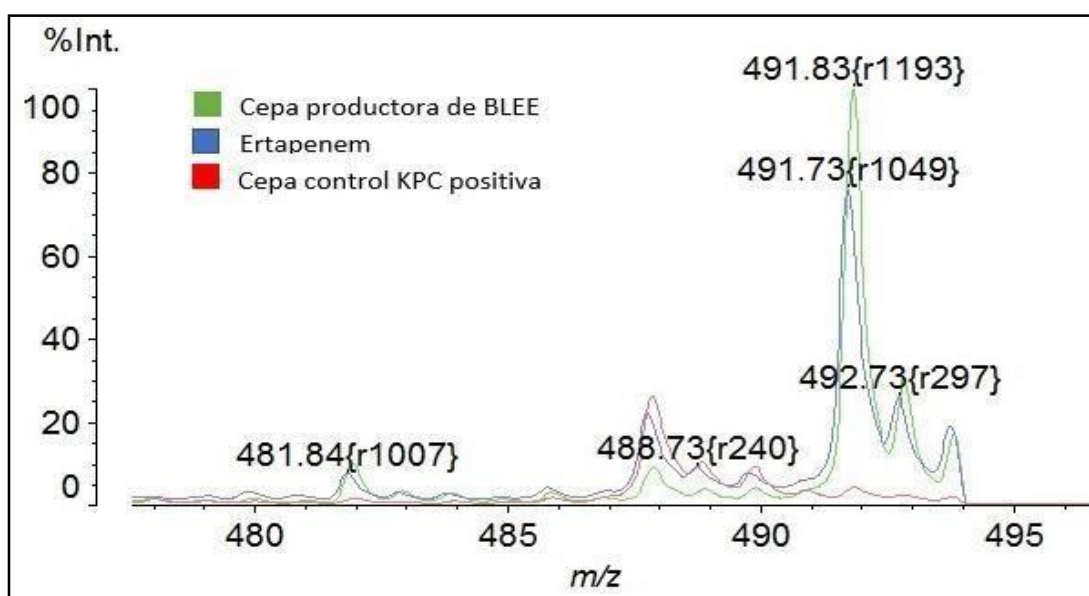


FIGURA 14. Comparación de los espectros del ertapenem incubados con cepa productora de BLEE, cepa control productora de KPC y ertapenem no hidrolizado

Al analizar los espectros correspondientes al ertapenem incubado con una cepa productora de BLEE y una cepa control productora de KPC se logra observar la desaparición del pico a los 491 Da en la cepa control, sin embargo, en la cepa productora de BLEE el pico a los 491 Da permanece intacto (figura 14).

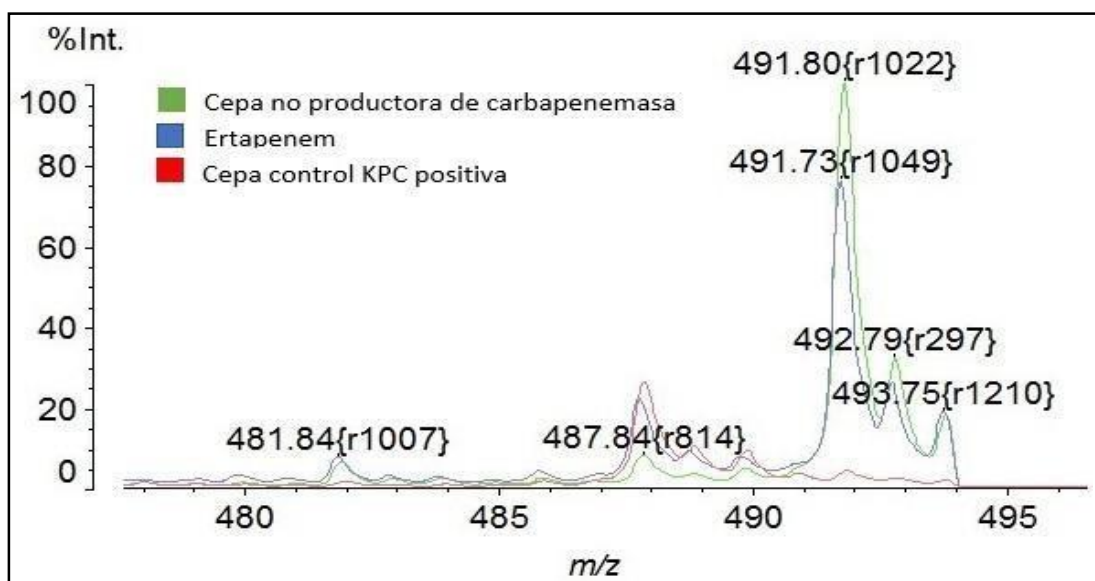


FIGURA 15. Comparación de espectros del ertapenem incubado con cepa control productora de KPC, cepa no productora de carbapenemasas y ertapenem no hidrolizado.

Al analizar los espectros correspondientes al ertapenem con una cepa control productora de KPC y una cepa no productora de carbapenemasas. se logra observar la desaparición del pico a los 491 Da en la cepa control, sin embargo, en la cepa no productora de carbapenemasas el pico a los 491 Da permanece intacto (figura 15)

Al analizar el resultado de las 45 cepas que se incubaron con ertapenem según protocolo establecido para software RUO-SARAMIS, se logró detectar 14 cepas productoras de carbapenemas de las 15 descritas (confirmadas por métodos inmunocromatográfico y moleculares) al analizar el pico a los 491 Da en donde se consideró positivo cuando este pico desaparece o disminuye en relación al pico original (tabla 14). Las cepas productoras de carbapenemasas 11 eran *Pseudomonas aeruginosa* de las cuales 10 son VIM y 1 KPC (tabla 15)

TABLA 14. Descripción de la presencia/ausencia del pico del ertapenem en las cepas estudiada

CEPAS		TOTAL	PICO 491 Da
PRODUCTORES DE CARBAPENEMASAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	AUSENTE/ DISMINUIDO
	<i>Reutella planticola</i>	1	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
	<i>Escherichia coli</i>	2	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	PRESENTE
PRODUCTORES DE BLEE	<i>Escherichia coli</i>	6	PRESENTE
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	
NO PRODUCTORAS DE BLEE Y/O CARBAPENEMASAS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	PRESENTE
	<i>Escherichia coli</i>	2	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
	<i>Morganella morganii</i>	1	
TOTAL		45	

TABLA 15. Identificación de cepas productoras de carbapenemasas, BLEE y no productoras de enzimas hidrolíticas con Carba NP y RUO-SARAMIS.

N°	CARBAPENEMASAS			BLEE			NEGATIVAS		
	CP	C NP	R-S	CP	C NP	R-S	CP	C NP	R-S
1	ESCO	✓	✓	ESCO	X	X	KLPN	X	X
2	PSAE	✓	X	ESCO	X	X	MOMO	X	X
3	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
4	PSAE	✓	✓	ESCO	X	X	PSAE	X	X
5	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
6	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	ENAE	X	X
7	KLPN	✓	✓	ESCO	X	X	ESCO	X	X
8	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
9	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
10	PSAE	✓	✓	ESCO	X	X	PASE	X	X
11	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	ESCO	X	X
12	PSAE	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
13	PSAE	✓	✓	ESCO	X	X	PSAE	X	X
14	RAPL	✓	✓	KLPN	X	X	PSAE	X	X
15	ESCO	✓	✓	ESCO	X	X	PSAE	X	X

Tabla 15: CP: Cepa, CNP: Carba NP directo, R-S: RUO-SARAMIS

✓: Positivo, X: Negativo

ESCO: *Escherichia coli* PSAE: *Pseudomonas aeruginosa*, KLPN: *Klebsiella pneumoniae*

RAPL: *Routella planticola*, ENAE: *Enterobacter aerogenes*

MOMO: *Morganella morganii*

Al analizar los resultados para la detección de carbapenemasas por MALDI-TOF MS (tabla 16), se logró determinar para este estudio que la sensibilidad fue de un 93.3% y especificidad de un 100%, determinando que el valor predictivo positivo fue de 100% y el negativo de un 96.7% (figura 16), sin embargo, esto puede variar dependiendo de la prevalencia bacteriana de los aislados.

TABLA 16. Resultados de la acción de las carbapenemasas por VITEK[®] MS.

	Productores Carbapenemasas	No Productores Carbapenemasas	Total
Positivo	14	0	14
Negativo	1	30	31
Total	15	30	45

Tabla 16: Representación de los resultados obtenidos de las 45 cepas medidas por metodología VITEK[®] MS.

FIGURA 16. Cálculo sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

Cálculo Sensibilidad: $(14/15) \times 100 = 93,3 \%$

Cálculo Especificidad: $(30/30) \times 100 = 100 \%$

Cálculo VPP: $(15/ 15) \times 100 = 100\%$ Cálculo

VPN: $(30/31) \times 100 = 96,7\%$

3.- Detección de Bacilos Gram Negativos productores de Betalactamasas de tipo betalactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.

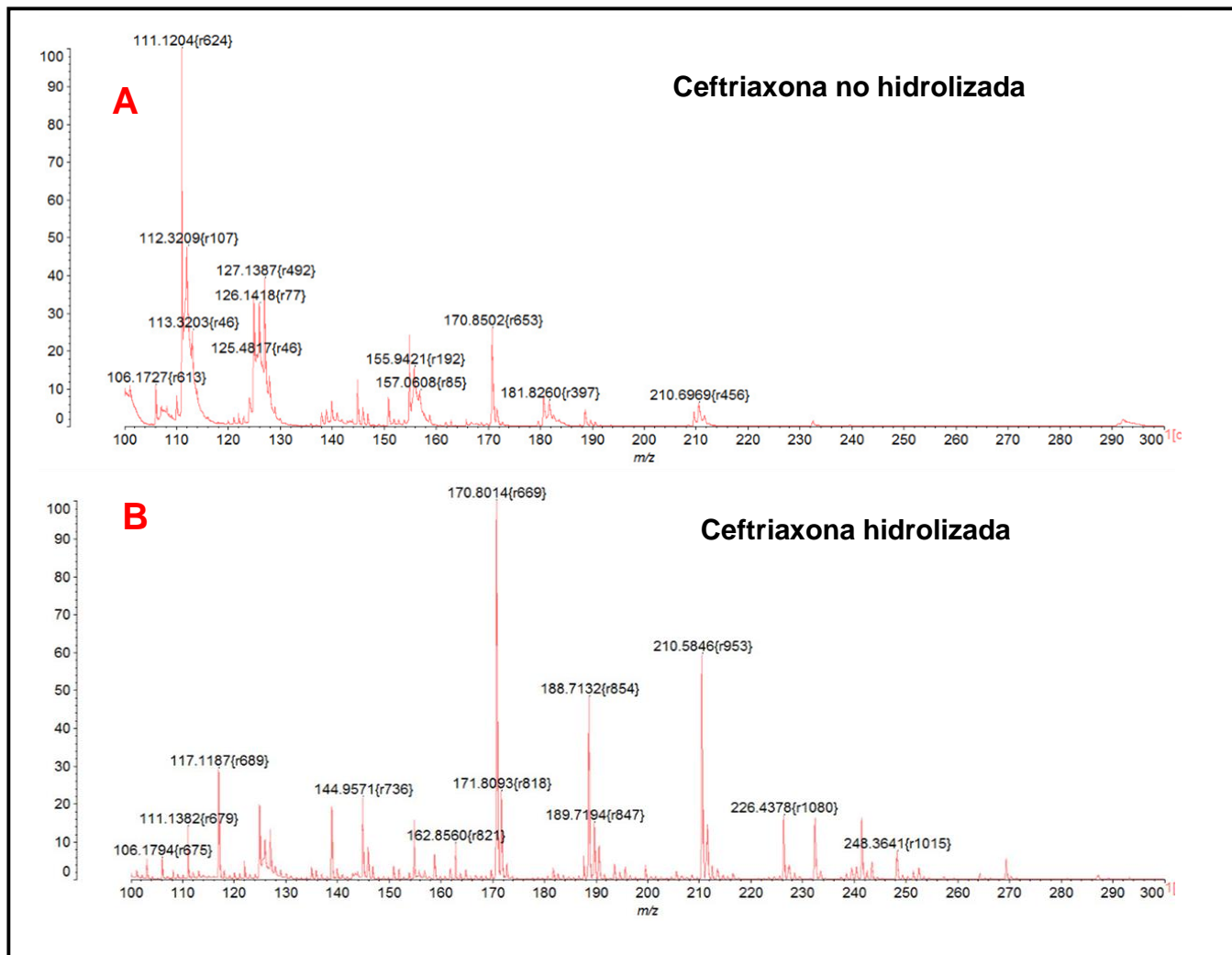


FIGURA 17. Espectros correspondientes a la ceftriaxona hidrolizado y no hidrolizado

En el análisis de los espectros obtenidos en MALDITOF MS del antibiótico ceftriaxona, se observa la presencia del pico de 111 Da correspondiente a la ceftriaxona no hidrolizado (figura 17 A). Cuando la ceftriaxona esta hidrolizado por acción de una BLEE se observa la ausencia del pico de 111 Da correspondiente a la ceftriaxona hidrolizada. (figura 17 B)

