



**Perfil de susceptibilidad *in vitro* de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos
frente a colistina, tigeciclina y fosfomicina**

**Yuly Nathaly Porras Díaz
Diana Ximena Salgado García**

Trabajo de grado para optar al título de Bacteriólogas

DIRECTORA:

Beatriz Elena Ariza Ayala

CODIRECTORAS:

Alba Alicia Trespalacios Rangel

Sandra Gualtero

Gloria Cecilia Cortes

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ

2017

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

TÍTULO: Perfil de susceptibilidad *in vitro* de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos frente a colistina, tigeciclina y fosfomicina

AUTORES:

Yuly Nathaly Porras Díaz. Estudiante de Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Diana Ximena Salgado García. Estudiante de Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Beatriz Elena Ariza Ayala. Bacterióloga, Coordinadora Investigación y Desarrollo laboratorio clínico Hospital Universitario San Ignacio, Profesora Catedra Facultad de Ciencias Básicas Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Alba Alicia Trespalacios Rangel, Bacterióloga, Directora Posgrados Facultad de Ciencias Básicas Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Sandra Gualtero. Medica Infectóloga Unidad de Infectología Hospital San Ignacio, Bogotá, Colombia.

Gloria Cecilia Cortes, Bacterióloga, Líder Área de microbiología Hospital Universitario san Ignacio. Bogotá Colombia.

EVALUADOR: German Francisco Esparza Sánchez. Bacteriólogo, Docente facultad de Ciencias Básicas Pontificia Universidad Javeriana, miembro de panel expertos en microbiología del CLSI.

**Perfil de susceptibilidad *in vitro* de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos
frente a colistina, tigeciclina y fosfomicina**

Yuly Nathaly Porras Diaz

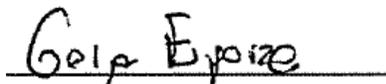
Diana Ximena Salgado Garcia



**DRA. BEATRIZ ELENA ARIZA
DIRECTORA**



**DRA. ALBA ALICIA TRESPALACIOS
CODIRECTORA**



DR GERMAN ESPARZA

JURADO

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Dirigimos nuestros agradecimientos a las personas que con su acompañamiento y apoyo incondicional hicieron posible la realización de este proyecto.

En primer lugar, agradecemos a la Dra. Beatriz Elena Ariza quien con su ímpetu y dedicación nos otorgó todo el apoyo y conocimiento posible, su acompañamiento incondicional fue de gran ayuda para culminar este trabajo de grado. Además, por habernos permitido ser parte de esta investigación ya que los conocimientos adquiridos son realmente significativos para nuestra vida profesional.

En segundo lugar, nuestro reconocimiento es para la Dra. Gloria Cortés y la Dra. Sandra Gualtero, quienes nos colaboraron proporcionándonos información y demás elementos necesarios para llevar a cabo tanto el trabajo escrito como el experimental. Así mismo, al Dr. Giancarlo Buitrago por su amable colaboración en el análisis estadístico del trabajo.

Al Hospital Universitario San Ignacio por la financiación del estudio ya que sin este no se hubiera podido llevar a cabo por lo que agradecemos el permitirnos trabajar en sus instalaciones y su permanente interés en la culminación de este trabajo.

Para finalizar, las autoras del presente estudio nos agradecemos mutuamente la oportunidad de trabajar juntas dado que logramos ser un excelente equipo de trabajo con muchas virtudes, primando siempre el apoyo incondicional, la responsabilidad, el respeto y honestidad en lo que hacíamos. Culminamos esta etapa con la satisfacción del trabajo realizado, esperando haber aportado información importante a esta nueva problemática que está afectando a nivel mundial.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4. MARCO TEÓRICO.....	12
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
6. OBJETIVOS.....	24
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
7. METODO DE ESTUDIO.....	25
8. METODOLOGIA	26
8.1 Viabilidad Aislamientos de Enterobacterias del Cepario HUSI (2013-2016).....	26
8.2 Construcción de base de datos Cepas Enterobacterias 2013-2016.....	26
8.3 Microdilución para colisitina, tigeciclina y fosfomicina.....	29
8.4 Epsilometria para Ertapenem, doripenem y meropenem.....	31
9. RESULTADOS	33
10. DISCUSIÓN.....	39
11. CONCLUSIONES.....	45

12. RECOMENDACIONES.....42

13. BIBLIOGRAFÍA.....43

1. Resumen

La multirresistencia generada por microorganismos productores de carbapenemasas como *Klebsiella pneumoniae* que hace parte de la familia de las Enterobacterias es un tema que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, esto debido a que a medida que transcurre el tiempo las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia que les permiten inhibir la función de una gran variedad de antibióticos, de tal manera que el clínico se ha visto en la necesidad de recurrir a terapias combinadas utilizando moléculas tales como colistina, fosfomicina y tigeciclina en conjunto con carbapenémicos, en algunos casos con perfil de resistencia, para contrarrestar este efecto y así disminuir las tasas de mortalidad. Sin embargo, se desconoce en nuestro medio el comportamiento de estas moléculas a nivel *in vitro*.

Metodología: Se realizó un estudio a partir de 236 muestras obtenidas del cepario del Hospital San Ignacio procedentes del periodo de 2013 a diciembre de 2016. Posteriormente se realizaron pruebas fenotípicas que confirmaran aislamientos con carbapenemasas y se procedió a hacer microdilución para evaluar *in vitro* colistina, fosfomicina y tigeciclina. Además, se analizó la MIC real de los carbapenémicos mediante la técnica de E test.

Resultados: De los 236 aislamientos resistentes a carbapenémicos el microorganismo más comúnmente aislado fue *Klebsiella pneumoniae*. (75%) seguida de *E. cloacae* (8%). Los microorganismos fueron recuperados de muestras de orina, hisopado rectal y sangre entre otros. Los servicios de los cuales se obtuvieron principalmente fueron hospitalización general 36%, urgencias 29% y UCI 17%. Se observó un predominio en el género masculino con un 66% vs un 34% del femenino. Por otro lado los hallazgos de sensibilidad para colistina, fosfomicina y tigeciclina fueron de 26%, 85% y 94% respectivamente. No obstante, la resistencia encontrada en las Enterobacterias estudiadas frente a estos antibióticos fueron de 23%, 15% 1%.

Adicionalmente se reportó que de los 236 aislamientos el 83% fueron resistentes a meropenem, el 74% fue resistente a doripenem y ertapenem reporta una resistencia del 100%.

Conclusión: Los perfiles de susceptibilidad frente fosfomicina y tigeciclina encontrados en las Enterobacterias estudiadas reportan mayor porcentaje de sensibilidad indicando su posible uso para tratamiento. Sin embargo, para colistina el porcentaje de resistencia fue

mayor que su sensibilidad.

La técnica de Etest® presenta un 52% de posibilidades de manejo terapéutico para meropenem en combinación ya que se encontró 25 casos en los que la MIC estaba por debajo de 16ug/ml.

Palabras clave: Colistina, fosfomicina, tigeciclina, microdilución, E test, carbapenémicos

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por bacterias Gram negativas son muy prevalentes, estas pueden ser infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en los hospitales. Día a día se conoce más acerca de los mecanismos de resistencia adquiridos por las Enterobacterias por lo que se ha convertido en un reto terapéutico.

Adicionalmente las bacterias tienen la capacidad de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética, bien sea por sufrir una mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes (Vignoli, 2017).

Dentro de los mecanismos de resistencia más importantes se encuentran: la modificación enzimática del antibiótico, las bombas de expulsión y el cierre de porinas, entre otros. En consecuencia, actualmente se están estudiando las posibles alternativas de terapia combinada aun cuando los antibióticos a utilizar resultan resistentes a nivel *in vitro*.

Por lo anterior, el presente trabajo de grado tiene como objetivo determinar el perfil de susceptibilidad de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos frente a colistina, fosfomicina y tigeciclina., con el fin de lograr dar un apoyo al clínico, de tal manera que las tasas de mortalidad desciendan favorablemente.

Para alcanzar los propósitos del presente estudio fue importante confirmar los criterios de inclusión y exclusión, comenzando por la viabilidad de las cepas de tal manera que aseguraran que correspondían a aislamientos resistentes a algún carbapenémico, de este modo poder determinar la concentración mínima inhibitoria de las moléculas de rescate como lo son colistina, fosfomicina y tigeciclina, teniendo en cuenta las indicaciones acerca de los puntos de corte instaurados por Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ya que para poder proporcionar un tratamiento empírico correcto frente a enterobacterias multirresistentes es fundamental conocer la distribución local de los patógenos al igual que sus patrones de sensibilidad y resistencia. (Fariñas, 2013)

3. Problema y justificación

El acelerado aumento de bacterias resistentes a antibióticos de amplio espectro, ha conllevado a investigar cada vez más a fondo los mecanismos de resistencia que ellas generan, principalmente en el grupo de *Enterobacterias* debido a su alto impacto en la mayoría de las infecciones asociadas al cuidado de la salud.

Además, existe un interés en buscar de qué manera la información resultante del perfil de susceptibilidad de dichas bacterias puede apoyar al clínico mediante un tratamiento dirigido y acertado; más aún, cuando las posibilidades de tratamiento son escasas como es el caso de infecciones por microorganismos multiresistentes, lo que a su vez se ha convertido en un problema de salud pública por generar una estancia hospitalaria prolongada, aumento en los costos de salud y aumento de las tasas de morbilidad por infección. (Patricia A. Bradford, 2016)

Actualmente, la información disponible para el clínico sobre el comportamiento antimicrobiano se basa en estudios *in vitro* de antibiogramas; sin embargo, la mayoría de metodologías, ya sean manuales o automatizadas, tienen como limitante común la escasa cantidad de concentraciones de antibiótico a evaluar. Por lo tanto, no se genera en muchas ocasiones lo que se conoce como “Concentración mínima inhibitoria real” (MIC real) del antibiótico. Además, otra limitante no menos importante, es que varios de los antibióticos utilizados para el manejo de bacterias multiresistentes no son analizados *in vitro* por dichos sistemas, quedando el clínico a expensas de tratar de manera empírica el paciente.

Teniendo en cuenta que las opciones de tratamiento de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos, es decir, multiresistentes, se limitan generalmente al uso de antibióticos llamados “antibióticos de rescate” como colistina, polimixina B, fosfomicina y/o tigeciclina, se desconoce en muchas ocasiones su comportamiento *in vitro* siendo que en nuestro medio no existe como protocolo de trabajo en el laboratorio clínico el estudio de dichas moléculas. Es por ello, importante conocer el comportamiento *in vitro* de estos antibióticos y además la MIC real de cada uno de los carbapenémicos, de tal manera que el clínico pueda tener la posibilidad de su uso en terapia combinada, carbapenémicos y antibióticos de rescate, escogiendo dentro de los carbapenémicos analizados, aquel carbapenemico que a pesar de ser resistente tenga la concentración mínima inhibitoria menor dentro de los analizados.. (Jesús Rodríguez-Baño, 2014)

La finalidad de este proyecto es entonces, evaluar el perfil de susceptibilidad *in vitro* de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos frente a antibióticos de rescate determinando a la par la MIC real a carbapenémicos como doripenem, ertapenem y meropenem.

4. Marco teórico

Las bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, en donde se incluyen géneros como *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp.*, son microorganismos habitantes de la flora intestinal causantes de un número importante de infecciones intrahospitalarias (Leidy González 2014) (Joseph P Lynch 2013). Las Enterobacterias se caracterizan por tener patrones de propagación rápidos por la facilidad de diseminación entre los humanos, ya sea por ingesta de alimentos o agua o fuentes ambientales contaminadas y llevando con ellas su resistencia a químicos y antibióticos a los que han sido expuestos y que comparten entre ellas por plásmidos o transposones (Joseph P Lynch 2013) (Étienne Ruppé 2015).

El 27 de febrero de 2017 la organización mundial de la salud (OMS) en un comunicado, lista los principales patógenos resistentes a antibióticos, siendo éstos patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatir el creciente problema de las bacterias con multiresistencia. El comunicado hace especial énfasis en las bacterias Gram negativas clasificando a la familia *Enterobacteriaceae*, productoras de carbapenemasas, en prioridad 1 o crítica para la búsqueda de nuevos antibióticos o tratamientos. (Organización Mundial de la Salud, 2017)

En el medio clínico, *K. pneumoniae*, de la familia de las enterobacterias es uno de los patógenos más prevalentes entre las infecciones intrahospitalarias, (Hassan Ahmed Khan, 2015) se destaca por ser el segundo microorganismo que se encuentra en Unidades de cuidados intensivos (UCI), pacientes hospitalizados y el tercero encontrado en UCI neonatal y UCI pediátrica. Es un microorganismo que generalmente coloniza el tracto gastrointestinal, la faringe y la piel, siendo considerado un agente importante en neumonía, heridas quirúrgicas y septicemia neonatal. (Jaime Alberto López Vargas, 2009)

Es una bacteria Gram negativa no móvil que desarrolla una cápsula constituida por polisacáridos, formando una envoltura gruesa en la superficie de la bacteria, es considerada

como el factor de virulencia más importante, protegiendo al patógeno de la fagocitosis, la desecación y contra agentes bactericidas. (Lazaro, 2003)

Su proceso infeccioso inicia con la adherencia a células del hospedero por medio de estructuras filamentosas denominadas pilis que actuarán de anclaje celular para promover la colonización bacteriana y formación de biopelículas que confieren la capacidad al microorganismo de evadir la respuesta inmune y soportan ambientes hostiles (Suescún, 2006)

Escherichia coli hace parte de la flora intestinal de los mamíferos desde el momento del parto, manteniendo una relación comensal en personas inmunocompetentes, sin embargo, cuando se presenta un cuadro de inmunodeficiencia o se rompen las barreras gastrointestinales el patógeno puede inducir una infección grave. (James B. Kaper, 2004) Se ha reportado como segunda causa de consulta en infecciones de tracto urinario donde *E.coli* multirresistente muchas veces se encuentra presente. (Gómez, 2007)

Adicionalmente es una bacteria que puede ocasionar infecciones en tracto gastrointestinal, septicemia, meningitis neonatal, gastroenteritis y peritonitis. (Hassan Ahmed Khan, 2015)

Al igual que *Klebsiella spp.* tiene mecanismos de virulencia formados por adhesinas que promueven la adhesión y colonización al hospedero. Es sin embargo, una característica de *E.coli* la secreción de toxinas que impactan directamente en los procesos biológicos de las células eucariotas. *Enterobacter spp.* es un patógeno oportunista que raramente afecta a personas inmunocompetentes, pero se ha reportado especialmente *E.aerogenes* y *E. cloacae* como patógenos multiresistentes descritos durante varios brotes de infecciones adquiridas en hospitales de Europa. (Anne Davin Regli, 2015). Según estudios, *Enterobacter spp.* se ha considerado como un importante patógeno, especialmente en el servicio de cuidados intensivos. (Anne Davin Regli, 2015) (W. Eugene Sanders JR, 1997) Los aislamientos de muestras clínicas de *Enterobacter spp* se recuperan de vías respiratorias, heridas quirúrgicas, sangre y vías urinarias, relacionándose así con neumonía, septicemia, cistitis o pielonefritis. Su capacidad infectiva se ha asociado a su capacidad para formar biopelículas y la secreción de diferentes citotoxinas como enterotoxinas, hemolisinas y toxinas formadoras de poros (Anne Davin Regli, 2015), siendo este complejo de factores su arsenal de virulencia.

Serratia marcescens por su parte es una Enterobacteria que se puede encontrar a nivel

intestinal del hombre y en reservorios con escasos nutrientes. Su adquisición más común se da a nivel intrahospitalario, especialmente en unidades de cuidados intensivos. (M.Teresa Dossi C., 2002). Se presenta mayormente en personas con enfermedades de base como, diabetes, neoplasias e insuficiencia renal. Entre las infecciones provocadas por este patógeno se encuentran neumonía, infección de vías urinarias, infección de heridas quirúrgicas, meningitis, endocarditis y sepsis, entre otras. (María Magdalena Rodríguez Palacios, 2015)

De las bacterias entéricas *Serratia spp.* se caracteriza por secretar quitinasa extracelular, proteasas, nucleasas y lipasas que sirven como factores de virulencia para infectar y colonizar a hospederos inmunocomprometidos. (Alejandro Ruiz Sánchez, 2003)

Todas las Enterobacterias expresan factores de virulencia comunes entre sí y específicos entre especies, que define y caracteriza la infección causada por estos patógenos, explicando las repercusiones de infección a nivel intrahospitalario contra pacientes que generalmente se encuentran con un sistema inmune debilitado, es por ello que el número de antibióticos destinado para estas infecciones es bastante amplio, dentro de los cuales se destaca el grupo de betalactámicos (como cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos y monobactámicos), así como las quinolonas, los cuales actúan en el interior de la bacteria ejerciendo su actividad bactericida al unirse e inhibir las topoisomerasas bacterianas (Vacarezza, 2017).

Los antibióticos β -lactámicos son actualmente una de las familias de antibióticos más utilizadas en la práctica clínica (Jorge Calvo, 2008) por su amplio espectro frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su nombre proviene de la presencia de un anillo lactámico en su estructura con un oxígeno en posición β con respecto a un nitrógeno. Dependiendo de los radicales que se unen al anillo se pueden distinguir diferentes grupos, que ya han sido mencionados como las penicilinas, cefalosporinas, monobactam y carbapenémicos. (Jorge Calvo, 2008)

Dentro del grupo de betalactámicos, las penicilinas de amplio espectro, tienen la capacidad de inhibir selectivamente la síntesis del peptidoglicano (mureína), sustancia que le confiere la forma, rigidez y estabilidad a la membrana celular de tal manera que si hay un bloqueo en la síntesis de esta lo que se esperaría es la destrucción de la bacteria por lisis osmótica (Lozano Valdés & Larrondo Muguercia, 2017). En cuanto a las cefalosporinas, las de tercera

y cuarta generación, son las más indicadas en tratamiento para Enterobacterias (Rivas & Rivas, 2002). Por último los carbapenémicos han sido considerados la siguiente línea de tratamiento para infecciones producidas por Enterobacterias resistentes a cefalosporinas, o microorganismos productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), dado que no suelen ser afectadas por estas enzimas (García & Astocondor, 2012) sin embargo, cada vez más se presentan casos de dicha resistencia. (Salgado, 2015).

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa de la biosíntesis de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Su sitio blanco de acción son las enzimas PBP que tienen acción transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa, actividad importante para entrelazar los componentes del peptidoglucano. Los β -lactámicos bloquean estas enzimas porque estructuralmente su anillo es similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas del peptidoglucano, sustrato natural de las PBP. (Jorge Calvo, 2008)

Entre la familia de los antibióticos β -lactámicos, los carbapenémicos han sido ampliamente usados contra las Enterobacterias, el primer carbapenémico fue la tienamicina, desarrollada a partir de *Streptomyces cattleya*, (M. Gobernado, 2007) sin embargo por su inestabilidad molecular, se desarrolla un compuesto derivado en 1985 el imipenem. En 1988 el imipenem fue el primer carbapenémico de uso clínico que apareció en el mercado, seguido de meropenem en 1997 y posteriormente de ertapenem, disponible en los países de la Unión Europea desde 2002 (M. Gobernado, 2007). Doripenem representa el carbapenémico más reciente siendo autorizado su uso clínico en el año 2009. (Monge, 2013)

El actual aumento exponencial de Enterobacterias resistentes a β -lactámicos ha impulsado que se desarrollen alrededor del mundo diversas investigaciones sobre los mecanismos de resistencia a antibióticos que están desarrollando las Enterobacterias.

Entre los mecanismos de resistencia a los antibióticos se encuentran, la expulsión del antibiótico por bombas de eflujo, la forma de hacerlo es tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior evitando así la llegada de la molécula al sitio de acción. Siendo éste un mecanismo casi exclusivo de las bacterias Gram negativas. (José David Tafur, 2008) . Al mismo tiempo las bacterias Gram negativas pueden generar cambios en la membrana lipídica desarrollando así cambios en la permeabilidad de la membrana

externa (3). Estos cambios se deben principalmente por cambios en las porinas, proteínas que forman canales que regulan la entrada de elementos a la célula, entre ellos los antibióticos. El cambio de conformación de las porinas puede llevar a impedir el paso de éstos elementos terapéuticos al espacio periplásmico, lo que bloquea la acción del antibiótico. (José David Tafur, 2008). Siendo más representativo este mecanismo en bacterias Gram positivas, la alteración del sitio de acción es en las Enterobacterias también un mecanismo importante en cuanto a la resistencia antimicrobiana. Se caracteriza por alterar el sitio donde actúa el antibiótico que puede presentarse como alteraciones estructurales secundarias a mutaciones en la pared de la bacteria, disminuyendo así la afinidad del antibiótico por las proteínas blanco. (José David Tafur, 2008)

Por último, la modificación enzimática del antibiótico, donde la bacteria expresa enzimas capaces de provocar cambios estructurales en la molécula para que éste pierda su funcionalidad. Es el principal mecanismo de resistencia tanto cromosomal como plasmídica que poseen las Enterobacterias. Las enzimas más prevalentes son las beta-lactamasas que tiene la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámicos que poseen los antibióticos de ésta línea. (José David Tafur, 2008) . Las Enterobacterias presentan una resistencia a los β -lactámicos por medio de la producción de β - lactamasas como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, penicilinas con inhibidores y aztreonam y las β -lactamasas del tipo AmpC2 que generan resistencia a las cefalosporinas, penicilinas, penicilinas con inhibidores y Aztreonam. Cefepime mantiene su actividad.. (Jesús Oteoa, 2014) (José David Tafur, 2008) En estos dos casos los carbapenémicos mantienen su actividad.