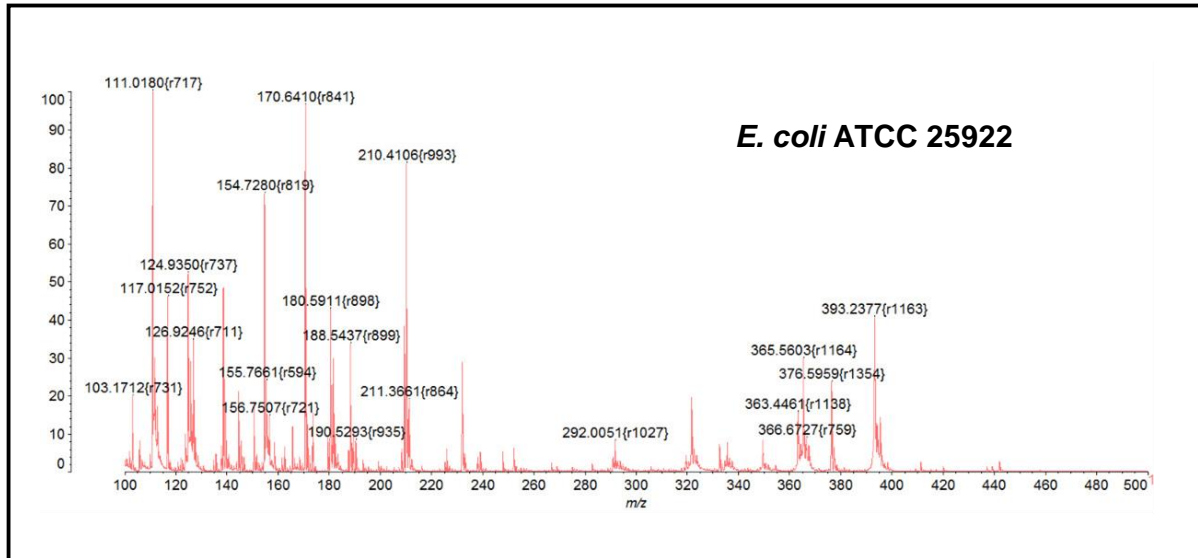


FIGURA 18. Espectros de la ceftriaxona incubada con la *Escherichia coli* ATCC 25922 (Control Negativo)

Al analizar los espectros correspondientes a la ceftriaxona incubada con la cepa control negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922) se logra observar el pico a los 111 Da (figura 18)

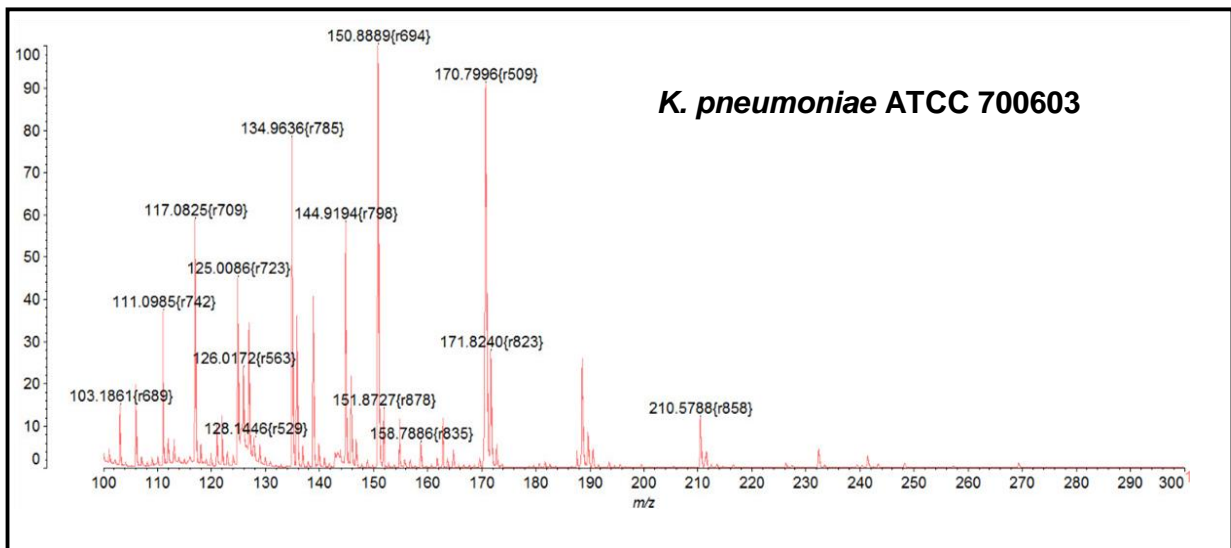


FIGURA 19. Espectros de la ceftriaxona incubada con la *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Control Positivo)

Al analizar los espectros correspondientes a la ceftriaxona incubada con la cepa control positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) se observa una disminución de la intensidad porcentual de un 40% del pico a los 111 Da (figura 19).

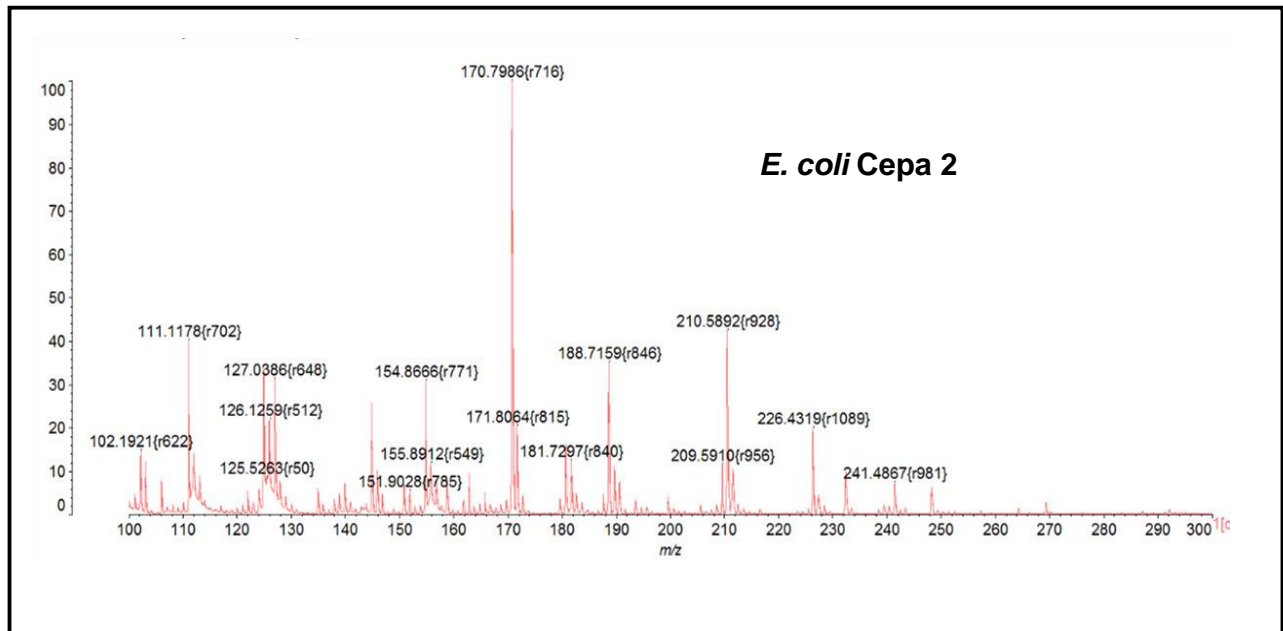


FIGURA 20. Espectros de la ceftriaxona incubada con *Escherichia coli* (cepa clínica 2 BLEE+).

Al analizar los espectros correspondientes a la ceftriaxona incubada con la cepa 2 de *Escherichia coli* (BLEE +) se observa una disminución de la intensidad porcentual de un 40% del pico a los 111 Da (figura 20).

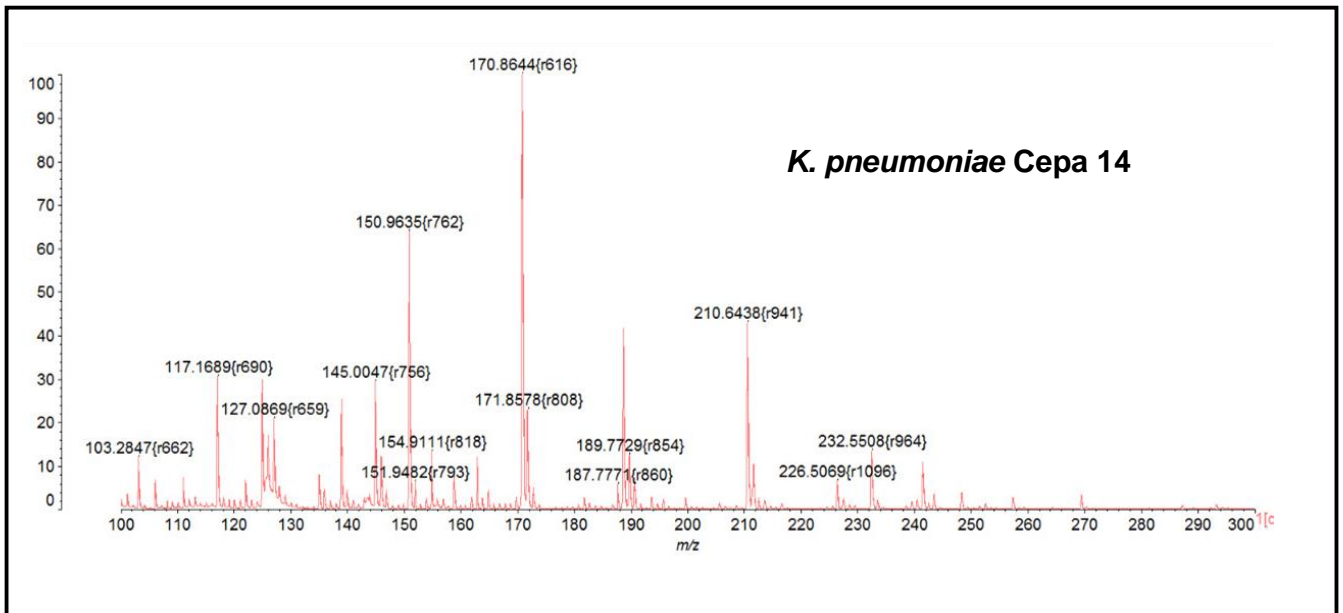


FIGURA 21. Espectros de la ceftriaxona incubada con *Klebsiella pneumoniae* (cepa clínica 14 BLEE+).

Al analizar los espectros correspondientes a la ceftriaxona incubada con la cepa 14 de *Klebsiella pneumoniae* (BLEE +) se observa una desaparición del pico a los 111 Da (figura 21).

Al analizar los resultados para la detección de BLEE por MALDITOF MS (tabla 17), se logró determinar que la sensibilidad fue de un 100 % y especificidad de un 86%, determinando que el valor predictivo positivo fue de 97.0 % y el negativo de un 100% (figura 22)

TABLA 17. Resultados de la acción de las cepas BLEE por VITEK[®] MS.

	Productoras BLEE	No Productoras BLEE	Total
Positivo	38	1	39
Negativo	0	6	6
Total	38	7	45

Tabla 17: Representación de los resultados obtenidos de las 45 cepas medidas por metodología VITEK[®] MS.

Cálculo Sensibilidad: $(38/38) \times 100 = 100 \%$
Cálculo Especificidad: $(6/7) \times 100 = 86 \%$
Cálculo VPP: $(38/39) \times 100 = 97.0 \%$ Cálculo
VPN: $(7/7) \times 100 = 100 \%$

FIGURA 22. Cálculo sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

4.-Biotipificación Proteomica de Bacilos Gram negativos multirresistentes utilizando el programa RUO-SARAMIS en MALDI-TOF.

4-1 Biotipificación de *Klebsiella pneumoniae*

Para realizar el análisis de biotificación proteomica se escogió un grupo de 38 cepas de forma aleatoria de *Klebsiella pneumoniae* que el 100% eran BLEE Positivo y resistentes a cefazolina y cefotaxima. (Tabla 18) que se aislaron mayoritariamente de muestra de orinas y de servicios críticos como la UCI e intermedio (tabla 19 y 20)

Tabla 18.- Porcentajes resistencia a los antibióticos de *Klebsiella pneumoniae* BLEE +

Antibiótico	% Muestras Resistentes
Cefazolina	100
Cefotaxima	100
Ertapenem	57,9
Imipenem	5,2
Meropenem	31,5
Ciprofloxacino	97,3

Tabla 19: Tipo de muestras

TIPO DE MUESTRA	N°
Urocultivo	20
Hemocultivo	7
Líquido Peritoneal	4
AET	3
Secreción Herida	2
Tejido de Biopsia	1
Necrosis Pancreática	1
TOTAL	38

Tabla 20: Total de muestras por procedencia

PROCEDENCIA	N°
UCI	12
Intermedio Médico	5
Medicina Interna	5
Cirugía	4
Intermedio Quirúrgico	2
Gastroenterología	2
Geriatría	1
Medicina	1
UHO	1
Hematología	1
Medicina Física	1
Coronaria	1
Urología	1
Nefrología	1
Total	38

Las 38 cepas de *Klebsiella pneumoniae* que se testearon su relación clonal proteómica a través de MALDITOF MS se agruparon en 3 grupos, el primer grupo fueron todas las cepas, el segundo grupo en base al servicio de UCI que fue donde el mayor número de pacientes hospitalizados concentro con un 31.6% (12 pacientes) y el tercer grupo fue en las muestras de orinas que fue donde más se aislaron. Al analizar los dendrogramas destacan la presencia de dos muestras correspondientes a UCI (27-11-2018 y 17-11-2018) que lograron obtener un porcentaje de similitud cercano a 90% lo que indicaría algún tipo de transmisión de la cepa de un paciente a otro teniendo en cuenta que son de la misma procedencia, perfil de resistencia idénticos y dentro de semanas epidemiológicas cercanas. (figuras 23, 24 y 25)