Sin embargo, en los últimos años se ha identificado la aparición de Enterobacterias productoras de carbapenemasas, que limita en gran medida la terapia antibiótica contra estos patógenos. (Jesús Oteoa, 2014); Según la clasificación Ambler las carbapenemasas se encuentran en 3 clases: A, B, y D. Dentro las enzimas de tipo A se encuentran las carbapenemasas tipo KPC que confieren resistencia a carbapenémicos principalmente a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, sin embargo pueden encontrarse en otros generos de enerobacterias.Las carbapenemasas tipo KPC son reconocidas por tener mayor potencial para diseminación debido a su localización en plásmidos. Las especies más comunes en adquirir este tipo de enzimas son *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Serratia spp* entre otros (Gómez-Gamboa, 2014).

Las carbapenemasas pertenecientes a la clase B, también conocida como enzimas metalo betalactamasas por requerir zinc para su actividad, se encuentran las enzimas tipo VIM, IMP y NDM. Por otro lado, las enzimas de la clase D u oxacilinasas o tipo OXA las cuales confieren resistencia a *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* (R. Vignoli, V. Seija 2008) (Cantón , 2011)

Las más encontradas a nivel mundial son carbapenemasas tipo KPC. La propagación de enzimas KPC (codificadas en genes *blaKPC*) son altamente transferibles dada su transferencia horizontal que facilita su diseminación geográfica y combinación dentro de plásmidos. (Mitchell W. Pesesky, 2015) .

Los datos epidemiológicos, referentes a la producción de carbapenemasas, especialmente tipo KPC uno de los mecanismo más importante de resistencia enzimática en Enterobacteriaceae, es reportado en la mayoría de los países alrededor del mundo, pero se observan dos patrones epidemiológicos divergentes: regiones que reportan muy pocos aislamientos productores de KPC (Australasia y África) y áreas donde KPC son endémicos (noreste USA, Puerto Rico, Grecia, Zhejiang Provincia de China e Israel). (Patrice Nordmann, 2011) (Chen, 2012)

Las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, entre ellas *Klebsiella pneumoniae* se reportaron por primera vez en 1996 (Luke F Chen 2012) en Carolina del Norte; desde entonces y más específicamente desde el año 2001 ha habido una evolución evidente en cuanto a adquisición de resistencia de éste microorganismo por los reportes recibidos alrededor del mundo entre el 2001 y el 2003 en Estados Unidos, Israel, Puerto Rico y Escocia, principalmente. En América del sur el primer reporte de KPC fue en Colombia en el año 2006, en donde al mismo tiempo se contaba con reportes en Puerto Rico. Entre 2007 y 2008 la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN) de Estados Unidos informó una resistencia a carbapenémicos de hasta 4,0% de *Escherichia coli* y 10,8% de *K. pneumoniae*. (Neil Gupta 2011) (Fig. 1)

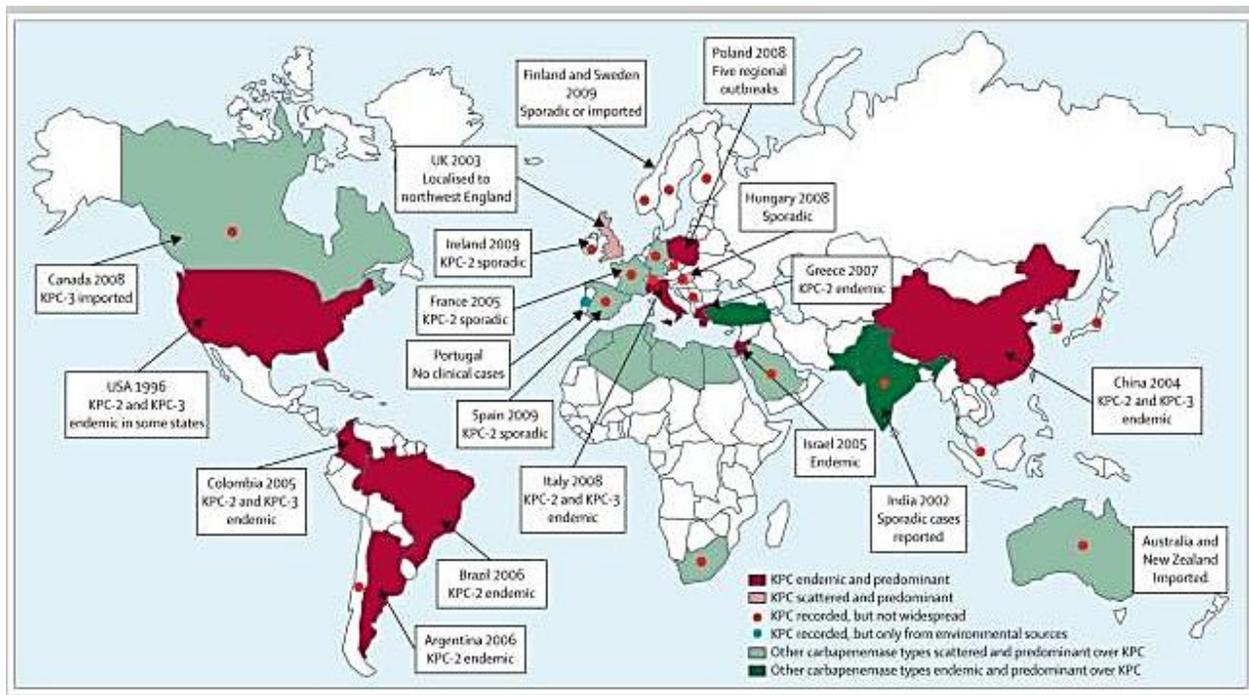


Fig. 1. Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasas por país de origen (Munoz-Price, 2013)

Es, sin embargo, relevante mencionar que en Grecia es donde se ha encontrado la mayor prevalencia a nivel mundial de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos. En 2010 se estimó un 49% de aislamientos resistentes a carbapenémicos reportados por Grecia al Centro Europeo para el Control de Enfermedades y Prevención. (Luke F Chen 2012)

Con respecto a la resistencia a carbapenémicos en nuestro país, el aumento en la resistencia a betalactámicos en general es considerable pero particularmente en el caso de resistencia a carbapenémicos, según el último reporte de los entes de vigilancia y salud pública, en pacientes adulto se presenta un incremento de resistencia en el 2015 de un 21.5% comparado con lo reportado en 2014 que fue del 18.6%. En cuanto a pediatría, llama la atención el incremento en la resistencia a Imipenem y la aparición de resistencia a ertapenem que alcanzaron el 6.9% en comparación al 2014 donde no se evidenciaron casos. (GREBO, 2015)

En estudios locales, por ejemplo el desarrollado en Medellín entre el 2007 y 20012, se observa que la resistencia a imipenem, meropenem y ertapenem por *E.coli* se mantuvo constante durante los seis años pero en microorganismos como *K. pneumoniae* y *S.*

marcescens se observó un incremento de la resistencia a imipenem y meropenem, así como un incremento de la resistencia a ertapenem en *E. cloacae*. (Natalia Andrea Maldonado, 2014)

Particularmente preocupa mucho el aumento de casos de *S.marcescens* resistentes a carbapenémicos, ya que este microorganismo es intrínsecamente resistente a polimixinas lo que limita las opciones terapéuticas disponibles; en 2013 se presentó resistencia a carbapenémicos en 7,4% y ya para 2014 se había duplicado el porcentaje (14,1%). (GREBO,2014)

Para el tratamiento de infecciones por Enterobacterias productoras de carbapenemasas se consideran moléculas como colistina, polimixina administrada por primera vez en el año 1959 por vía intravenosa para ser desarrollada posteriormente como un antibiótico para el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* responsable en su mayoría de las infecciones pulmonares. Este antibiótico, actúa sobre la membrana celular bacteriana alterando su permeabilidad y provocando lisis celular (Vademecum, 2016). Sin embargo, el tratamiento con colistina tiene indicaciones desfavorables debido a su alta toxicidad. Entre sus efectos adversos se encuentra neurotoxicidad, inestabilidad vasomotora, psicosis, apnea, nefrotoxicidad y toxicidad fetal entre otros. (Stefan Schwarz, 2016)

Otra opción terapéutica es fosfomicina, éste es un antibiótico bactericida caracterizado por inhibir la síntesis de la pared bacteriana mediante el bloqueo de una de sus glicoproteínas, (Vademecum, 2016) suele utilizarse como tratamiento de amplio espectro entre las bacterias Gram negativas dado que es considerado un antibiótico con bajos niveles de resistencia bacteriana lo que lo vuelve un tratamiento alternativo en combinación con un carbapenémicos para combatir las infecciones por Enterobacterias. (Ilias Karaiskos, 2014)

En cuanto a tigeciclina, es el primer antibiótico de la familia de las gliciclinas con actividad de amplio espectro especialmente frente a bacterias multirresistentes, intrahospitalarias y de la comunidad, lo que le confiere gran importancia a nivel clínico debido a su mecanismo de acción sobre las bacterias ya que inhibe la traducción de proteínas en las mismas uniéndose a la subunidad ribosomal 30S, (Vademecum, Vademecum, 2016). Por lo anterior, es uno de los antibióticos de última generación más importante para tratar infecciones moderadas a severas de la piel y tejidos blandos al igual que infecciones intraabdominales complicadas y aquellas producidas por microorganismos resistentes a

carbapenémicos. (Daniel J. Curcio, 2006)

Las opciones de tratamiento de rescate que se están considerando ahora generalmente se limitan a colistina, gentamicina y / o tigeciclina, y en el caso específico de infecciones urinarias por Enterobacterias multiresistentes, fosfomicina. Por otra parte, diversos estudios de infecciones causadas por microorganismos resistentes a carbapenémicos indican que las terapias combinadas son a menudo más eficaces que las monoterapias (David van Duin Keith S. Kaye, 2013), siendo esta conclusión apoyada por datos *in vitro*. (Mario Tumbarello, 2012). Estos antibióticos tampoco se salvan de generar resistencia en las bacterias. No es ahora una sorpresa, pero sí una gran preocupación encontrar que con el aumento actual de tratamiento con colistina para infecciones bacterianas por Gram-negativos multirresistentes, se ha reportado la presencia de *Acinetobacter spp.*, y *Pseudomonas spp.* resistentes a colistina en todo el mundo. (Young-Mi Ah, 2014). Además de esto, las enterobacterias también pueden obtener resistencia a éstas moléculas.

La resistencia a la colistina en *K. pneumoniae* por ejemplo, se ha reportado en todo el mundo incluyendo Europa, Norteamérica, Sudamérica, Asia y Sudáfrica. La resistencia a colistina reportada más alta, en cepas de *K. pneumoniae* clínicamente aisladas se reportó en Grecia (10,5-20%), seguido de Corea del Sur (6,8%), Singapur (6,3%) y Canadá (2,9%) (Young-Mi Ah, 2014)

La resistencia transferible o adquirida a las Polimixinas está mediada por un plásmido denominado mcr-1, que codifica para fosfoetanolamina transferasa, enzima que altera estructuralmente el lípido A de la pared bacteriana, impidiendo de esta forma la interacción del antibiótico con la bacteria. En China se reportó este gen en *Escherichia coli* y *K.pneumoniae*. Un segundo gen mcr-1.2 variante de mcr-1 se identificó en *K.pneumoniae* KPC en Italia, seguido del gen mcr-2 reportado en Bélgica. (Agila K. Pragasam, 2017)

Adicionalmente fosfomicina tiene la capacidad de penetrar capas de biopelículas, siendo utilizada en terapia combinada con otros antibióticos en cepas que forman biopelícula. En el caso de cepas como *E. coli* se ha demostrado que fosfomicina tiene una actividad sinérgica con N-acetylcysteine, fármaco coadyuvante de la inhibición y destrucción de biopelículas. La capacidad de la fosfomicina para modificar la producción de proteínas de unión a penicilina (PBPs) permite su uso para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a otros antibióticos. (S. Dinicola, 2014)

La resistencia de la fosfomicina puede atribuirse mutaciones cromosómicas que afectan principalmente a su captación; se ha demostrado que este mecanismo es adquirido fácilmente *in vitro*, que podría ser explicado por la ausencia de mutantes *in vivo* por ser defectuosos fuera del huésped. (Kastoris, 2010)

La tigeciclina es un fármaco de amplio espectro que actúa sobre patógenos productores de infecciones nosocomiales, incluyendo bacterias resistentes a los β -lactámicos y a las quinolonas. Es un agente bacteriostático, que inhibe la síntesis de proteínas. (Curcio & Istúriz, 2006)

Se ha encontrado que la resistencia a tigeciclina en *Klebsiella pneumoniae* está en aumento, reportándose casos en Grecia, India, y Arabia Saudí, en donde su eficacia como agente terapéutico se ha vuelto incierto, en especial en pacientes con bacteremia persistente causada por *Escherichia coli* , *Acinetobacter baumannii* , y *K. pneumoniae* tratados con tigeciclina (Tzouveleki & Markogiannakis , 2012). Por otro lado, en la literatura indican que su actividad no se ve afectada por mecanismos de resistencia enzimáticos, presentes en bacterias Gram negativas dentro del hospital, como BLEE, AmpC, serina-carbapenemasas y metalobetalactamasas. Sin embargo, hay estudios donde se ha encontrado que la actividad de tigeciclina se ve afectada por bombas de eflujo no específicas que se encuentran en Enterobacterias *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter*, confiriendo sensibilidad disminuida a aminoglucósidos y fluoroquinolonas ya que desarrollan un incremento de 4 veces en su concentración mínima inhibitoria (CIM) (Curcio & Istúriz, 2006) (Giménez & García-Rey, 2009)

Actualmente, tigeciclina es considerada un agente activo disponible frente a determinadas cepas/clones que han aumentado su prevalencia en todo tipo de infecciones. (Giménez & García-Rey, 2009)

Las pruebas de laboratorio para determinar la susceptibilidad de las bacterias frente a los antibióticos es una herramienta indispensable para el clínico, permitiendo dirigir un tratamiento contra un microorganismo conocido, así como mantener una vigilancia epidemiológica respecto a nuevos mecanismos de resistencia y frente a posibles brotes que puedan afectar el ambiente hospitalario.

En la actualidad respecto a las moléculas de rescate, y puntualmente frente a colistina los

laboratorios clínicos utilizan métodos como difusión en disco (DD), epsilometría, o TREK Sensititre, para evaluar la acción de colistina *in vitro*. (Janet A. Hindler, 2013)

Se ha considerado que el uso del método DD para colistina es problemático para aislamientos que no sean *Pseudomona spp.* produciendo gran cantidad de falsa susceptibilidad, si se compara con dilución en agar. Al mismo tiempo se ha visto que evaluar colistina por medio de epsilometría puede generar hasta un 32% de falsa susceptibilidad si se compara con dilución en agar. (Janet A. Hindler, 2013)

Según estudios realizados por Janet A. Hindler et al. sugieren que el método de microdilución en caldo con polisorbato 80 el cual disminuye la adherencia de colistina a la superficie de poliestireno de los pozos debería usarse en el laboratorio como método de referencia. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el efecto del polisorbato 80 respecto a la viabilidad de los organismos no ha sido plenamente estudiado, y posiblemente podría tener un efecto sinérgico con colistina de tal manera que pueden dar resultados falso sensibles. (Janet A. Hindler, 2013)

En cuanto a tigeciclina y fosfomicina para evaluar su actividad *in vitro* suelen utilizarse técnicas de Microdilución en caldo, difusión en disco e E test, sin embargo, el CLSI no recomienda los métodos de dilución en caldo pertinentes para fosfomicina (Falagas & Kastoris, 2009) (Zárate & Serruto, 2010). Por otro lado, en un estudio indicaron que la determinación de la susceptibilidad de tigeciclina presenta dificultades en el laboratorio asistencial al utilizar la técnica de difusión por disco, por lo que se sugiere que los resultados intermedios o resistentes obtenidos por difusión en agar sean comprobados mediante el uso de E-test. (García & Porte, 2017)

A nivel mundial es común en este momento, la realización de estudios de perfil de susceptibilidad en bacterias en búsqueda de mecanismos de resistencia por parte de los laboratorios de microbiología, en el caso puntual de resistencia frente a carbapenémicos, por ejemplo, desarrollando inicialmente pruebas de microdilución o difusión en disco y luego realizando pruebas fenotípicas confirmatorias como test de Hodge, sinergismo con ácido borbónico y sinergismo con EDTA, entre otros; e igualmente pruebas moleculares, algunas convencionales y otras en sistemas automatizados cerrados más cercanos a la aplicabilidad en el laboratorio clínico. Sin embargo, no se encuentra actualmente dentro de la dinámica de búsqueda del perfil de susceptibilidad bacteriano, el análisis del comportamiento frente

a antibióticos de rescate, como colistina, fosfomicina y tigeciclina, aun cuando en la literatura ya se registran porcentajes de resistencia importantes. En Colombia no se registra literatura científica que muestre el comportamiento de dichas moléculas en aislamientos de enterobacterias resistentes a carbapenémicos. (Cristina E. Cabrera, 2011) (Konstantina Dafopoulou, 2015)

5. Pregunta de investigación

¿Cuál es el perfil de susceptibilidad de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos frente a antibióticos como colistina, tigeciclina y fosfomicina?

6. Objetivos

6.1 Objetivo General: Determinar el perfil de susceptibilidad de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos frente a colistina, fosfomicina y tigeciclina.

6.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de Enterobacterias frente a colistina, fosfomicina y tigeciclina.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria real (MIC real) de Enterobacterias frente a los carbapenémicos.

7. Método de estudio

7.1 Tipo de estudio: Observacional retrospectivo

7.2 Población de estudio

La población de estudio está constituida por aislamientos de Enterobacterias, provenientes de muestras de pacientes que asistieron al Hospital Universitario San Ignacio por diferentes servicios entre noviembre de 2013 y diciembre de 2016 (3 años y que contaban con resistencia al menos a un carbapenémicos (Meropenem, Doripenem, Ertapenem) y pruebas fenotípicas confirmatorias de presencia de posibles carbapenemasas. Estos aislamientos se encuentran conservados en el Cepario del hospital, congelados a -80°C.

7.3 Tamaño de la muestra: 236 aislamientos de Enterobacterias, fue el número de aislamientos correspondientes a los 3 años descritos en la población de estudio que cumplían con los criterios de inclusión al estudio, descritos a continuación.

7.4 Criterios de Estudio

7.4.1. Criterios de inclusión

Aislamientos correspondientes a Enterobacterias con resistencia al menos a un carbapenémicos (Meropenem, Doripenem, Ertapenem) durante el periodo comprendido entre noviembre de 2013 a diciembre de 2016, de diferentes muestras biológicas de pacientes del Hospital Universitario San Ignacio.

7.4.2 Criterios de Exclusión

Aislamientos de microorganismos diferentes a la familia de las Enterobacterias, aislamientos de Enterobacterias sensibles a carbapenémicos y aislamientos de muestras clínicas provenientes de meses diferentes al periodo descrito.

7.5 Conflicto de intereses

Los investigadores no refieren conflicto de intereses en el presente proyecto.

7.6 Consideraciones éticas

En el presente estudio no se realizó recolección de muestras directamente de los pacientes razón por la cual no se diligenció consentimiento informado. Por el contrario, el proyecto se inició a partir de cepas conservadas en el cepario del laboratorio de microbiología del Hospital Universitario San Ignacio, que inicialmente habían sido aisladas por orden médica y se conservan por vigilancia epidemiológica institucional. Los datos necesarios para el proyecto a los que se tuvo acceso, correspondientes a historia clínica y diagnóstico se obtuvieron bajo el aval del Comité de ética e investigaciones del Hospital san Ignacio.

8. Metodología de investigación

En este estudio se evaluaron 236 aislamientos provenientes del cepario del Hospital Universitario San Ignacio con los criterios de inclusión antes mencionados. Dichas muestras fueron conservadas por el personal de microbiología del Hospital San Ignacio por vigilancia epidemiológica y posteriormente guardadas en medios de congelación.

8.1 Viabilidad Aislamientos de Enterobacterias del Cepario HUSI (2013-2016)

El Cepario del Hospital Universitario San Ignacio cuenta con 236 Enterobacterias resistentes a carbapenémicos correspondientes al periodo noviembre 2013-diciembre 2016.