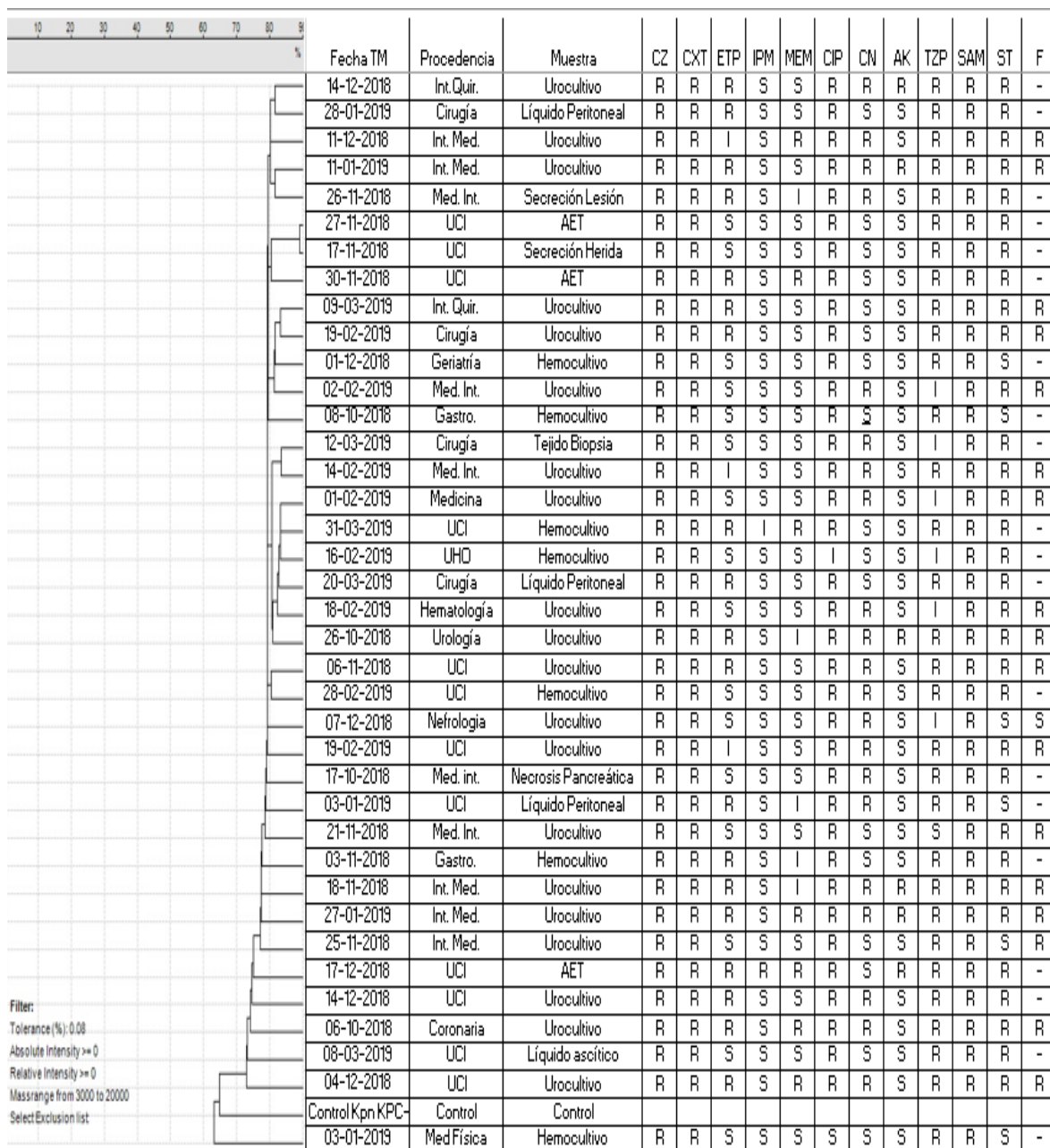


Figura 23: Dendrograma total de cepas de *Klebsiella pneumoniae* (n=38) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad

Int. Quir: Intermedio quirúrgico, Int Med: Intermedio Médico, Med. Int: Medicina interna, UCI: Unidad de cuidados intensivos, Gastro: Gastroenterología, UHO: Unidad Hemato oncología, Med. Física: Medicina Física y Rehabilitación. AET: Aspirado endotraqueal.

CZ: Cefazolina, CXT: Cefotaxima, ETP: Ertapenem, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CIP: Ciprofloxacino, CN: Gentamicina, AK: Amikacina TZP: Piperacilina tazobactam, SAM: Ampicilina-Sulbactam, ST: Sulfametoxazol/Trimetoprim FOS: Fosfomicina, F: Nitrofurantoina.



Figura 24: Dendrograma con procedencias pertenecientes a la Unidad de Paciente Crítico

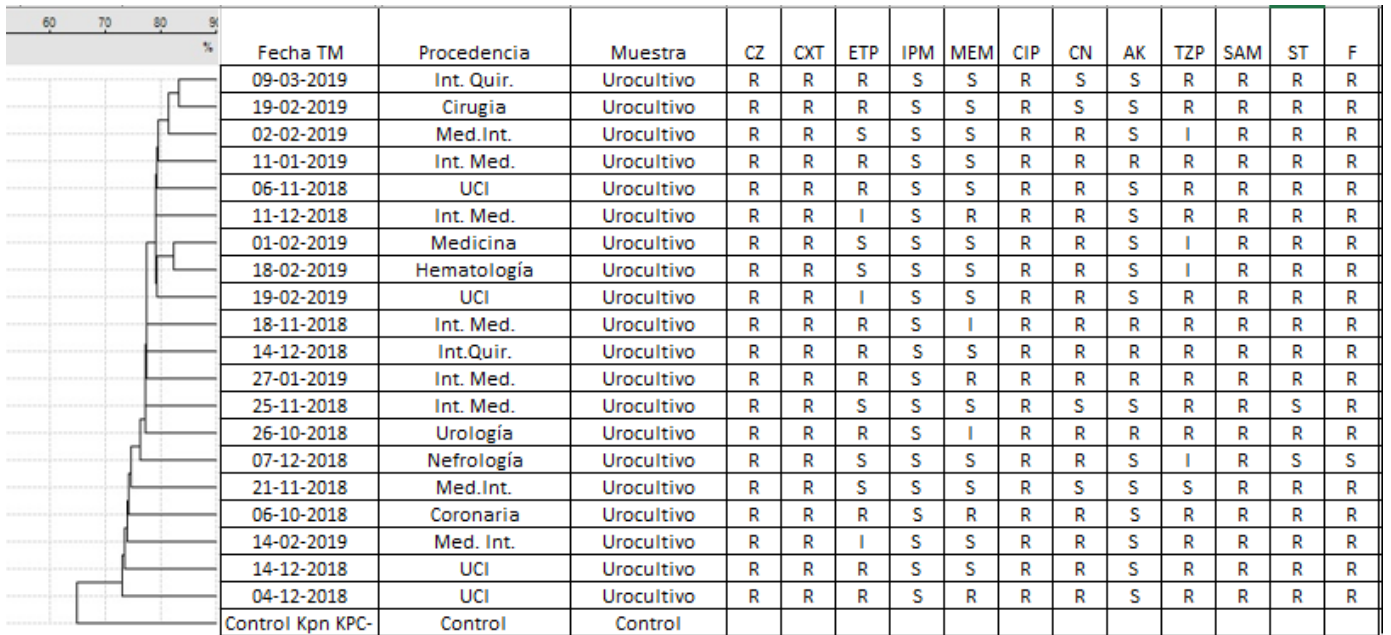


Figura 25: Dendrograma utilizando las muestras de urocultivo

4-2 Biotipificación de *Escherichia coli*

Para realizar el análisis de biotificación proteomica se escogió de forma aleatoria un grupo de 44 cepas de *Escherichia coli* que el 98 % eran BLEE Positivo y resistentes a cefazolina y cefotaxima. (Tabla 21) que se aislaron mayoritariamente de muestra de orinas y hemocultivos provenientes de servicios críticos como la UCI e intermedio (tabla 22 y 23)

Las 44 muestras de *Escherichia coli* incorporadas al estudio el 100% de las muestras escogidas eran resistentes a cefazolina y cefotaxima.

Tabla 21: Porcentajes de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos

Antibiótico	% Muestras Resistentes
Cefazolina	100
Cefotaxima	100
Ampicilina-sulbactam	70,45
Ciprofloxacino	65,9
Sulfametoxazol	61,36
Nitrofurantoina	6,81
Piperacilina-Tazobactam	6,81
Gentamicina	40,9
Ertapenem	2,27
Imipenem	2,27
Meropenem	2,27
Amikacina	2,27
Fosfomicina	0

Tabla 22: Cantidad porcentual de cepas de *Escherichia coli* por procedencia del hospital

PROCEDENCIA	Cantidad %
Unidad de Cuidados intensivo	22,72
Intermedio Médico	13,63
Medicina Interna	9,09
Cirugía	13,63
Intermedio Quirúrgico	6,81
Gastroenterología	4,54
Geriatría	6,81
Medicina	6,81
Nefrología	6,81
Hematología	2,27
Neurocirugía	2,27
Unidad coronaria	2,27
Medicina	6,81

Tabla 23: Cantidad de cepas de *Escherichia coli* por tipo de muestra

TIPO DE MUESTRA	N°
Urocultivo	20
Hemocultivo	11
Líquido Peritoneal	4
AET	4
Colección abdominal	1
Tejido de Biopsia	1
Punta de catéter (Maki)	1
Secreción traqueotomía	1
Bilis	1
TOTAL	44

Las 44 cepas de *Escherichia coli* que se testearon su relación clonal proteómica a través de MALDI-TOF MS se agruparon en 4 grupos, el primer grupo fueron todas las cepas, el segundo y tercer grupo en base a los servicios clínicos de donde fueron aisladas mayoritariamente (UCI e Intermedio) y el cuarto y el tercer grupo fue en

las muestras de orinas que fue donde más se aislaron. Al analizar los dendrogramas, se evidenció que tanto en el servicio de UCI como en Intermedio Médico contienen solo un grupo de aislados que presentan una similitud proteómica entre un 50 a 60%. Sin embargo, al analizar el dendrograma global de todas las cepas de *Escherichia coli* se evidenciaron tres grupos de aislados que presentaban una similitud proteómica entre un 60% a 70%.

Se realizó un cuarto dendrograma solo con aislados clínicos de muestras de urocultivo, debido a que corresponde al tipo de muestra más común. No obstante, los resultados del dendrograma arrojaron solo tres grupos de aislados con una similitud proteómica entre 60 a 70%.

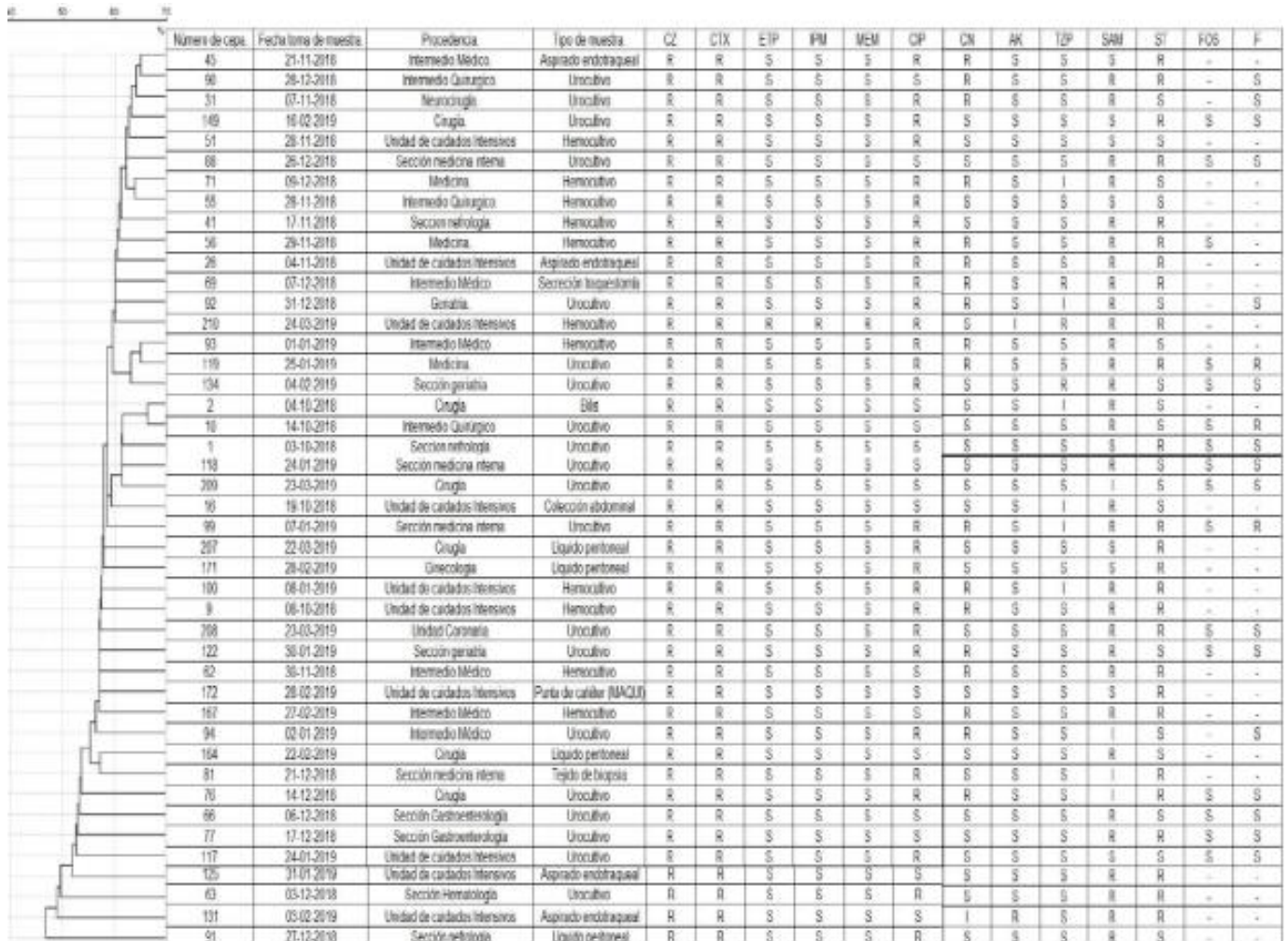


Figura 26: Dendrograma del total de cepas de *Escherichia coli* (n=44) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad

CZ: Cefazolina, CTX: Cefotaxima, ETP: Ertapenem, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CIP: Ciprofloxacino, CN: Gentamicina, AK: Amikacina, TZP: Piperacilina tazobactam, SAM: Ampicilina-Sulbactam, ST: Sulfametoxazol/Trimetoprim, FOS: Fosfomicina, F: Nitrofurantoina.