Las cepas se encuentran conservadas a -80°C , las cuales fueron resembradas en Agar sangre y mac conckey e incubadas durante 48 horas para observar viabilidad y pureza.

Aquellas que se encontraron viables y puras se reconfirmaron tanto en su identificación como en pruebas de susceptibilidad (metodología MicroScan Becman Coulter®).

8.2 Construcción de base de datos Cepas Enterobacterias 2013-2016

Teniendo en cuenta los aislamientos viables y puros, se desarrolló una base de datos con respecto a las cepas en Microsoft Excel, en donde se consignó la siguiente información: N° Labcore (identificación interna del Hospital Universitario San Ignacio), Historia Clínica, Edad, Servicio donde se encontraba el paciente en el momento de la toma de muestra, fecha de la toma de la muestra, microorganismo aislado, tipo de muestra, Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los tres antibióticos carbapenémicos (Meropenem, Doripenem, Ertapenem). Las columnas siguientes corresponden al trabajo de investigación: MIC por epsilometria de ertapenem, doripenem, meropenem, MIC por microdilución de colistina, fosfomicina y tigeciclina.

Operacionalización de las variables

Variable	Definición	Tipo de variable	Nivel Operativo	Medida Resumen	Fuente de la variable
Nº Labcore	Número de identificación interna de toda muestra que ingresa al laboratorio clínico del Hospital San Ignacio.	Cualitativa	No aplica	No aplica	Sistema Labcore (Sistema integrado de Laboratorio Clínico)
Edad	Rango de vida de personas incluidas en el estudio	Cualitativa nominal	Años	Frecuencias absolutas y relativas	Historia Clínica
Tipo de muestra	Muestra biológica a la que se le practica análisis microbiológico de identificación de gérmenes y antibiograma	Cualitativa	Orina, sangre, hisopado rectal, etc.	Frecuencias absolutas y relativas	Historia Clínica
Género	Clasificación de la población entre femenino y masculino	Cualitativa nominal	Masculino Femenino	Frecuencias absolutas y relativas	Historia Clínica
Fecha de ingreso	Periodo de tiempo definido en día, mes y año	Cualitativa	Día, mes, año	Frecuencias absolutas y relativas	Historia Clínica
Servicio	Área del hospital en la que se recibe al paciente	Cualitativa nominal	Consulta Externa	Frecuencias absolutas y relativas	Historia Clínica

Concentración mínima Inhibitoria (MIC)	Es la concentración mínima de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento del microorganismo	Cuantitativa	Valor en µg/ml	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de laboratorio
Perfil de susceptibilidad por microdilución	Tipo de perfil de sensibilidad del microorganismo aislado según valor de la concentración inhibitoria mínima (MIC) para cada antibiótico reportado	Cualitativa nominal policotómica	Sensible Intermedio Resistente Sensible dosis dependiente Wild type Not wild Type	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de laboratorio
Perfil de susceptibilidad por Epsilometria	Tipo de perfil de sensibilidad del microorganismo aislado según valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada antibiótico reportado	Cualitativa nominal policotómica	Sensible Intermedio resistente	Frecuencias absolutas y relativas	Reporte de laboratorio

8.3 Microdilución para colisitina, tigeciclina y fosfomicina

La microdilución se utiliza para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de los microorganismos a los antimicrobianos mediante el método de diluciones del antibiótico en estudio. Inicialmente las muestras son resembradas en agar sangre y macconkey para comprobar su viabilidad y pureza. Todas las colonias aisladas se les realizarán identificación y microdilución utilizando paneles MicroScan Ref. NC 66. Se realiza un inóculo a escala 0,5 McFarland (absorbancia de 0,08 a 0,12). Cada placa de microdilución cuenta con 96 pozos que contienen 100 µl de la suspensión 0.5MF del microorganismo a

estudiar. Finalmente, a las 24 horas de incubación a 35°C se determina la (MIC) de cada antibiótico. El panel de microdilución referencia NC66 contiene los antibióticos colistina, fosfomicina y tigeciclina.

Las concentraciones de antibiótico que presenta el panel se observan en la tabla 1.

Diluciones panel NC66 Microscan (µg/ml.)	
Fosfomicina	64
Tigeciclina	1,2
Colistina	2,4

Tabla 1. Concentraciones según antibiótico por microdilución.

En el caso de los carbapenémicos ertapenem, meropenem y doripenem, las MIC fueron realizadas con panel Ref. 60, el cual posee las concentraciones de ertapenem (1,2, y 4 ug/ml.), doripenem (0.5, 1 y 2 ug/ml.) y meropenem (1, 2,4, y 8 ug/ml.)

Los resultados obtenidos se interpretan según los criterios de CLSI versión 2017 (CLSI, 2017) y su clasificación según la respuesta *in vitro* del microorganismo frente al antibiótico se da en términos de: sensible, intermedio, sensible dosis dependiente, wild type (WT), not wild type (NWT) o resistente, dependiendo del antibiótico a interpretar. Los puntos de corte para esta interpretación se encuentran en la tabla 2.

Antibióticos / Puntos de corte	Fuente			
	S	I	R	
Fosfomicina	≤64		>64	Punto de corte urinario CLSI 2017
Colistina	WT ≤2		NWT ≥4	CLSI 2017 para <i>Klebsiella</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E.aerogenes</i> , y <i>R.ornithinolytica</i>
Tigeciclina	≤2	4	≥8	FDA
Meropenem	≤ 1	2	≥4	CLSI 2017
Doripenem	≤ 1	2	≥4	CLSI 2017
Ertapenem	≤ 0.5	1	≥2	CLSI 2017

Tabla2. Puntos de Corte según antibiótico

8.4 Epsilometría para meropenem

La epsilometría combina los principios de la difusión en disco y la dilución en agar cuando se estudia la susceptibilidad *in vitro* (Triantafilo, 2002). A partir de un cultivo de colonias puras en agar Macconkey se toman de 2 a 3 colonias para ser emulsionadas en un tubo con solución salina ajustando la turbidez a una absorbancia de 0.08-0.12 correspondiendo a una escala 0,5 McFarland. Partiendo de la suspensión 0,5 McFarland se introduce un hisopo para realizar una siembra masiva en agar Mueller Hinton y colocar posteriormente una tira de antibiótico que posee 16 concentraciones de un mismo antibiótico (0.002 – 32 ug/ml.) y se observan en la tabla 3

Diluciones en Epsilometría (E test - µg/ml.)	
Meropenem	32, 24, 16, 12, 8, 6, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.38, 0.25, 0.19, 0.125, 0.094, 0.064, 0.047, 0.032, 0.023, 0.016, 0.012, 0.008, 0.006, 0.004, 0.003, 0.002

Tabla 3. Concentraciones para carbapenémicos en epsilometría. En rojo se observan las diluciones que aplican dentro del rango de resistentes. En amarillo las MIC intermedias y en azul las MIC que aplican para sensibilidad por puntos de corte CLSI 2017.

La lectura se realiza después de 16 a 24 horas de incubación a 35°C. La MIC se lee en aquella concentración de antibiótico en donde se observa que la elipse de inhibición corta la tira. El resultado se registra en µg/ml y se interpreta como sensible, intermedio o resistente de acuerdo a CLSI. (Microbe online, 2017)

9. Resultados

En el presente estudio se incluyeron 236 aislamientos de Enterobacterias provenientes de pacientes que asistieron al Hospital Universitario San Ignacio en un periodo de tiempo comprendido entre noviembre de 2013 y diciembre de 2016. Entre el total de pacientes se encontró 80 mujeres (34%) y 156 hombres (66%). La media de edad de los pacientes fue 57 años, presentándose una edad mínima de 9 días y una edad máxima de 96 años.

El origen de las muestras según el servicio prestado fueron 36% en hospitalización general, 29% en el servicio de urgencias, 17 % en unidad de cuidados intensivos y unidad de recién nacidos (UCIs) y 12% en consulta externa

Como se observa en el grafico 1, de los 236 aislamientos, 177 correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* (75%) y en segundo lugar *E. cloacae* con 18 aislamientos (8%), *E. aerogenes* y *E.coli* con 14 (6% cada uno); se observaron algunos casos en *K.oxytoca*, *C. freundii*, y *S. marcescens*.

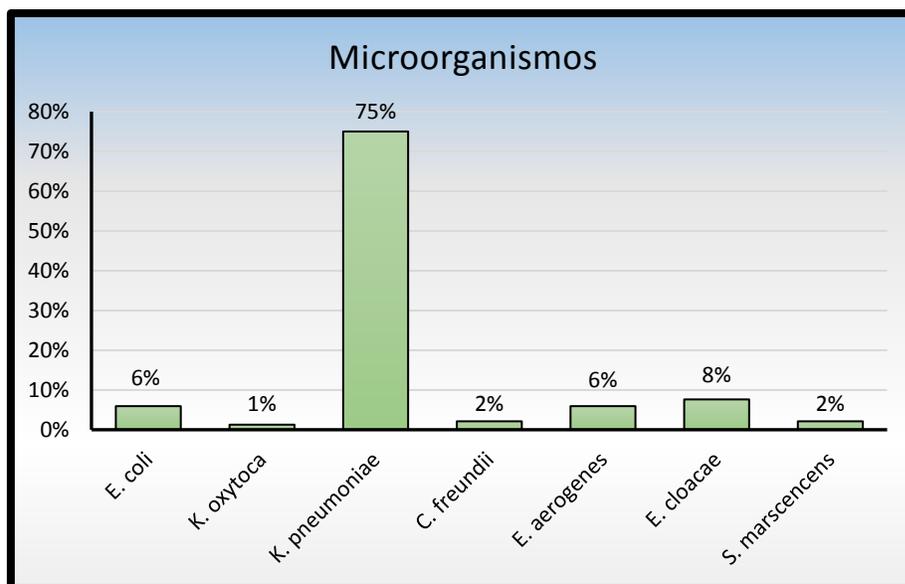


Gráfico 1. Distribución porcentual de microorganismos resistentes a carbapenémicos

Dichos microorganismos fueron recuperados en su mayoría de muestras de orina (32%), seguido de hisopado rectal (24%), sangre (14%), secreciones y abscesos 9%, materia fecal (7%), muestras respiratorias (6%), y por último 8 casos en líquidos corporales, 5 casos en Tejido (2%) y 3 en hueso (1%). Gráfico 2.

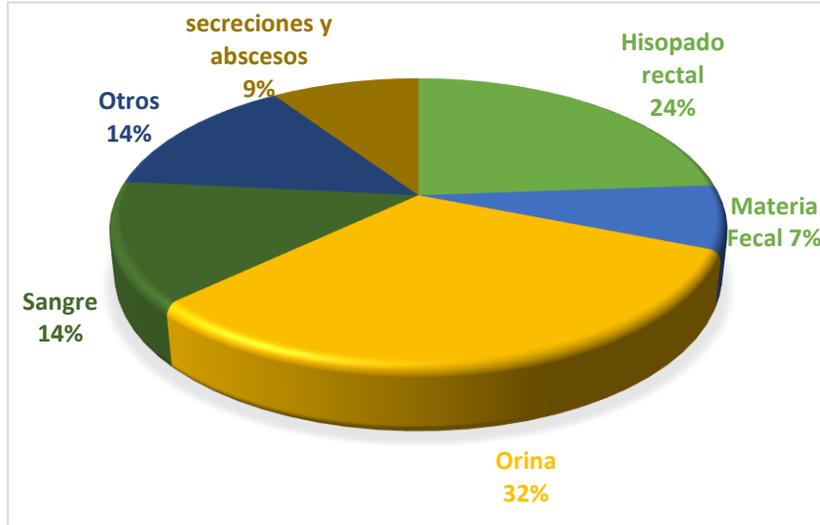


Grafico 2. Distribución porcentual de muestras biológicas positivas para enterobacterias resistentes a carbapenémicos

9.1 Perfil de resistencia a carbapenémicos por Enterobacterias

De acuerdo a los carbapenémicos estudiados, ertapenem presentó el mayor porcentaje de resistencia (100% con respecto a las 236 cepas; seguido de doripenem y meropenem.

Grafico 3.

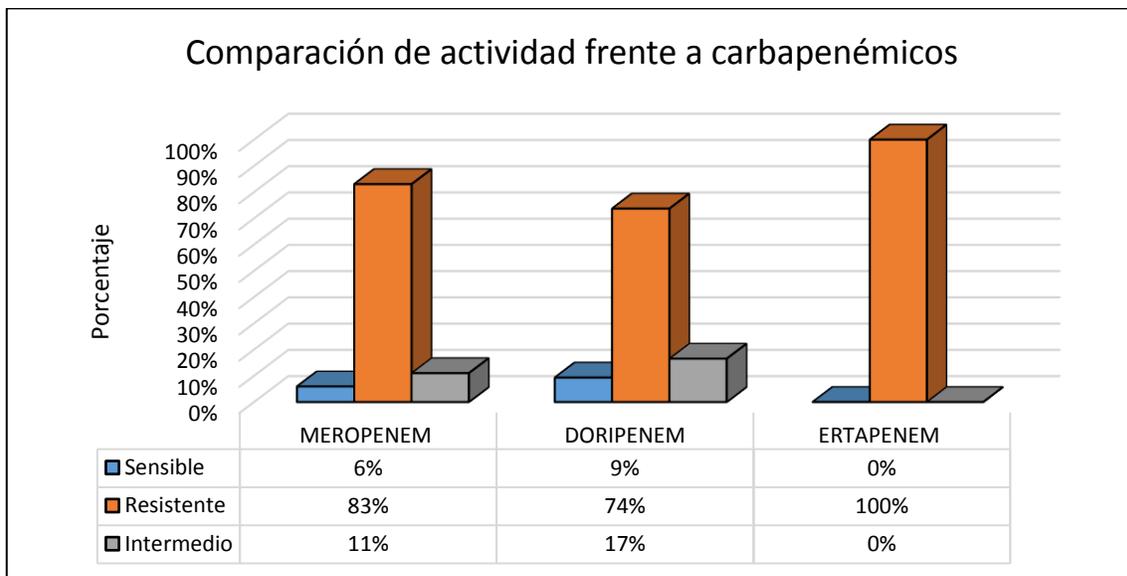


Grafico 3. Distribución porcentual del perfil de resistencia de las Enterobacterias en estudio

En la tabla 4, se observan los porcentajes obtenidos de la MIC para antibióticos carbapenémicos evaluados por medio de la prueba de microdilución.

En los aislamientos expuestos al evaluar la distribución de la MIC a carbapenémicos, se documentó para Meropenem, que el 62% de ellos presentó resistencia con MIC > 8 µg/ml. En doripenem se presentó un porcentaje de 74% de cepas resistentes con una MIC >2 µg/ml y en ertapenem se encontró un porcentaje de 87% de resistencia con un MIC > 4 µg/ml.

POR MICROSCAN						
Concentraciones antibiótico (ug/ml.)	MIC MEROPENEM		MIC ERTAPENEM		MIC DORIPENEM	
	n	%	n	%	N	%
<0.5	0	0	0	0	2	0,85
<1	12	5,08	0	0	0	0
1	0	0	0	0	20	8,47
2	25	10,59	8	3,39	39	16,53
>2	0	0	0	0	175	74,15
<2	0	0	0	0	0	0
4	27	11,87	23	9,75	0	0
<4	0	0	0	0	0	0
>4	0	0	205	86,87	0	0
8	24	10,17	0	0	0	0
>8	147	62,28	0	0	0	0

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada carbapenémicos evaluado por microdilución. En amarillo los mayores porcentajes encontrados.

Precisamente una de las limitantes que tiene el utilizar el método de microdilución en los carbapenémicos es que, al estar resistente, en la mayoría de los casos se presenta por encima de la última concentración de antibiótico, muchas veces, no pudiendo conocer realmente cual es la MIC del antibiótico.

En el caso puntual de meropenem, se reconoce en diversos artículos la importancia de conocer la MIC real para toma de decisiones con respecto a su uso en combinación con otros antibióticos. Es por ello que a los aislamientos se les realizó prueba de epsilometría para meropenem; de tal manera que conociéramos a pesar de estar resistente el microorganismo, cuál era su MIC real. Tabla 5.

POR E TEST		
Concentraciones antibiótico (ug/ml.)	MIC MEROPENEM	
	n	%
≤1	24	10,16
1	17	7,20
1.5	24	10,16
2	19	8,05
3	6	2,54
4	16	6,78
6	4	1,69
8	6	2,54
12	13	5,51
16	6	2,54
24	6	2,54
32	3	1,27
≥32	92	38,98

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (MIC) para meropenem evaluado por Epsilometría. En amarillo diluciones que fueron comparadas con los resultados de Microdilución.

Se observa en la tabla 5, un porcentaje de resistencia de 38% de las cepas teniendo MIC superiores a 32µg/ml. Pero nos parece relevante reportar el comportamiento de las MIC entre 2µg/ml y 16 µg/ml., límite importante que se encuentra para algunos autores en terapia combinada con meropenem resistente para enterobacterias.

9.2. Perfil de resistencia a Colistina, tigeciclina y fosfomicina

El antibiograma para los aislamientos se realizó utilizando el panel de Ref. NC 66 de MicroScan®, las diluciones del antibiótico para la lectura de la MIC correspondieron para colistina de 2 y 4µg/ml, fosfomicina de 64 µg/ml y tigeciclina de 1 y 2 µg/ml.

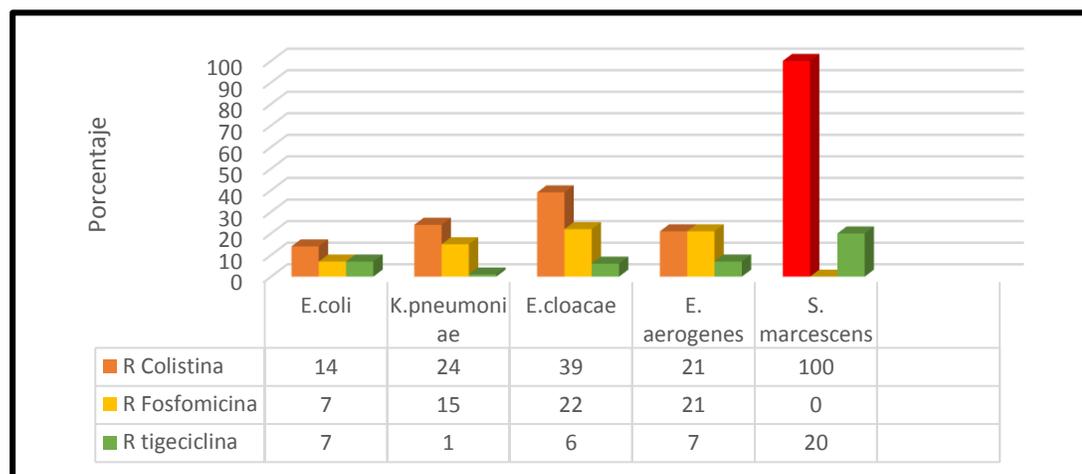
Para colistina, fosfomicina y tigeciclina, se encontró un 23%, 15% y 1% de resistencia respectivamente del total de muestras estudiadas. Las MIC con mayor porcentaje para cada antibiótico fueron MIC<2µg/ml (73,31%), en el caso de colistina, MIC<64µg/ml.(85,17%) en el caso de fosfomicina y MIC<1 µg/ml (97,98%) para tigeciclina.

En la tabla 3, se observan los porcentajes obtenidos de la MIC para antibióticos colistina, fosfomicina y tigeciclina por medio de la prueba de microdilución.

MIC POR MICRODILUCION						
Concentraciones antibiótico (ug/ml.)	MIC COLISTINA		MIC FOSFOMICINA		MIC TIGECICLINA	
	n	%	n	%	N	%
≤1	0	0	0	0	227	97,98
1	0	0	0	0	1	0,49
≤2	173	73,31	0	0	1	0,49
2	1	0,42	0	0	0	0
4	6	2,54	0	0	0	0
>2	0	0	0	0	7	1
>4	56	23,73	0	0	0	0
<64	0	0	201	85,17	0	0
>64	0	0	35	14,83	0	0

Tabla 3. Distribución de Concentración mínima inhibitoria (MIC) para Colistina, Fosfomicina y Tigeciclina evaluado por microdilución. En verde las MIC con mayor porcentaje

Teniendo en cuenta el microorganismo, 7 de 18 *E. cloacae* fueron resistentes a colistina (39%) y 4 de 18 casos de este mismo microorganismo fueron resistentes a fosfomicina (22%). El mayor porcentaje de casos para resistencia a tigeciclina fue en *Serratia marcescens* (20%). Grafico 4.



Gráfica 4: Perfil de resistencia por microorganismo frente a colistina, fosfomicina y tigeciclina. Barra de color rojo es resistencia intrínseca.

Ninguno de los 5 casos de *Citrobacter freundii* presento resistencia a alguna de las 3 moléculas evaluadas. Por el contrario, se encontraron dos casos de resistencia a las 3 moléculas en *Klebsiella pneumoniae*, uno de los casos a partir de orina y el otro caso un

paciente colonizado al que se le había tomado hisopado rectal.