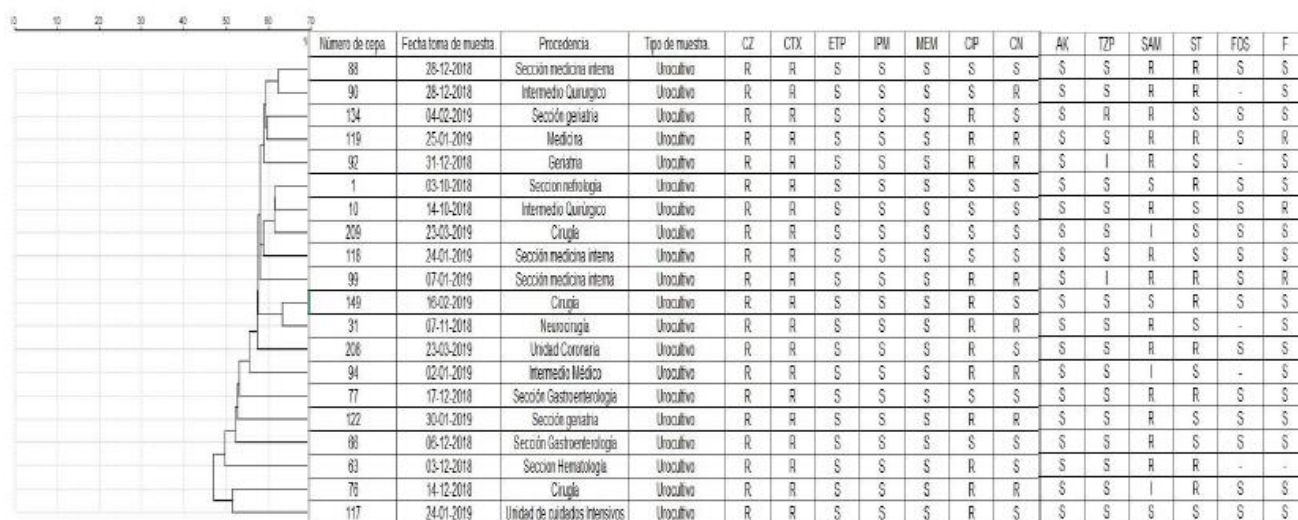
Figura 27: Dendrograma de cepas de *Escherichia coli* con procedencias del servicio de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

CZ: Cefazolina, CTX: Cefotaxima, ETP: Ertapenem, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CIP: Ciprofloxacino, CN: Gentamicina, AK: Amikacina, TZP: Piperacilina tazobactam, SAM: Ampicilina-Sulbactam, ST: Sulfametoxazol/Trimetoprim, FOS: Fosfomicina, F: Nitrofurantoina.



Figura 28: Dendrograma de cepas de *Escherichia coli* con procedencias del servicio de Intermedio médico.

CZ: Cefazolina, CTX: Cefotaxima, ETP: Ertapenem, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CIP: Ciprofloxacino, CN: Gentamicina, AK: Amikacina, TZP: Piperacilina tazobactam, SAM: Ampicilina-Sulbactam, ST: Sulfametoxazol/Trimetoprim FOS: Fosfomicina, F: Nitrofurantoina



Filter: Tolerance (%): 0.08, Absolute Intensity >=0, Relative Intensity >=0, Massrange from 3000 to 20000, Select Exclusion list.

Figura 29: Dendrograma de cepas de *Escherichia coli* aisladas de Urocultivo

CZ: Cefazolina, CTX: Cefotaxima, ETP: Ertapenem, IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, CIP: Ciprofloxacino, CN: Gentamicina, AK: Amikacina, TZP: Piperacilina tazobactam, SAM: Ampicilina-Sulbactam, ST: Sulfametoxazol/Trimetoprim FOS: Fosfomicina, F: Nitrofurantoina

4-3 Biotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Para realizar el análisis de biotipificación proteómica se escogió en forma aleatoria un grupo de 26 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes donde se observa que el 100% de las cepas estudiadas son Resistentes a Imipenem; el 73,1% Resistente a Meropenem; 57,7% Resistente a Cefazidima; 53,8% Resistente a

Piperacilina/Tazobactam; 42,3% Resistente a Cefepime y Aztreonam; 38,5% Resistente a Gentamicina y Ciprofloxacino; 26,9% Resistente a Amikacina y 3,8% Resistente a Colistin (tabla 24) que se aislaron mayoritariamente de muestra de aspirado endotraqueal y de servicios críticos como la UCI e intermedio (tabla 25 y 26) y de las cuales 10 eran productoras de carbapenemasas, 8 de tipo VIM y 2 de tipo KPC (figura 30)

Tabla N° 24: Porcentajes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos

Antibiótico	% de Resistencia
Gentamicina	38,5
Amikacina	26,9
Ciprofloxacino	38,5
Imipenem	100
Ceftazidima	57,7
Cefepime	42,3
Meropenem	73,1
Piperacilina/Tazobactam	53,8
Colistin	3,8
Aztreonam	42,3

Tabla N° 25: Cantidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por tipo de muestra

Tipo de Muestra	N°
Sec. Nasotraqueal	1
LBA	1
Colección	1
Punta catéter (Maki)	1
Sec. Traqueostomía	1
Bilis	1
Biopsia	2
Hemocultivo	3
Expectoración	4
Urocultivo	4
AET	7
TOTAL	26

Tabla N° 26: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por procedencia del hospital

PROCEDENCIA	N°
Intermedio Neuroquirúrgico	1
Hematología	1
Cirugía	1
Medicina interna	1
Traumatología	1
Intermedio quirúrgico	2
Intermedio médico	3
Unidad coronaria	3
UCI	13
TOTAL	26

Las 26 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se testaron su relación clonal proteómica a través de MALDI-TOF MS se agruparon en 3 grupos, el primer grupo fueron todas las cepas, el segundo grupo en base al servicio de UCI que fue donde se aislaron en 13 pacientes hospitalizados que representa un 50% (tabla 26) y el tercer grupo fue en las muestras de aspirado endotraqueal que fue donde más se aislaron

(tabla 25). Al analizar los dendrogramas se evidenció que las cepas PSAEJ 1-44 y PSAEJ 1-28 (cepas 203 y 147 respectivamente) tienen más de 90 masas idénticas y son las que tienen un mayor porcentaje de similitud y se encuentran en la UCI en comparación con el resto de las cepas. Las cepas PSAEJ 1-39 y PSAEJ 1-34 (cepas 200 y 193 respectivamente) presentan más de 80 masas en común y se encuentran en 2 servicios distintos, UCI e Intermedio quirúrgico respectivamente. Estas 4 cepas formarían un clúster que se evidencia el dendrograma (figura 30) El resto de las cepas analizadas en el estudio, no presentan similitud clonal significativa (figuras 30, 31 y 32).

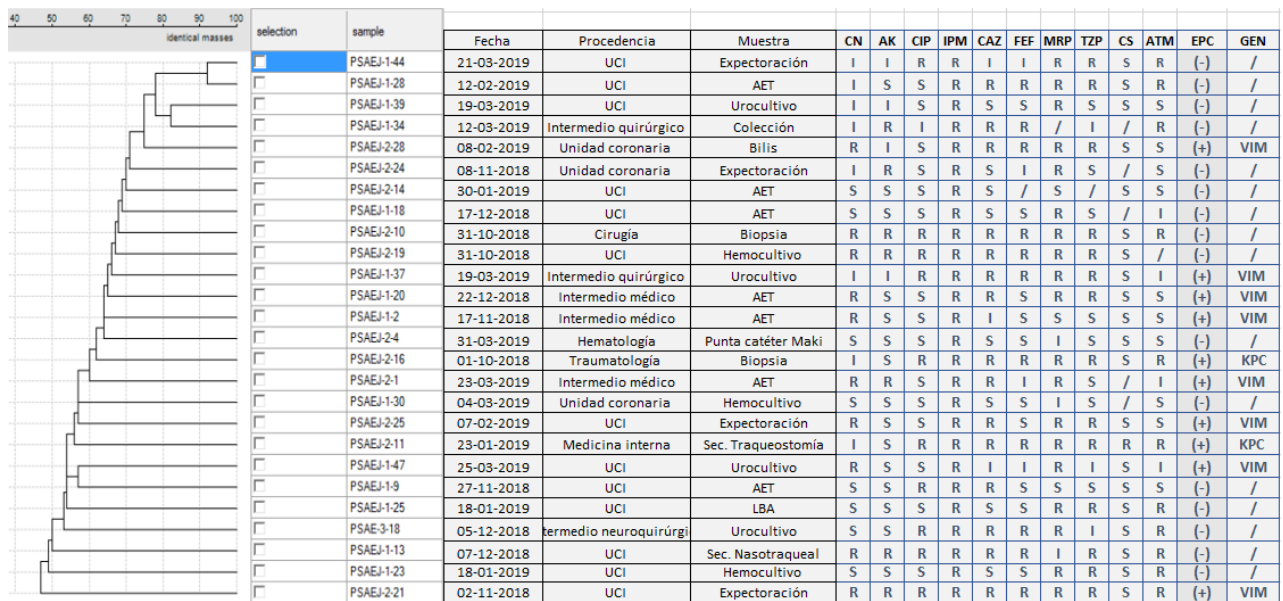


Figura 30: Dendrograma del total de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=26) en base a su procedencia, tipo de muestra y su susceptibilidad.

CN: Gentamicina, AK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacino, IPM: Imipenem CAZ: Ceftazidima, FEF: Cefepime, MRP: Meropenem, TZP: Piperacilina tazobactam, CS: Colistin, ATM: Aztreonam, EPC: Cepa productora de carbapenemasas



Figura 31: Dendrograma de total de cepas pertenecientes a la UCI.

CN: Gentamicina, AK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacino, IPM: Imipenem CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime , MRP: Meropenem, TZP: Piperacilina tazobactam, CS: Colistin, ATM: Aztreonam, EPC: Cepa productora de carbapenemasas



Figura 32: Dendrograma del total de cepas aisladas de AET

CN: Gentamicina, AK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacino, IPM: Imipenem CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime , MRP: Meropenem, TZP: Piperacilina tazobactam, CS: Colistin, ATM: Aztreonam, EPC: Cepa productora de carbapenemasas

5.- Estudio comparativo de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* usando Biotipificación proteómica y electroforesis de Campo pulsado.

Al analizar el dendrograma proteómico destacan la presencia de 2 dos cepas correspondientes a la K8 y K74 de dos servicios diferentes con un porcentaje de similitud cercano al 94% y además las cepas K47 y K74 con una similitud del 90%. Estas 4 cepas formarían probablemente un clúster que se evidencia en el dendrograma. El resto de las cepas analizadas en el estudio, no presentan similitud clonal significativa (figura 33).

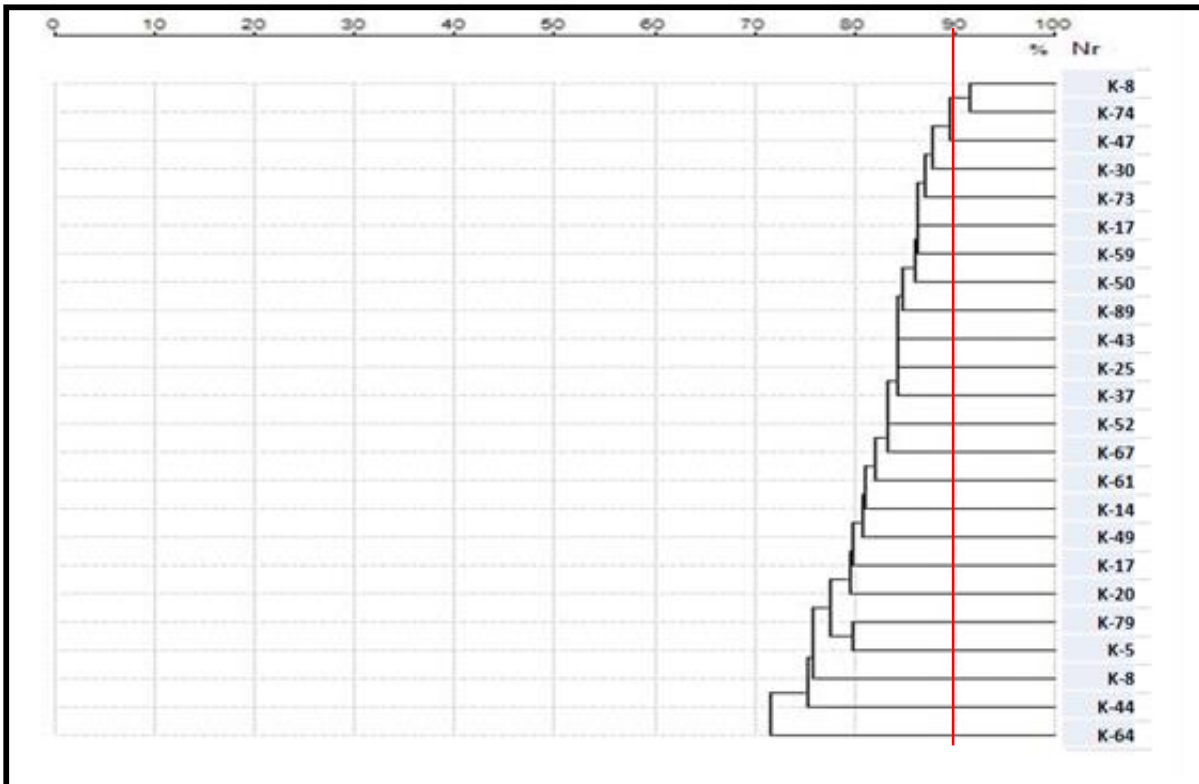


Figura 33: Dendrograma proteómico de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Al analizar la electroforesis de campo pulsado se pueden observar los patrones de bandas obtenidos por restricción del ADN genómico con XbaI y posterior electroforesis de campo pulsado, permitió obtener 7 pulsotipos. El primer pulsotipo está conformado por dos cepas aisladas K37 y K61 de UCI 100% de similitud. En el segundo pulsotipo las cepas K61 y K52 mostraron cerca de un 98% de similitud entre ellas siendo de la UCI además se relacionan con la cepa. Por otra parte, las parejas de cepas K74 y K89 (de servicios distintos) y las cepas K28 y K30 (ambas de la UCI) y tienen cerca de un 96% de similitud entre ellas. Las cepas K74 y K75 aisladas de intermedio quirúrgico y UCI respectivamente tienen un 94% de similitud. Las cepas K47 y K50 de UCI con 92% de similitud aislada de medicina. (figura 34).