Llama la atención que hubo varios casos de resistencia a estas moléculas a partir de muestras de hisopado rectal para búsqueda de colonizantes de microorganismos resistentes. 7 casos resistentes a colistina, 9 casos resistentes a fosfomicina y 5 casos resistentes a tigeciclina.

En el caso de *Serratia spp.* este género es resistente intrínsecamente a colistina, por lo tanto, se grafica con barra diferente, ya que no se tiene en cuenta en los resultados de resistencia.

10. Discusión

En los últimos años se ha evidenciado el aumento exponencial de bacterias multirresistentes a nivel intrahospitalario, representado en la actualidad un problema de salud pública que cada vez más induce a los clínicos y en general al personal en salud a buscar nuevas alternativas terapéuticas, diagnósticas y de control frente a estos microorganismos tan difíciles de combatir. La capacidad de estos microorganismos para adquirir mecanismos de resistencia frente a los antibióticos ha llevado a fallas terapéuticas y a un aumento en la morbi-mortalidad en los pacientes.

De los microorganismos que se reportan con actividad multiresistentes se encuentran las Enterobacterias, las cuales a lo largo de los años han adquirido resistencia a cada uno de los grupos de antibióticos que salen al mercado para combatirlos; es por ello, además, el interés en la búsqueda activa y constante de resistencia tanto en términos de infección como de colonización por estos microorganismos. Los carbapenémicos, por ejemplo, durante muchos años fueron el frente de ataque para las Enterobacterias que adquirían mecanismos de resistencia a algunas cefalosporinas de tercera o cuarta generación, sin embargo, en este momento la forma tan apresurada de adquisición de resistencia a estos betalactámicos es un motivo de preocupación. La tasa de mortalidad en infecciones por Enterobacterias resistentes a carbapenémicos está entre 30 y 70%; las opciones terapéuticas son reducidas, usualmente en manejo con terapia combinada, pero sin estudios clínicos suficientes que establezcan la mejor opción terapéutica.

Observar el comportamiento de carbapenémicos en Enterobacterias y además, su perfil de resistencia frente a antibióticos alternativos en caso de resistencia a éstos, fue el objetivo del presente estudio.

Perfil de resistencia a carbapenémicos por Enterobacterias

En el estudio, se encontraron los siguientes resultados de resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias según el servicio prestado en el hospital: aislamientos de UCI con un 18% de casos, encontrándose por debajo de los porcentajes nacionales del último reporte de vigilancia epidemiológica, donde se presenta un incremento de resistencia a carbapenémicos alcanzando un 20% en el 2015. En el servicio de hospitalización general se encontró un porcentaje de 40%, muy por encima de los reportes nacionales donde el

promedio se encuentra alrededor de 21,5%. (GREBO, 2016). Indistintamente del servicio, los reportes indican que *Klebsiella pneumoniae* es la enterobacteria con mayor número de casos de resistencia a carbapenémicos; llama la atención que nuestros datos encontramos que el 75% de los aislamientos de un periodo de 3 años correspondieron a este microorganismo. Sin embargo, preocupa evidenciar un 6% de *E. coli*, 14% de *Enterobacter spp.*, algunos casos de *Citrobacter freundii* (5 casos) y otros 5 casos de *Serratia marcescens* cuando hace unos 5 años en el Hospital donde se desarrolló el estudio no se encontraban casos de *Enterobacter spp.* ni *Serratia spp.* Pues, la preocupación es nacional, ya que la resistencia a carbapenémicos reportada para el año 2015 en UCI de *Enterobacter cloacae* fue de 15,3% y *S. marcescens* de 16,4% cuando en años anteriores no superaban el 10%. (GREBO, 2016)

Ahora, en cuanto a tipo de carbapenémicos estudiado, se evidencia que ertapenem es el mejor marcador de resistencia a carbapenémicos con un 100% de resistencia independiente al microorganismo. Un 83% fueron resistentes a Meropenem y un 74% resistente a doripenem. En un estudio realizado por Vanegas y colaboradores en el 2016, se observó altos porcentajes de resistencia a ertapenem, imipenem y meropenem (94%, 92% y 89,3%, respectivamente); donde *Klebsiella pneumoniae* fue la bacteria más frecuente (47,4%), seguido por *Enterobacter cloacae* (40,7%). (Vanegas, 2016). La alta resistencia a ertapenem en aislamientos clínicos de *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*, se asocia al parecer con deficiencia de porinas en combinación con la expresión de β -lactamasas, con una variedad de deleciones, mutaciones puntuales, y mecanismos desconocidos que conducen a la pérdida de expresión de porinas. (Doumith, 2009). Tanto así, que existen posiciones bastante drásticas, viendo el comportamiento de ertapenem, que sugieren que cuando se tengan aislamientos de *K. pneumoniae* intermedia o resistente a ertapenem debe considerarse resistentes a todos los otros carbapenémicos, independientemente de los resultados de susceptibilidad. (Simona, 2005) (G.L. Daikos, 2011)

Con respecto a la MIC de carbapenémicos, es conocida la limitación de las herramientas usualmente utilizadas en el laboratorio clínico para pruebas de susceptibilidad *in vitro*, donde tan solo podemos observar el comportamiento de hasta 4 concentraciones de un carbapenémicos utilizando Microdilución comercial y hasta 16 diluciones si utilizamos

epsilometría, de tal manera, que para el estudio se realizaron ambas metodologías en el caso de meropenem, para acercarnos a aquellas MIC del antibiótico que aunque siendo interpretadas como resistente, según la literatura es posible utilizar *in vivo* en combinación.

Se observó que por microdilución los mayores porcentajes se encontraban en el límite superior de lectura de la MIC, es decir, MIC >8µg/ml., MIC>2µg/ml. y MIC >4µg/ml. para meropenem (62%), doripenem (74%) y ertapenem (87%), respectivamente.

Desarrollamos la MIC real solamente de meropenem ya que clínicamente hablando es el único antibiótico que se puede utilizar en altas dosis cuando su MIC está entre 2µg/ml y 16 µg/ml. Tan solo realizando el análisis por modelo estadístico de acuerdo diagnóstico para meropenem, del 62% de casos con MIC>8 µg/ml. un 29.6% de dichos casos pueden tener una MIC precisa por el método de epsilometría, distribuido entre MIC que van de 2 µg/ml. a 16 µg/ml. (2,3,4,6,8,12,16 ug/ml.), de tal manera, que se ofrece una opción en un 29% de casos de resistencia a meropenem que el clínico pueda utilizar meropenem en combinación con otro u otros antibióticos.

Hay estudios, que precisan que el tratar al paciente con MIC altos de meropenem en monoterapia no es conveniente o por lo menos tienen un alto porcentaje de falla terapéutica. Por ejemplo, Hirsch, EB. en sus estudios realizados en 2010, observo que la eficacia terapéutica de carbapenémicos en combinación aumenta de 29% para un MIC > 8 µg /ml, a 60% para MIC de 8 µg / ml., y a 69% para una MIC de 4 µg / ml. o menos. Pero cuando 15 pacientes fueron tratados con monoterapia con carbapenémicos tuvo sólo un 40% de éxito (6/15pacientes). (Hirsch, 2010)

Quizás el más grande estudio realizado sobre el tema, es el de Tumbarello en el 2015; en él participaron 661 pacientes, y se analizó el desenlace clínico tratando a los pacientes con meropenem solo, y en combinación con tigeciclina y colistina; El porcentaje de mortalidad usando meropenem en combinación siempre fue menor independientemente del tipo de infección. Las combinaciones independientemente de ser con tigeciclina o colistina, 20% de mortalidad usando meropenem vs. 40% mortalidad cuando no se combinó con meropenem. Cuando las cepas son resistentes a colistina se ve una clara diferencia entre usar meropenem, 26% de mortalidad cuando se usa meropenem vs. 60% mortalidad cuando no se usa meropenem. Cuando la MIC de meropenem es ≤8 µg/ml se vio un 12% mortalidad con meropenem y 48% sin meropenem; y cuando la MIC es ≥16 µg/ml un 27% de mortalidad con meropenem y un 30% sin su uso. (Tumbarello, 2015)

Perfil de resistencia a colistina por Enterobacterias

Con respecto al comportamiento *in vitro* de las Enterobacterias a colistina, se encontró un porcentaje de resistencia del 100% en *S. marcescens*, seguido de *E. cloacae* (39%), y *Klebsiella pneumoniae* (24%). Sin embargo del total de cepas evaluadas el microorganismo mayormente aislado fue *K. pneumoniae*.

La resistencia a la colistina se produce como resultado de la presión selectiva y transmisión horizontal. Aunque el mecanismo de resistencia subyacente es claro en la actualidad, la modificación del lipopolisacarido a través de diversas rutas se ha sugerido como la causa de la resistencia a la colistina en *K. pneumoniae*. En general, a nivel Latinoamérica el porcentaje de resistencia no supera el 15% de microorganismos productores del gen *mcr-1*. (Rapoport, 2016)

Nuestra resistencia a colistina, en realidad, supera lo encontrado en la literatura, es el caso de estudios realizados por Tumbarello y col. en el 2012 en donde se obtuvo *in vitro* una resistencia de 12% de colistina, obteniéndose mayores resistencias cuando el gen de resistencia a los carbapenémicos era KPC-3 para colistina.