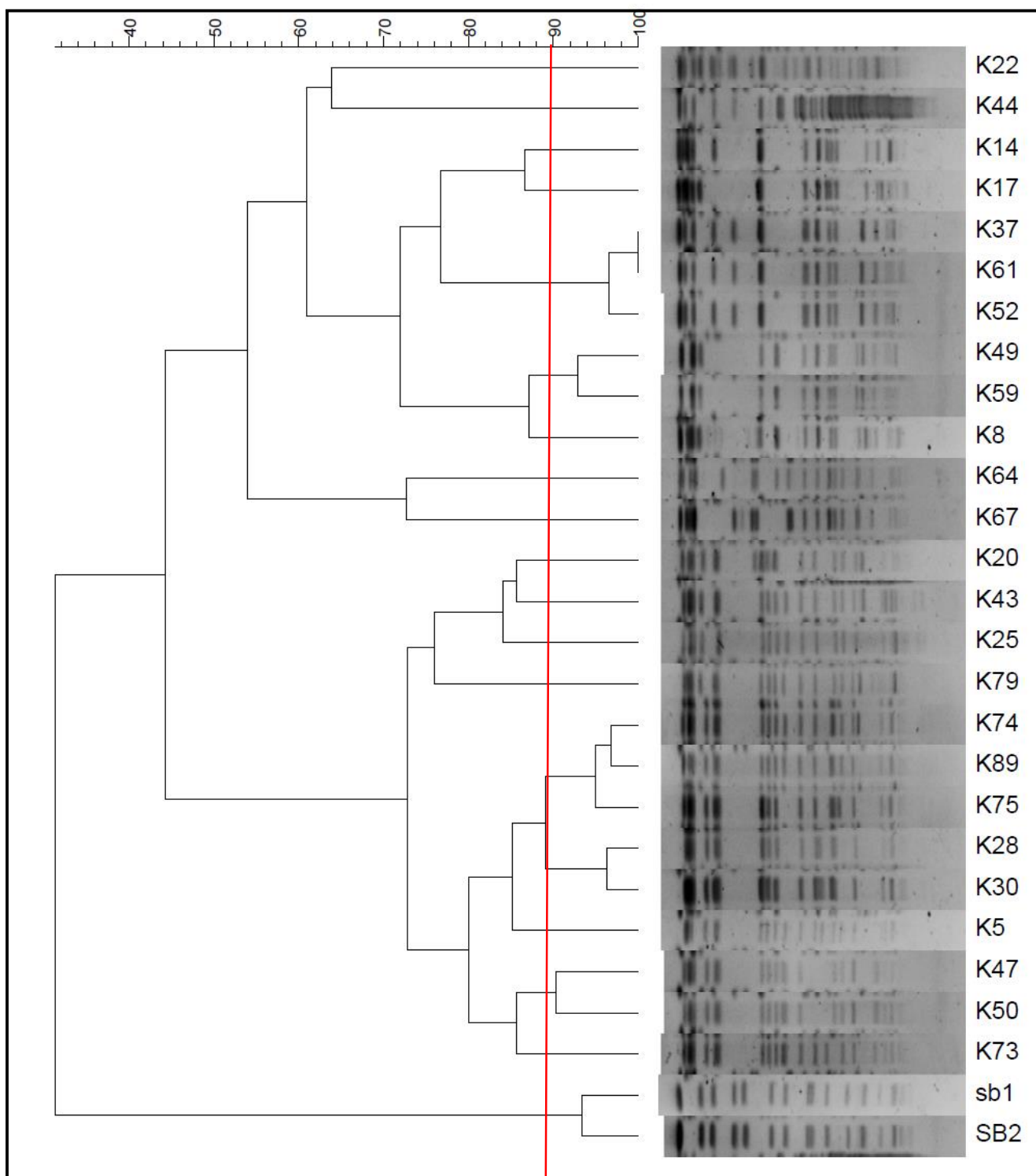


Figura 34: Electroforesis de campo pulsado de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Al comparar el dendrograma proteómico y el campo pulsado que se realizaron con el mismo grupo de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, no se logra observar una similitud entre los 7 pulsotipos y los 2 clones proteómicos (figura 35).

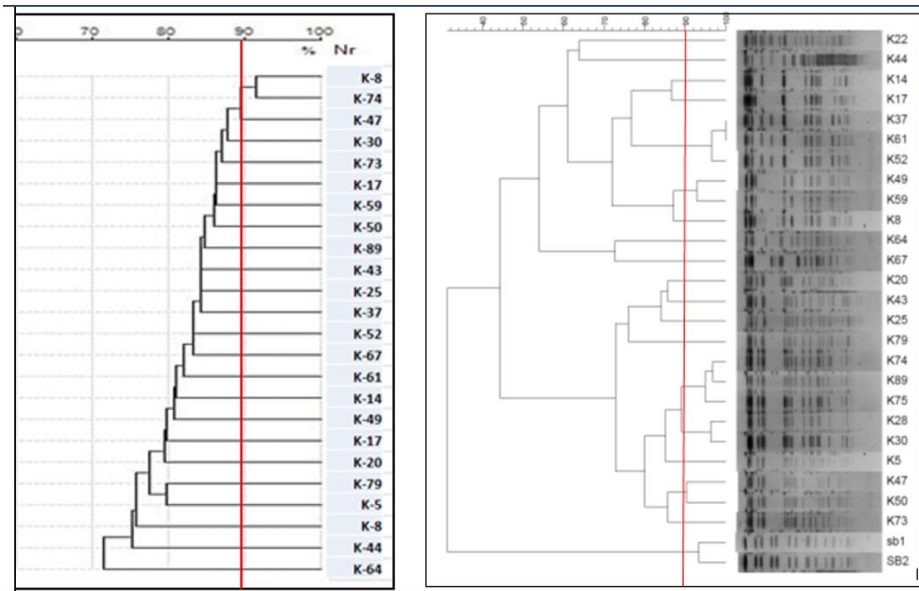


Figura 35: Dendrograma proteómico y electroforesis de campo pulsado de cepas de *Klebsiella pneumoniae*

VI – DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores: gobierno y la sociedad civil. Esta se extiende y aparecen nuevos mecanismos de resistencia lo que reduce las posibilidades de tratamiento y genera enfermedades infecciosas más prolongadas y un aumento de la morbilidad y mortalidad de los pacientes ingresados a los hospitales y clínicas, lo que ocasiona un gran aumento en los costos de salud por la prescripción de antibióticos más caros y un mayor tiempo de hospitalización. Estas infecciones afectan a los pacientes con mayores complicaciones clínicas que se encuentran principalmente en las unidades de cuidados intensivos, unidades de hemato-oncología, neonatología, donde suelen producir una alta mortalidad. Todo esto necesita respuestas clínicas y diagnósticas más rápidas y eficientes para reducir la mortalidad de estos pacientes

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS es una herramienta que ha revolucionado la microbiología diagnóstica en la última década. Esto principalmente por su rapidez, eficiencia y sensibilidad en comparación con la microbiología clásica, cuando se trata de los tiempos de respuesta en diagnóstico clínico (111, 112).

Esta tecnología permite la identificación de colonias bacterianas mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la generación de un espectro

de masas que es específico para cada especie. Permite resultados exactos de género y principalmente de especie, además que resultan ser muy similares a los que se pueden obtener con metodologías genéticas como la secuenciación de ARNr 16S, (113). La microbiología clásica no siempre permite llegar a establecer este nivel de especificidad.

La tecnología MALDI-TOF MS no solo permite identificar bacterias de forma muy precisa, sino que también es capaz de identificar mecanismos de resistencias. Uno de los mecanismos de resistencia más importantes son las betalactamasas y principalmente las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas. Es aquí en donde se puede detectar la actividad enzimática, que se realiza en forma muy simple poniendo en contacto la bacteria (una colonia) con el antibiótico a estudiar (100 a 200 ul) incubándolo un tiempo adecuado según protocolo a utilizar. Lo que se observa es un espectro del antibiótico intacto (bacteria sensible) y un espectro hidrolizado (bacteria resistente) por efecto enzimático de la betalactamasa (114, 115). Sin embargo, las limitaciones que tiene la medición de los mecanismos de resistencia en MALDI-TOF MS es que principalmente está orientado a la resistencia mediada por sistemas enzimáticos, como por ejemplo las betalactamasas. Por otra parte, para medir diferentes mecanismos enzimáticos se debe realizar antibiótico por antibiótico lo que complejiza el trabajo y adicionalmente se debe calibrar para cada antibiótico con una sustancia distinta que

se relaciona con el peso molecular del mismo. Sumado a lo anterior, en el caso del equipo Vitek MS® se debe cambiar de plataforma informática que para la rutina diagnóstica es IVD y para medición de resistencia y clonalidad es la plataforma RUO, esto altera la rutina diagnóstica de un laboratorio de microbiología clínica. En el futuro esto debería tender a una mayor automatización, calibración automática y lectura integrada del espectro de resistencia.

Otra herramienta que avanza en la tecnología MALDI-TOF MS es la tipificación proteómica, que reúne las bacterias usando un algoritmo que permite relacionar entre las distintas bacterias detectadas (mismo género y especie) de cada cultivo aislado, usando los espectros obtenidos, agrupándolos en forma de dendrograma donde la distancia entre las distintas ramas está directamente relacionada con la similitud entre los espectros y, por consiguiente, a la similitud entre los aislamientos (116).

Aquí se plantea estandarizar e implementar estas tecnologías en un Hospital Universitario Chileno que permita aportar al control de las IAAS y dar respuestas en el más corto tiempo de los diferentes mecanismos de resistencia y de los probables clones bacterianos que se encuentran en los diferentes servicios y que ayude a mejorar tanto las decisiones clínicas como administrativas.

1.- Detección de Enterobacteriales y Bacilos Gram negativos no fermentadores productoras de β -lactamasas de tipo carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS.

Los resultados obtenidos que se encuentran especificados en la tabla 14 y que comprueba que el protocolo desarrollado para la detección de la actividad hidrolítica de las carbapenemasas producidas por los enterobacteriales y *Pseudomonas aeruginosas* testeadas en el equipo de VITEK® MS de BIOMÉRIEUX es eficiente en la realización de estas determinaciones, ya que los resultados del MALDI-TOF MS de las 15 cepas que tienen el mecanismo de resistencia en 14 de ellas confirma la presencia de la carbapenemasas obteniendo solo un falso negativo, esto podría atribuirse a una baja capacidad hidrolítica de la carbapenemasas en cuestión. Estas 15 cepas fueron positivas para el test fenotípico Carba NP directo y fueron identificadas las enzimas involucradas por inmunocromatografía de flujo lateral, que posteriormente fueron confirmadas en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos resultados negativos o positivos para la detección de carbapenemasas se evidencian por la obtención, desaparición o disminución de un pico de 491 Da (Figura 1) el cual se ha descrito previamente en otros estudios realizados con MALDI-TOF MS (117, 118, 119, 120) y corresponde al ertapenem (0,25 mg/mL), ya que se observan picos dentro del espectro ubicados en un rango entre los 450 Da y 500 Da, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio. El pico obtenido fue único y propio del

ertapenem no hidrolizado, no encontrándose ningún otro pico asociable al Ertapenem intacto o un pico atribuible a sus productos de hidrólisis, los que también han sido descritos en otros estudios realizados al respecto (117, 118, 119, 121, 122).

A su vez se compararon cepas BLEE positivas que hidrolizan antibióticos betalactámicos, pero no carbapenémicos y cepas no productoras de carbapenemasas, con la finalidad de demostrar que el pico obtenido en 491 Da corresponde al antibiótico ertapenem intacto (sin hidrolizar), demostrando entonces que la desaparición de este pico se debe exclusivamente a la actividad hidrolítica de las carbapenemasas y no a otro mecanismo de resistencia presente en la bacteria (Figura 14y 15).

En resumen, la ausencia o disminución del pico a los 491 Da se encontró en casi la totalidad de las cepas productoras de carbapenemasas y fue detectada tras la incubación de 4 horas (Tabla 13, Figura 5). Es así que de las 15 cepas confirmadas como productoras de carbapenemasas mediante el Carba NP Directo e inmunocromatografía de flujo lateral, y sometidas a espectrometría de masas (VITEK® MS), 12 de éstas presentaron completa desaparición del pico del Ertapenem (491 Da), mientras que, en otras 2 cepas, si bien éste no desapareció por completo, se observó una disminución de la intensidad del pico. En la cepa que dio el falso negativo, a pesar de haber una disminución en la intensidad del pico, esta disminución no fue significativa.

En consideración a lo recién descrito y lo expuesto en la Tabla 16, fue posible definir la especificidad y sensibilidad de VITEK® MS en la detección de carbapenemasas en un 100% y 93,3% respectivamente. Además, se obtuvo un valor predictivo positivo (VPP) de 100% y un valor Predictivo negativo (VPN) de 96,7% (Figura 16). Esto plantea a VITEK® MS como un método válido, rápido y eficiente en la confirmación de la presencia de carbapenemasas producidas por Bacilos Gram Negativos. Sin embargo, no es un buen método de tamizaje de esta hidrólisis, ya que la sensibilidad es menor al 95%, porcentaje que representa a la media en una distribución normal más/menos una desviación estándar, y que se espera en una prueba diagnóstica sea capaz de censar al menos al 95 % de las muestras verdaderas positivas, aceptando solo un 5% de error (123).

Otro punto importante que permite establecer este estudio, es que las cepas productoras de carbapenemasas se encuentran principalmente en los servicios críticos como la UCI e intermedios (tabla 11) y donde más se aíslan son en los pacientes que están conectados a ventilación mecánica a través de las muestras de aspirados endotraqueales, dando cuenta de lo relevante que es tener un diagnóstico certero y rápido debido a la condición crítica que se encuentran los pacientes.

En última instancia, la implementación de esta tecnología para identificar mecanismos de resistencia de manera ágil y precisa promete desempeñar un papel en la transformación de los protocolos de tratamiento. Esto no solo beneficiará la

recuperación de los pacientes, sino que también respaldará la promoción de programas de uso racional de antibióticos en nuestro hospital, la prevención de la proliferación de cepas multirresistentes y el fortalecimiento del equipo de Control de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS).

2.- Detección Enterobacteriales productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante MALDI-TOF MS.

Los resultados obtenidos se encuentran especificados en la tabla 17 que comprueba que el protocolo desarrollado para la detección de la actividad hidrolítica de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) producidas por las cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* testeadas en el equipo de VITEK® MS de BIOMÉRIEUX, es eficiente en la realización de estas determinaciones, ya que los resultados del MALDI-TOF MS de las 38 cepas que tienen el mecanismo de resistencia se confirma la presencia de la BLEE en todas las cepas, obteniendo un 100% de sensibilidad. Sin embargo, de las 7 cepas negativas para BLEE se encontró un falso positivo. Estas 38 cepas fueron diagnosticadas positivas por la técnica de referencia fenotípica realizada en el equipo Vitek 2 compact®, he informada en los resultados clínicos emitidos por el laboratorio de microbiología del hospital. Estos resultados negativos o positivos para la detección de BLEE se evidencian por la obtención, desaparición o disminución de un pico de 111 Da (Figura 17) el cual no se ha descrito anteriormente, por lo que constituye un hallazgo en la investigación y que debe seguir evaluándose como un nuevo marcador en la hidrólisis de la ceftriaxona.

En consideración a lo recién descrito y lo expuesto en la Tabla 17, fue posible definir la especificidad y sensibilidad de VITEK® MS en la detección de BLEE en un 86% y 100% respectivamente. Además, se obtuvo un valor predictivo positivo (VPP) de 97% y un valor predictivo negativo (VPN) de 100% (Figura 22). Esto permite establecer a VITEK® MS como un método válido, rápido y eficiente en la confirmación de la presencia de BLEE producidas por los enterobacteriales *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, por lo cual esta metodología es un buen método de tamizaje de la hidrólisis, ya que su sensibilidad es de un 100% (123).

Finalmente, esta metodología diagnóstica complementaria, es una importante herramienta que puede ser integrada a la rutina diagnóstica de cualquier laboratorio clínico de microbiología, dependiendo de la complejidad y la experiencia del personal que tenga la unidad diagnóstica, como una prueba estándar de detección rápida de mecanismo de resistencia de BLEE, o como confirmación sabiendo el resultado de la sensibilidad de las cefalosporinas de 3° generación. Esta metodología representa una alternativa importante a los métodos fenotípicos que existen en la rutina de detección de BLEE actualmente disponibles. Entrega resultados confiables en poco tiempo, que puede impactar positivamente en la decisión clínica que puede tomar el médico en relación a los pacientes. Esto tendría varias consecuencias positivas, como una mejora directa en la antibioticoterapia, ayudar al uso más

racional de los antibióticos y mejorar los tiempos de respuestas en el contexto del control IAAS.

3.- Estandarizar la tecnología MALDI-TOF MS en estudios epidemiológicos de las cepas basado en la hetero / homogeneidad de los espectros obtenidos, utilizando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado como patrón de comparación y detección de la distribución, frecuencia y clonalidad proteómica de las cepas en estudio (6 meses de recolección de cepas) en las diferentes unidades y servicios del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

La biotipificación proteómica mediante la espectrometría de masas, es una gran herramienta en la identificación de microorganismos mediante el estudio de los proteomas, es decir, el conjunto de todas las proteínas que contiene una célula o microorganismo que mediante la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (95). Este método, generalmente produce información de secuencia de péptidos parcial, no completa, de masa de péptidos. Con el crecimiento de las bases de datos como la etiqueta de secuencia expresada (EST en inglés) y las bases de datos genómicas, resulta más simple identificar proteínas utilizando dicha información de secuencia parcial. Esto ha permitido que sea más fácil purificar e identificar proteínas a partir de cantidades mucho más pequeñas de muestra de lo que era posible (120).

Para el análisis y comparación de los resultados entregados por MALDI-TOF MS se utiliza un método de organización por grupos, el cual consiste en la agrupación de datos según la similitud o asociación que estos presentan.

Un dendrograma es una representación gráfica en forma de árbol, del proceso de agrupación en un análisis de grupos o clusters. Los espectros similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud (125).

El aumento de la resistencia y la aparición de cepas bacterianas multirresistentes a nivel mundial, requieren de la implementación de vigilancia epidemiológica. Así, las infecciones asociadas a la atención de salud adquirieron a través del tiempo, especial relevancia en el campo de las enfermedades infecciosas por la elevada morbilidad y mortalidad, por el elevado gasto económico que implican, además del impacto social que originan (93). En hospitales y centros de salud de diferentes partes del mundo se han descrito brotes, debidos a la diseminación de cepas bacterianas productoras de BLEE y carbapenemasas a través de transferencia de plásmidos que portan los genes de resistencia entre diferentes especies de enterobacteriales y Bacilos Gram negativos no fermentadores siendo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* los patógenos de mayor importancia, relacionados frecuentemente con IAAS, sobre todo en la unidades de cuidado intensivo, donde se observan la mayor cantidad de casos (116, 128).

Comprender la distribución de patógenos y su relación, es esencial para determinar la epidemiología de las IAAS y de esa forma colaborar en el diseño de métodos racionales de control de patógenos. El papel de la tipificación de patógenos es

determinar si los aislamientos relacionados epidemiológicamente también están relacionados genéticamente (129).

Este estudio se basó principalmente en la caracterización proteómica mediante MALDI-TOF MS de una serie de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* que presentaban mecanismo de resistencia de BLEE, carbapenemasas o que al menos en el caso de los enterobacteriales, eran resistente a cefotaxima y a carbapenémicos en el caso de las *Pseudomonas aeruginosa*. Luego de la caracterización proteómica, se realizó un estudio comparativo entre la biotipificación proteómica y la metodología de electroforesis de campo pulsado que se considera el estándar de oro para la búsqueda de clones bacterianos relacionados, para esto se tomaron en forma aleatoria 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y se realizó un estudio en paralelo comparativo.

Basándonos en los parámetros realizado por otro estudio similar (101) para los agentes patógenos que se investigaron, se estableció en MALDI-TOF MS un corte de similitud de un 90% para dar una indicación de un grupo clonal, mientras que la ramificación de los aislados bajo el 90%, excluyó una relación cercana.

Biotipificación proteómica de cepas de *Klebsiella pneumoniae*

En el análisis realizado por MALDI-TOF MS de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* se logró a establecer que no hay una similitud clonal entre las cepas, lo que se atribuyó a que durante el tiempo que se realizó este estudio no se reportaron brotes asociados

a *Klebsiella pneumoniae* por el comité IAAS del Hospital. Esto se evidenció en los dendrogramas obtenidos donde se ve una distribución entre el 70 % y 85% de similitud de todas las cepas (figura 24).

Se destaca la presencia de dos cepas correspondientes al servicio UCI (27-11-2018 y 17-11-2018) que lograron obtener un porcentaje de similitud cercano a 90% (figura 24), lo que indicaría algún tipo de transmisión de la cepa de un paciente a otro teniendo en cuenta que son de la misma procedencia, perfil de resistencia idénticos y dentro de semanas epidemiológicas cercanas, y por otra parte, una cepa proveniente del servicio de Medicina Física y Rehabilitación presentaba un porcentaje muy menor de similitud respecto a las demás, aproximadamente 65%, lo que se atribuye a que es posible que cepa sea de origen comunitario, debido a que en este servicio hay una gran rotación de pacientes que se hospitalizan por cortos periodos o son de hospitalización transitoria o ambulatoria. Esto nos indica que la tipificación proteómica y posterior dendrograma nos puede mostrar un porcentaje de similitud entre las cepas, el cual fue más alto entre las muestras que son de origen hospitalario, a diferencia de la de origen comunitario y del control de *Klebsiella pneumoniae* que presentan un menor porcentaje de similitud con respecto a todas las demás.

Se determinó en primera instancia que durante el periodo de estudio no existe una correlación clonal de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, a excepción de las 2 cepas de

la UCI. Sin embargo, estos resultados demuestran que MALDI-TOF MS es una herramienta de subtipo de primera línea que puede ser una alternativa para la detección de posibles eventos de transmisión clonal o para descartar dichos eventos aunque debe seguir estandarizándose para lograr una concordancia con la electroforesis de campo pulsado que sigue siendo el estándar de oro.

La tipificación bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* por MALDI-TOF MS en nuestro estudio demostró que a pesar de que el 100% de las cepas eran productoras de una BLEE no existía una relación clonal proteómica entre ellas, lo que permite al clínico sólo tomar medidas recomendadas de precauciones de contacto para cepas multirresistente y no las medidas que se relacionan con un brote, que pueden ser el cohorte en una unidad clínica de paciente crítico. Esto claramente significa una información vital para tomar las medidas clínicas-epidemiológicas necesarias y exactas según la información que nos entrega esta metodología.

Biotipificación proteómica de cepas de *Escherichia coli*

El análisis realizado por MALDI-TOF MS de las cepas de *Escherichia coli* logró establecer que tanto en el servicio de UCI como en Intermedio Médico contienen solo un grupo de aislados que presentan una similitud proteómica entre un 50% a 60%. Sin embargo, al analizar el dendrograma global de todas las cepas de *Escherichia coli*, se evidenciaron tres grupos de aislados que presentaban una similitud proteómica entre un 60% a 70%.

Se realizó un cuarto dendrograma solo con aislados clínicos de muestras de orina. Ésta corresponde al tipo de muestra más común y está fuertemente relacionada al uso de catéteres urinarios a permanencia, lo que está sujeto a complicaciones durante la instalación del dispositivo en los pacientes, sumado a la susceptibilidad de éstos. Lo anterior, genera condiciones favorables para la diseminación de las infecciones (39). No obstante, los resultados del dendrograma, arrojaron solo tres grupos de aislados con una similitud proteómica entre 60% a 70%.

En base a lo anterior y según los antecedentes entregados por los dendrogramas, indicarían que las cepas bacterianas no presentan semejanza clonal entre ellas, ya que en estudios similares se establece que el corte mínimo para asociar relaciones proteómicas entre grupos de cepas bacterianas es $\geq 90\%$, siendo excluidas las cepas que presentaban un porcentaje inferior a 80%, debido a que no presentan algún tipo de relación clonal cercana (101).

El análisis realizado por MALDI-TOF MS de todas las cepas que fueron seleccionadas para realizar este estudio, se estableció que no existe una similitud clonal proteómica entre estas cepas, lo que se atribuye a que durante el periodo de tiempo en que se realizó esta investigación (octubre de 2018 a marzo de 2019), no se reportaron brotes infecciosos asociados a *Escherichia coli* por el comité de IAAS del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, siendo este representado por los dendrogramas obtenidos, donde se puede ver que hay una similitud proteómica

entre el 60% a 70% de todas las cepas (Figura 16), lo que permite concluir que no estarían relacionadas entre ellas.

Biotipificación proteómica de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

En el análisis realizado por MALDI-TOF MS de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró similitud clonal entre 2 cepas, obteniendo más de 90 masas idénticas entre ellas; mientras que el resto de las cepas no muestran una relación proteómica significativa. (Figura 30)

En base a los resultados de tipificación proteómica a través de MALDI – TOF MS, se logra observar que las cepas PSAEJ 1-44 y PSAEJ 1-28 (cepas 203 y 147 respectivamente) presentan más de 90 masas idénticas según taxonomía relativa, lo que significa que son clones proteómicos. (Figura 31).

Las cepas PSAEJ 1-39 y PSAEJ 1-34 (cepas 200 y 193 respectivamente), pertenecientes a los servicios de UCI e Intermedio quirúrgico y aisladas a partir de muestras de orina y colección respectivamente, presentan más de 80 masas en común y a su vez, se relacionan con las 2 cepas mencionadas anteriormente, con menos de 80 masas. Sin embargo, basándonos en el punto de corte establecido, éstas no serían clones. Lo mismo sucede con el resto de las muestras, donde se observa que no poseen una relación proteómica cercana (101).

Al observar los datos asociados a las muestras PSAEJ 1-44 y PSAEJ 1-28 se percibe que ambas cepas pertenecen al servicio de UCI y fueron aisladas a partir de muestras

respiratorias tales como expectoración y AET, respectivamente. (Figura 18). Al analizar sus perfiles de susceptibilidad, se ve que presentan cierta similitud, Sin embargo, muchos mecanismos de resistencia pueden transmitirse a través de plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (130). Además, ambas cepas poseen estudio de carbapenemasa negativo.

Respecto al resto de las cepas analizadas de los dendrogramas obtenidos a través de la tecnología de MALDI – TOF MS, se logra establecer que no existe una similitud clonal entre ellas, debido a que presentan una distribución entre 40% - 80% de similitud, siendo no significativo para el estudio 44 (Figura 16). Esto podría confirmar que no existieron brotes asociados a *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Estos resultados demuestran que MALDI-TOF MS es una herramienta útil a tiempo real para realizar estudios de clonalidad proteómica y colaborar en la detección rápida de posibles eventos de transmisión de clones entre pacientes hospitalizados. Sin embargo, para validar estos resultados es ideal compararlos con un método de referencia, como es la electroforesis de campo pulsado y así, generar una relación que permita que la tipificación proteómica a través de MALDI-TOF MS sea usada como una herramienta en tiempo real en la búsqueda de brotes bacterianos (73).

Estudio comparativo de cepas de *Klebsiella pneumoniae* utilizando biotipificación proteómica con electroforesis de campo pulsado

La electroforesis de campo pulsado es considerada el estándar de oro en la tipificación molecular de aislados bacterianos y es la estrategia clave para identificar grupos que estén relacionados con la transmisión de cepas clonales.

Esta técnica es muy laboriosa, engorrosa y de alto costo, por lo que es necesario el desarrollo de métodos simples y eficaces que permitan agilizar estos procesos. La aplicación de técnica de MALDI-TOF MS en los estudios de tipificación proteómica, se basa en el uso de un algoritmo que determina la relación existente entre determinaciones individuales de cada aislado. Los distintos espectros se representan en forma de dendrograma donde la distancia entre las distintas ramas está directamente relacionada con la similitud entre los espectros y, por tanto, la similitud entre los aislados.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de electroforesis de campo pulsado y biotipificación proteómica de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

En este estudio no se encontró una correlación entre MALDI-TOF MS y la electroforesis de campo pulsado ya que en el primero se encontraron 2 grupos que tenían una relación clonal proteómica y que probablemente forman un cluster, sin

embargo, en la electroforesis de campo pulsado se encontraron 7 pulsotipos relacionados y ninguno de ellos coincide con los 2 grupos clonales de la biotipificación proteómica.

Uno de los motivos que se pueden esgrimir al no encontrar una correlación con los resultados de MALDI-TOF MS y electroforesis de campo pulsado podría deberse a que cada una de las metodologías miden propiedades celulares diferentes como proteínas y ADN (114). Es importante destacar que la estandarización de los métodos es fundamental para obtener resultados que sean confiables y que sean reproducibles.

Diferentes autores destacan la importancia de realizar controles estrictos en especial en lo que se refiere a la concentración de la matriz, el procedimiento de preparación de la muestra, al medio de cultivo de donde se toman las colonias bacterianas. Todo esto influye en el espectro de la bacteria (132). Todas estas condiciones se tomaron en cuenta en cada uno de los estudios de clonalidad proteómica, por lo que se deben buscar otras razones de los cuales no permitieron tener resultados comparables entre las 2 metodologías. Aunque MALDI-TOF MS es una herramienta sencilla y potente para el análisis de la biotipificación proteómica, se requieren más estudios para poder estandarizar condiciones y establecer protocolos de interpretación que permitan su inclusión de manera confiable en el estudio de brotes bacteriano.

VII – CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN

Esta investigación: *“Caracterización fenotípica y proteómica (MALDI-TOF MS) de Bacilos Gram negativos multirresistentes aislados en un Hospital Universitario Chileno”*, realizado en el laboratorio de microbiología del servicio de Laboratorio Clínico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, tuvo como objetivo el estandarizar e implementar diversas metodologías proteómicas que buscan ser herramientas que puedan impactar en el diagnóstico microbiológico, epidemiológico e infectológico y aportar al uso racional de los antibióticos y al control de IAAS. Esta investigación viene a cumplir a cabalidad la misión que tiene nuestro hospital *“Nuestra misión es ser el principal Hospital Universitario del país que, junto con la formación de profesionales de la salud de excelencia, la investigación y la mejor práctica clínica, otorgue a la comunidad soluciones integrales de salud”*.

Detectar *Enterobacteriales* y Bacilos Gram negativos no fermentadores productoras de β -lactamasas de tipo carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS.

- Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir que la metodología MALDI-TOF MS realizada en equipo VITEK® MS detecta de forma efectiva la acción de enzimas hidrolíticas, como las Carbapenemasas producidas por Bacilos Gram Negativos.
- El protocolo propuesto y adaptado a las condiciones experimentales de nuestro equipo permitió una especificidad de un 100% y una sensibilidad de

un 93% demostrando que esta metodología es una alternativa real en el diagnóstico de cepas productoras de carbapenemasas.

- El pico de 491 Da obtenido del espectro del ertapenem en este estudio, demostró ser altamente eficiente para la detección de la actividad de las carbapenemasas.
- Los resultados de identificación de las carbapenemasas de tipo VIM sugieren la realización de nuevos estudios referentes a la variación encontradas en función a su porcentaje de intensidad del espectro en los 491 Da obtenido por VITEK® MS, por lo cual se debe aumentar el número de cepas estudiadas para que sea más representativo.

Detectar *Enterobacterales* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante MALDI-TOF MS.

- Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que la metodología MALDI-TOF MS realizada en equipo VITEK® MS detecta de forma efectiva la acción de enzimas hidrolíticas, como las Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*
- El protocolo propuesto y adaptado a las condiciones experimentales del equipo permitió una especificidad de un 86% y una sensibilidad de un 100%

demostrando que esta metodología es una alternativa objetiva en el diagnóstico de cepas productoras de BLEE.

- El pico de 111 Da obtenido del espectro de la ceftriaxona en este estudio, demostró ser eficiente para la detección de la actividad de BLEE, sin embargo, debe ser estudiado en mayor énfasis, ya que esto fue un hallazgo de esta investigación.

Estandarizar y aplicar la tecnología MALDI-TOF MS en estudios epidemiológicos de las cepas basado en la hetero / homogeneidad de los espectros obtenidos y comparar con electroforesis de campo pulsado.

- El análisis de patógenos productores de IAAS se ha basado en una comparación de características fenotípicas, como los biotipos, los serotipos, los tipos de bacteriófagos o bacteriocinas, y los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. (90), (128), (129). Este enfoque ha comenzado a cambiar con el desarrollo e implementación de nuevas tecnologías basadas en análisis de ADN y la proteómica. El uso de la tecnología de espectrometría de masas, específicamente MALDI-TOF MS, para la identificación microbiológica de cepas bacterianas en los laboratorios clínicos es uno de los cambios más importantes después de la introducción de los métodos moleculares.

- Los resultados obtenidos sugieren que la tipificación mediante MALDI-TOF MS basada en los espectros de consenso tiene el potencial de servir como método de detección de cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Si bien no se evidenciaron brotes clonales, ya que en la mayoría de los dendrogramas no presentaron un nivel de semejanza proteómica sobre el 90% (salvo 2 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y 2 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*), esta metodología podría ayudar en avanzar en relaciones proteómicas de este tipo de microorganismos en un periodo de tiempo. Sin embargo, una de las limitantes fue la reducida cantidad de aislamientos, por lo que se necesita ampliar el número de cepas a testear para generar una base de datos más robusta que pueda confirmar los hallazgos presentados en el presente estudio y también poder evaluar por ejemplo la estacionalidad e incluir algún brote ya confirmado con la metodología de electroforesis de campo pulsado
- La tecnología MALDI-TOF MS ha comprobado ser una metodología de simple implementación en los laboratorios de microbiología, permitiendo disminuir tiempo de respuesta, generando una rápida identificación de microorganismos la que ayudaría a que la entrega de resultados sea dentro de 24 horas posteriores al primer aislamiento de bacterias que se

sospechen ser de origen clonal, para así tener un control rápido y oportuno ante un posible brote infeccioso.

- La comparación entre la electroforesis de campo pulsado y la biotipificación proteómica con un grupo de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* elegidas al azar, no se logra observar una similitud entre los 7 pulsotipos y los 2 clones proteómicos obtenidos. Los resultados indican que MALDI-TOF MS es una metodología sencilla para el análisis de tipificación clonal, sin embargo, se necesita seguir mejorando las condiciones experimentales como por ejemplo el tipo de medio de cultivo a utilizar además de poder analizar un número de cepas.

VIII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Zboromyrska y, Ferrer-Navarro M, Marco F y Vila J. Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas. *Rev Esp Quimioter* 2014;27(2): 87-92.
- 2.- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- 3.- Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- 4.- Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter* 2016;29(Suppl. 1): 21-25.
- 5.- Cantón R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:315-25.
- 6.- Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11:477-85.
- 7.- Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R *et al*. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2710-7
- 8.- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1415-8.
- 9.- Luna CM, Aruj P, Niederman MS *et al*. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27: 158-64.
- 10.-Dryden M, Johnson AP, Ashiru-Oredope D *et al*. Using antibiotics responsibly: right drug, right time, right dose, right duration. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2441-3.
- 11.- Poirel L, Nordmann P. Rapidec carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3003-8.

- 12.- Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4281–3.
- 13.- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988; 60:2299-301.
- 14.- Álvarez-Buylla A, et al. Optimized method for *Acinetobacter* species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1589-1592.
- 15.- AbdulWahab A, Taj-Aldeen SJ, Ibrahim EB, Talaq E, Abu-Madi M, Fotedar R. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gramnegative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist.* 2015; 8:83 -8. doi: 10.2147/IDR.S80341
- 16.- Gogichaeva NV, Williams T, Alterman MA. MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007; 18(2):279-84. Doi: 10.1016/j.jasms.2006.09.013
- 16.- Gogichaeva NV, Williams T, Alterman MA. MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007; 18(2):279-84. Doi: 10.1016/j.jasms.2006.09.013
- 17.- Oviaño M, Rodriguez B, Caballero J y Muñoz J. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. 2019. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 5-72
- 18.- Maldonado, N., Robledo, C. & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio.* <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
- 19.- Oviaño M. (2016) Diagnóstico rápido proteómico (MALDI-TOF MS) para la determinación de bacterias resistentes a los antibióticos. (Tesis para optar al grado de doctor en ciencias de la salud) Universidad de la Coruña.

- 20.- Edwards-jones, v., Claydon, m., Evason, d., Walker, J., Fox, a. & Gordon, D. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 295-300. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-3-295>.
- 21.- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One*. 2013 Apr 19;8(4): e61428. doi: 10.1371/journal.pone.0061428. PMID: 23620754; PMCID: PMC3631213.
- 22.- Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014 Apr;52(4):1034-40. doi: 10.1128/JCM.03196-13. Epub 2014 Jan 15. PMID: 24430452; PMCID: PMC3993475.
23. Víctor M, José J, Cadena D, Hernández-gómez C, Blanco VM, Motoa G, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomedica*. 2014; 34:91–100.
24. Patrick R. Murray KSRAP. *Microbiología clínica Murray*. Vol. 53, Dk. 2015. 1689–1699 p.
25. Reyes, R. E., Saad, H. R., Galicia, C. S., Herrera, M. O. & Jiménez, R. C. (2008). Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias Gram negativas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 51, 32-43.
- 26.- Morschhäuser, J., Köhler, G., Ziebuhr, W., Blum-Oehler, G., Dobrindt, U. & Hacker, J. (2000). Evolution of microbial pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1397), 695-704. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0609>
- 27.- Amado NY, Fajardo HD. Prevalencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos gramnegativos de una institución de salud de Tunja (Colombia) en el año 2013. *Salud Soc*. 2015;1(2).
- 28.- Hoyos Y. 2015. Aplicación de tecnología MALDI-TOF MS para la detección de carbapenemasas. (Tesis para optar al grado de Doctor). Universidad de Granada

- 29.- Mf G, † CLY, Galindo-burciaga M. Infecciones asociadas con la atención de la salud y su resistencia antimicrobiana. *Rev Espec Médico-Quirúrgicas*. 2017;22(1):1–13.
- 30.- Otaíza F, Orsini M, Pohlenz M y Tarride T. Pia S. Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud 2017. 2017; 1–75.
- 31.- Subsecretaría de redes Asistenciales. Recomendaciones sobre Aseo y Desinfección de Superficies Ambientales para la Prevención de IAAS.pdf. 2018. p. 1–9.
- 32.- Exento-n-132-medidas para el control de iaas resistetes Aprueba-normas-Tecnicas-de.pdf.
- 33.- Peña I. Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas. 2016;194. Available from: <http://eprints.ucm.es/38513/1/T37533.pdf>
- 34.- Mitchell AM, Srikumar T, Silhavy TJ. Cyclic enterobacterial common antigen maintains the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* in a manner controlled by YhdP. *MBio*. 2018;9(4):1–16.
- 35.- Carrascoso Ruiz G. Características Microbiológicas Y Clínico-Epidemiológicas De Enterobacterias Productoras De Carbapenemasa Oxa-48 En El Contexto De Un Brote Hospitalario. 2016;
- 36.- Mazón ME. Susceptibilidad a betalactámicos y resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas en muestras clínicas en H. Caborca, Sonora. 2009;
- 37.- Onanuga A, Mahindroo J, Singh S, Taneja N. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from urinary tract infections in port-harcourt, nigeria. *Pan Afr Med J*. 2019; 34:1–14.
- 38.- Sauca, G., Gallés, C. & Gasós, M. (1997). Evolución de la sensibilidad de *Escherichia coli* a 6 antimicrobianos durante los últimos 12 años. *Medicina Clinica*, 19(5), 226-229.

- 39.- De Lastours V, El Meouche I, Chau F, Beghain J, Chevret D, Aubert-Frambourg A, Clermont O, Royer G, Bouvet O, Denamur E, Fantin B; CIPHARES Group. Evolution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the gut after ciprofloxacin treatment. *Int J Med Microbiol.* 2022 Feb;312(2):151548. doi: 10.1016/j.ijmm.2022.151548. Epub 2022 Jan 4. PMID: 35030401.
- 40.- Chevez Pedro y Mairena Luis. 2015. Caracterización fenotípica y genotípica de Enterobacterias productoras de BLEE aisladas de urocultivos de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, entre los meses de marzo-abril del año 2013. (Para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- 41.- Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Medica Hered.* 2016;27(1):22.
- 42.- Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol.* 2017;123(4):1003–18.
- 43.- Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629–61.
- 44.- Bernardini A, Cuesta T, Tomás A, Bengoechea JA, Martínez JL, Sánchez MB. The intrinsic resistome of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(1):29–33.
- 45.- Hoyos Mallecot Y. Aplicación de la tecnología MALDI-TOF MS para la detección de carbapenemasas [Internet]. Universidad de Granada; 2015. Available from: <http://hdl.handle.net/10481/40312>
- 46.- Martínez JA. Approach to directed therapy after knowledge of the isolate: carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Rev Esp Quimioter.* 2016; 29:31–4.
- 47.- Hwang, W. & Yoon, S. S. (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37422-9>

48.- Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, et al. Detection of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and class D β -lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013 Jan;51(1):287–90.

49.- Ayala, G. U., Chuquimia, J. A. & Mamani, G. A. (2017). Resistencia Bacteriana por beta-lactamasas de espectro extendido: Un problema *Revista Médica La Paz*, 24(2), 77-83.

50.- Montaluisa Mario.2016. Determinacion de BLEE producidas por *klebsiella pneumoniae* y su relación con la resistencia a los antimicrobianos. (Para optar al título de Licenciado en Laboratorio Clínico). Universidad de Ambato, Ecuador

51.- Bush, K. & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

52.- Lacueva Arnedo M. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. 2017;20. Available from: <https://eprints.ucm.es/54765/>

53.- Castro Pérez, E, Lados Rodríguez, G, Velazco Mársico, J y Salazar de Melo, L. (2015.). Mecanismos de resistencia transferible a quinolonas y su relevancia en la clínica: situación en Uruguay. Monografía.

54.- Laura F. 2018 Evaluación fenotípica y genotípica de la resistencia a tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal. (Para optar al grado de Doctor). Universidad Nacional de la Plata.

55.- Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ Sci.* 2014;19(1):11–28.

56. Murray, Rosental P. Microbiología médica. *J Chem Inf Model.* 2018;53(9):1689–99.

57. Arenz S, Wilson DN. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(9):1–14.
58. Ebimieowei Etebu Ibemologi A. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Circulation.* 1997;96(2):535–41.
59. Urbina A, Anaya C, Ahumado M. Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli* Resumen Intr. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2019;48(1):44–60.
- 60.- Shahbaz K. Cephalosporins: pharmacology and chemistry. *Pharmaceutical and Biological Evaluations* 2017; Vol. 4 (6): 234-238.
- 61.- Bravo MFF. Estudio profiláctico con pacientes de orden sistémico mediante penicilina benzatínica. 2015;
- 62.- Lobanovska MGP. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Phys Rev A.* 1985;32(1):435–47.
- 63.- Liu W, Neidert MC, Groen RJM, Woernle CM, Grundmann H. Third-generation cephalosporins as antibiotic prophylaxis in neurosurgery: What's the evidence? *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2014; 116:13–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.10.015>
- 64.- Cascella M. Third generation cephalosporins. *Probl Crit Care.* 1992;6(1):33–48.
- 65.- Martínez C. Producción de cefalosporinas usando un método semisintético con el uso de la enzima glutaril 7-ACA acilasa. 2015. (Trabajo fin de grado). Universidad de Complutense. España
- 66.- Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(10):692–9.
- 67.- Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal J, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y

notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Pública*. 2019; 43:1.

68.- Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos Díaz L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *Int J Morphol*. 2017;35(4):1214–23.

69.- Méndez Ruiz Ema Alexandra, Autora P, Ruiz M, Asesora EA, García De La Guarda R. Determinación de la frecuencia del gen CTX-M que codifica β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) EN *Escherichia coli* uropatógenas aisladas en el Hospital Guillermo Almenara de marzo a mayo del año 2012. 2015; Available from: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4589/Méndez_re.pdf?sequence=1&isAllowed=y

70.- López-Velandia DP, Torres-Caycedo MI, Prada-Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia Resistance genes in gram negative bacilli: Impact on public health in Colombia. *Rev Universidades y Salud*. 2015;18(1):190–202.

71. Ragupathi NKD, Bakthavatchalam YD, Mathur P, Pragasam AK, Walia K, Ohri VC, et al. Plasmid profiles among some ESKAPE pathogens in a tertiary care centre in south India. *Indian J Med Res*. 2019 Feb 1;149(2):222–31.

72. De Toro M, Seral C, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y. Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;32(1):4–10.

73. Oviaño M, Dolores Rojo M, Navarro Marí JM, Bou G. Detección rápida de resistencias antimicrobianas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 Jun 1; 34:36–41.

74. Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H. & González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000500476>.

75. Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458. <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-07>
76. Monge, K. M. M. (2012). Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 70(608), 599-605.
77. Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E. & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199-220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>.
78. Nicolau, C. J. & Oliver, A. (2010). Carbapenemases en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 19-28. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(10)70004-5)
79. Resurrección-Delgado, C., Montenegro-Idrogo, J. J., Chiappe-Gonzalez, A., Vargas-Gonzales, R., Cucho-Espinoza, C., Mamani-Condori, D. H. & Huaroto-Valdivia, L. M. (2017). *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(2), 261. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2615>
80. Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L. & Cortés, S. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *Nova*, 14(25), 95. <https://doi.org/10.22490/24629448.1733>.
81. Patel, G. & Bonomo, R. A. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>
82. Miriagou, V., Tzelepi, E., Kotsakis, S., Daikos, G., Bou Casals, J. & Tzouveleki, L. (2013). Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), E412-E415. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12238>

83. Girlich, D., Poirel, L. & Nordmann, P. (2012). Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 477-479. <https://doi.org/10.1128/jcm.05247-11>
84. Carrasco-Anabalón, S., Conceição Neto, C. O., D'Alincourt Carvalho-Assef, A. P., Lima, C. A., Cifuentes, M., Silva, F., Barrera, B., Domínguez, M., González-Rocha, G. & Bello-Toledo, H. (2019). Introduction of NDM-1 and OXA-370 from Brazil into Chile in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a single patient. *International Journal of Infectious Diseases*, 81, 28-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.051>
85. Galiana AJ. 2016. Diseño y validación de un nuevo método molecular para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas (Para optar al título de Doctor en investigación Clínica). Universidad Miguel Hernandez, Alicante, España.
86. Cifuentes, M., García, P., San Martín, P., Silva, F., Zúñiga, J., Reyes, S., Rojas, R., Ponce, R., Quintanilla, R., Delpiano, L. & Wolff, M. (2012b). Primer caso de detección de blaKpc en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 224-228. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182012000200018>
- 87.-Vigilancia de carbapenemasas en bacterias que pueden producir Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), ISP-Chile 2014-2017. VOL. 8, N°8, Agosto 2018.
- 88.- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Oct;11(4):589-603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589. PMID: 9767057; PMCID: PMC88898.
- 89.- Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L. & Zervos, M. J. (2006). Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 512-530. <https://doi.org/10.1128/cmr.00025-05>

- 90.- Labarca L., J. (2002). Utilización del antibiograma como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Revista chilena de infectología*, 19. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182002019200017>
- 91.- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M. & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 263-272. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182012000300003>
- 92.- Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. A J Sabat, A Budimir, D Nashev, R Sá-Leão, J M van Dijl, F Laurent⁵, H Grundmann, A W Friedrich, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). *Eurosurveillance*, Volume 18, Issue 4, 24/Jan/2013
- 93.- Fernández Cuenca, F., López Cerero, L. & Pascual Hernández, L. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 20-25. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(13\)70110-1](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(13)70110-1)
- 94.- Ashayeri-Panah, M., Eftekhar, F., Ghamsari, M. M., Parvin, M. & Feizabadi, M. M. (2013). Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 823-828. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822013005000055>
- 95.- Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X. & Hocquet, D. (2017). Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends in Microbiology*, 25(6), 447-455. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>
- 96.- Sachse, S., Bresan, S., Erhard, M., Edel, B., Pfister, W., Saupe, A. & Rödel, J. (2014). Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 267-271. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.005>
- 97.- Enright, M. C. & Spratt, B. G. (1999b). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7(12), 482-487. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01609-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01609-1)

- 98.- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. & Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518-1530. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004>
- 99.-Matrix assisted laser desorption time off light mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. Silvia Angeletti. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 138, July 2017, Pages 20-29
- 100.- Bernaschi, P., Del Chierico, F., Petrucca, A., Argentieri, A., Atti, M. C. D., Ciliento, G., Carletti, M., Muraca, M., Locatelli, F. & Putignani, L. (2013). Microbial Tracking of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates in a Pediatric Hospital Setting. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26(2), 463-472. <https://doi.org/10.1177/039463201302600219>.
- 101 Rödel, J., Mellmann, A., Stein, C., Alexi, M., Kipp, F., Edel, B., Dawczynski, K., Brandt, C., Seidel, L., Pfister, W., Löffler, B. & Straube, E. (2019). Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(3), 581-591. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-03462-2>
- 102.- Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2019. Ministerio de Salud, Departamento de Calidad y Seguridad de la Atención, Programa control IAAS.
103. Prat S. 2018, Instituto de Salud Pública. Recomendaciones para detección carbapenemasas en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*
- 104.- Rita Reig Viader, Emmanuel Giménez. MALDI-TOF en el diagnóstico de las resistencias a antibióticos /— Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2019 .— 76 p; 24 cm. — (Colección: Informes, estudios e investigación / Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Ficha de evaluación de Tecnologías nuevas y emergentes)
105. Canet, J. J. BETELGEUX. *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención.

106. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. *Lett Appl Microbiol*. 2014 Apr;58(4):325-9. doi: 10.1111/lam.12203. Epub 2013 Dec 18. PMID: 24286119.
107. Oviaño, M., Gómara, M., Barba, M. J., Revillo, M. J., Barbeyto, L. P. & Bou, G. (2017). Towards the early detection of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2259-2262. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx127>
- 108.- <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
- 109.- Heng SK, Heng CK, Puthuchery SD. (2009). Stacking gels: A method for maximising output for pulsed-field gel electrophoresis. *Indian J Med Microbiol*. Apr-Jun;27(2):142-5. doi: 10.4103/0255-0857.49428.
- 110.-- Bakula Z, Brzostek A, Borówka P, Żaczek A, Szulc-Kiełbik I, Podpora A, Parniewski P, Strapagiel D, Dziadek J, Proboszcz M, Bielecki J, van Ingen J, Jagielski T. (2018). Molecular typing of Mycobacterium kansasii using pulsed-field gel electrophoresis and a newly designed variable-number tandem repeat analysis. *Sci Rep*. Mar 13;8(1):4462. doi: 10.1038/s41598-018-21562-z.
- 111.- Fenselau, C. & Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 157-171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>
- 112.- Feucherolles M, Frache G. MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Potential Game-Changer in a Modern Microbiology. *Cells*. 2022 Dec 2;11(23):3900. doi: 10.3390/cells11233900. PMID: 36497158; PMCID: PMC9738593.
- 113.- Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumarán, C. & García, P. (2013). Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 140-146. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182013000200004>

- 114.- Oviaño M, Ramírez CL, Barbeyto LP, Bou G. Rapid direct detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:1350-1354.
- 115.- Mao, Y. (2014). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Time of Flight Mass Spectrometry-Identified Models for Detection of ESBL-Producing Bacterial Strains. *Medical Science Monitor Basic Research*, 20, 176-183. <https://doi.org/10.12659/msmbr.892670>.
- 116.- García-Salguero C, Culebras E, Alvarez-Buylla A, Rodríguez-Avial I, Delgado-Iribarren A. Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii*. *Rev Esp Quimioter*. 2021 Jun;34(3):207-213. Spanish. doi: 10.37201/req/142.2020. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33830714; PMCID: PMC8179950.
117. Johansson A. et al. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BioMed Central* [Internet] 2014 [Consultado 28 Sep 2019].
118. Hoyos Y. Aplicación de la tecnología MALDI-TOF MS para la detección de carbapenemasas. Tesis Doctoral Universidad de Granada. [Internet]. 2015. [Consultado 28 Sep 2019]. ISBN:978-84-925-143-9. (también es el 13 y 20 naranja)
119. Sparbier K. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. NCBI. [Internet]. 2012. [Consultado 26 Sep 2019].
120. Hrabá'k J. et al. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. [Internet]. 2011. [Consultado 03 Sep 2019] 49(9).
121. Lindgren Å. et. al. Development of a rapid MALDI-TOF MS based epidemiological screening method using MRSA as a model organism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018. [Consultado 11 Oct 2019]
122. Carvalhaes C. et al. Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. [Internet]. 2013. [Consultado 03 Oct 2019]. 51(1).

123.- Bermejo B. Epidemiología clínica aplicada a la toma de decisiones en medicina. Monografía N°1 Ciencias Básicas. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2001.

124.- Neoh H, Tan X, Sapri H, Tan T. (2019). *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives*. Infection, Genetics and Evolution, 74, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>

125. Elabbasy M, Hussein M, Algahtani F, Abd El-Rahman G, Morshdy A, Elkafrawy I, Adeboye A. (2021) *MALDI-TOF MS based typing for rapid screening of multiple antibiotic resistance E. coli and virulent non-O157 shiga toxin-producing E. coli isolated from the slaughterhouse settings and beef carcasses*. Foods. 10, 820. <https://doi.org/10.3390/foods10040820>

126. Pandey A, Andersen J, Mann M. (2000). *Use of Mass Spectrometry to Study Signaling Pathways*. Science Signaling, (37), pl1-pl11. doi: 10.1126/stke.2000.37.pl1

127.- Toro, L. M. E. & Correa, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia*. Iatreia, 23(3), 240-249. [https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/17712/1/EcheverriLina_2010_KlebsiellaPneumoniaePat%
c3%b3genoIntrahospitalario.pdf](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/17712/1/EcheverriLina_2010_KlebsiellaPneumoniaePat%c3%b3genoIntrahospitalario.pdf)

128.- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors*. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589-603. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>

129.- Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L. & Zervos, M. J. (2006b). *Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection*. Clinical Microbiology Reviews, 19(3), 512-530. <https://doi.org/10.1128/cmr.00025-05>

130.- Moreno M, C., González E, R. & Beltrán, C. (2009). *Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios*. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 69(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-48162009000200014>

131.- Spinali S, Van Belkum A, V. Goering R, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. *Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization– Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation?* J Clin Microbiol. 2015; 53(3): 760–765

132.- Murray P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(11): 1626-30. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x