La microdilución en caldo es el método de referencia principal por el cual se evalúa el MIC de colistina, no obstante, se han reportado complicaciones referentes a éste método; la colistina por su carga molecular se adhiere al material plástico utilizados para la fabricación del panel, efecto mayormente evidenciado en concentraciones bajas del antibiótico, que puede significar una variabilidad significativa en los resultados arrojando falsos resistentes. Los resultados de este estudio frente al reporte de 23% de resistencia a colistina pueden estar soportados por posibles falsos resistentes inherentes a la molécula y los sistemas empleados *in vitro*. (D., 2003) (K., 2015)

Perfil de resistencia a fosfomicina por Enterobacterias

En cuanto a fosfomicina, se obtuvo una resistencia de 15% de los aislamientos presentando el mayor porcentaje *Enterobacter spp.* (3/14 casos). La resistencia a fosfomicina en estudios europeos ha sido raro, sin embargo se ha descrito que la resistencia a este medicamento puede desarrollarse rápidamente cuando es usado como monoterapia (Endimiani, 2010), al mismo tiempo se han reportado cepas resistentes a fosfomicina *in*

vitro por diferentes mutaciones cromosomales, sin embargo, se ha reportado que la resistencia a fosfomicina desde aislamientos clínicos es poco común ya que no comparte resistencia cruzada con otras clases de antibióticos. (Karaiskos, 2014) E, 2017, se publicó un estudio donde se observó el perfil de fosfomicina a partir de 106 muestras de orina, obteniéndose un 82% de sensibilidad para *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, muy cercano a lo encontrado en nuestros resultados. (Mezzatesta, 2017)

Por el contrario, la evaluación de actividad frente a colistina, fosfomicina, y tigeciclina en un estudio realizado en Reino Unido frente a 81 aislamientos de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos, mostró que la fosfomicina presentó actividad contra 49/81 aislamientos (60,5%), los microorganismos estudiados incluyeron *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* y *Klebsiella spp.* (David M. Livermore, 2011)

Perfil de resistencia a tigeciclina por Enterobacterias

En los EE.UU., la tigeciclina es por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobada para el tratamiento de infecciones de tejidos blandos, infecciones intrabdominales complicadas y neumonía adquirida en la comunidad. En general no presenta altos porcentajes de resistencia, sin embargo, el que se preséntense ha visto asociado mayormente a que se trate como monoterapia. (Van Duin, 2013)

Nuestro porcentaje de resistencia a tigeciclina fue de 1%; 7 casos intermedios y un caso de *K. pneumoniae* resistente. Los casos intermedios fueron por *Klebsiella pneumoniae* en su mayoría, un caso en *Serratia marcescens* y un caso en *Enterobacter cloacae*.

Coincidiendo con esto, se han reportado estudios mostrando la actividad de tigeciclina contra Enterobacterias resistentes a carbapenémicos en donde más del 90% de los aislamientos han sido sensibles. (Hurtado, 2012). Tumbarello en el 2012 encuentra solo un 9% de resistencia a tigeciclina y todos los aislamientos portaban gen KPC-2. (Tumbarello M. , 2012). Por el contrario, Livermore, encontró que tigeciclina fue activa contra 38/81 aislamientos, es decir, solo en el 48% de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos principalmente portando el gen KPC-2 (David M. Livermore, 2011)

Mucho se ha escrito en cuanto a que moléculas como colistina, tigeciclina, gentamicina, etc... tienen un efecto sinérgico entre sí o combinadas con carbapenémicos. Se habla de porcentajes de mortalidad asociada a monoterapia vs. terapia combinada. Tumbarello y col. estudio un régimen de diferentes combinaciones antibióticas constituida por gentamicina

(GM), colistina (COL), tigeciclina (TGC), y meropenem (MEM) asociándose con altas probabilidades de supervivencia, obteniéndose los siguientes resultados en cuanto a: TGC y COL= 30.4%; TGC y GM= 50%; COL y GM=57%; TGC y COL y MEM= 12.5%; TGC y GM y MEM= 16.6%. De tal manera que al parecer la mejor combinación sería TGC y COL y MEM. Ahora con respecto a las MIC de los carbapenémicos para la combinación en el estudio y al igual que en otros estudios se ve que las combinaciones de colistina o tigeciclina con meropenem desde que meropenem tenga una MIC $\leq 4\mu\text{g/ml}$ reducen la posibilidad de muerte; pero también en el estudio se encontraron casos en los cuales el paciente sobrevivió con TGC + COL + MEM con MIC ≥ 16 . (64.7% de supervivencia. (Tumbarello M. , 2012)

El problema actual por el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias expone a los clínicos un reto para tratar este tipo de infecciones. Los clínicos se encuentran ahora en una búsqueda de opciones farmacéuticas para esta problemática, siendo obligados a revisar medicamentos históricamente utilizados, así como buscar estrategias para optimizar los regímenes de dosificación. (Haley J. Morrill, 2015) A nivel de laboratorio paralelamente se buscan metodologías que apoyen al clínico para iniciar un tratamiento. Actualmente se cuenta con métodos tanto automatizados como manuales aportando al clínico una interpretación del perfil de susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico que se quiere emplear para el tratamiento. El montaje manual del antibiograma por el método de E-test, que ha sobrevivido a la evolución tecnológica al igual que otros métodos se convierte en una buena estrategia para acercar al clínico a la real MIC de los carbapenémicos a pesar de ser resistente, y a la par dando un resultado de moléculas alternativas como colistina, tigeciclina o fosfomicina. (Christine D. 2013) (Van Belkum, A. 2013)

11. Conclusiones

- El porcentaje de resistencia encontrada en las Enterobacterias estudiadas a colistina, fosfomicina y tigeciclina son 23%, 15% y 1% encontrándose el porcentaje más alto de resistencias en *Klebsiella pneumoniae*. Del total de Enterobacterias estudiadas.
- Los microorganismos que tienen mayor capacidad de resistencia a colistina y fosfomicina son *Enterobacter spp.* y a tigeciclina fue *Serratia marcescens*.
- *Citrobacter freundii* no presentó resistencia a colistina, fosfomicina ni tigeciclina.
- Ertapenem presentó el mayor porcentaje de resistencia (100%), meropenem presentó un 83% de cepas resistentes y siendo el menor carbapenémicos que presentó resistencia, en doripenem se reportó un 74% de cepas resistentes.
- Las MIC con mayor porcentaje para cada antibiótico fueron MIC<2µg/ml. en el caso de colistina, MIC<64µg/ml. en el caso de fosfomicina y MIC<1 µg/ml. para tigeciclina.
- Se encontraron dos casos de resistencia a las 3 moléculas en *Klebsiella pneumoniae*.
- La técnica de epsilometría presenta un 29% de posibilidades de manejo terapéutico para meropenem en combinación ya que se encontraron 70 casos en los que la MIC estaba entre 2µg/ml. y 16µg/ml. y los cuales por el método de microdilución no se hubiesen podido dilucidar.

12. Recomendaciones

- Institucionalmente: A raíz de los resultados de este estudio, se toma la decisión de realizar epsilometría del antibiótico meropenem, a todos aquellos aislamientos de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos y realizar el reporte de la MIC obtenida por este método al clínico.
- Realizar estudios moleculares a los aislamientos resistentes a colistina, en búsqueda del gen *mcr-1*, ya que ayudaría a verificar si dicho porcentaje de resistencia es real o es producto de falsos resistentes por las limitaciones de las técnicas *in vitro*.
- A partir de los 61 casos resistentes a colistina, realizar estudio de casos y controles que mida el impacto de la resistencia a colistina por Enterobacterias resistentes a carbapenémicos.
- Realizar un estudio de clonalidad con PFGE porque la presencia de clones puede explicar la alta resistencia a la colistina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abiola O. Olaitan, S. M.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology* .
- Agila K. Pragasam, C. S. (2017). Molecular Mechanisms of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Causing Bacteremia from India—A First Report. *Frontiers in Microbiology*, 1-9.
- Alejandro Ruiz Sánchez, R. C. (2003). *Serratia marcescens*: De patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas . *Bioteología* , 31-37.
- Christine D. Steward, J. M. (2013). Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 351–358.
- Alex van Belkum, W. M. (2013). Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018–2024.
- Andrea Endimiani, G. P. (2010). In Vitro Activity of Fosfomicin against blaKPC-Containing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Including Those Nonsusceptible to Tigecycline and/or Colistin . *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 526-529.
- Borna Mehrad, N. M. (2015). Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. *Chest*, 1413–1421.
- Celine Herra, F. R. (2010). *Serratia marcescens*. *Infectious Disease and Antimicrobial Agents*.
- Coralith García, L. A. (2012). Enterobacterias productoras de -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Peruana*, 163-169
- Christine D. Steward, J. M. (2013). Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 351–358.
- Curcio, D., & Istúriz, R. (2006). Tigeciclina, la primera gliciliciclina. *Rev Panm Infectol*, 35-42
- Cristina E. Cabrera, R. F. (2011). *Epidemiology of nosocomial bacteria resistant to antimicrobials. Colombia médica*, 117-125.
- D., C. (2003). Antimicrobial Susceptibility Testing of Carbapenems: Multicenter Validity Testing and Accuracy Levels of Five Antimicrobial Test Methods for Detecting Resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *J Clin Microbiol.* , 351-358.

- David M. Livermore, M. W. (2011). What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 415-419.
- David van Duin Keith S. Kaye, E. A. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 115-120.
- Dr Jian Li, P. R. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 589-601.
- Doumith, M. J. (2009). Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 659-667.
- Elso Manuel Cruz Cruz, E. M. (2009). Modelación molecular de cuatro penicilinas: bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, ampicilina y amoxicilina. *MediSur*.
- Endimiani, A. (2010). In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing Klebsiella pneumoniae isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 526-529.
- Étienne Ruppé, P.-L. W. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals Intensive Care*.
- Falagas , M., & Kastoris, A. (2009). Fosfomicina para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos no fermentadores Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos: una revisión sistemática de microbiológico, animales y estudios clínicos. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 111-120.
- García, P., & Porte, L. (2017). *Estudio de susceptibilidad a tigeciclina: Influencia del agar*. Obtenido de <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v26s1/art03.pdf>
- GREBO, B. (2015). Número 7 . GREBO, 1-42.
- G.L. Daikos, A. M. (2011). Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clinical Microbiology and Infection*, 1135–1141.
- Gómez, J. G. (2007). Infección urinaria por Escherichia coli multirresistente: impacto clínico y nuevas perspectivas. *Medicina Clínica* , 412-413.
- Gómez-Gamboa, L. P.-M.-G. (2014). Carbapenemasas KPC en Enterobacteriaceae aisladas en un Hospital de Maracaibo, Venezuela. *Kasmera*, 89 - 104. Hassan Ahmed Khan, A. A. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 509-514.
- Haley J. Morrill, J. M. (2015). Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infection Disease*, 1-15

- Hirsch, E. (2010). Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*, 1119-1125.
- Hurtado, I. (2012). Experience with tigecycline compassionate use in pediatric patients infected with carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. chilena Infectol.*, 317-321.
- Jaime Alberto López Vargas, L. M. (2009). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATREIA*, 157-165.
- James B. Kaper, J. P. (2004). PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *NATURE*, 123-140.
- Janet A. Hindler, R. M. (2013). Bacilli, Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative. *Journal of Clinical Microbiology*, 1678 – 1684.
- Jesús Oteo, E. C.-B.-G. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 666-670.
- Jesús Rodríguez-Baño, J. M. (2014). Treatment of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 49-55.
- Jorge Calvo, L. M.-M. (2008). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* , 44–52.
- Jóse David Tafur, J. A. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas . *Centro interacional de investigaciones médicas* , 217-226.
- K., D. (2015). Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, 4625-4630.
- Karaiskos, I. (2014). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.*, 1351-1370.
- Kastoris, A. (2010). Synergy of fosfomycin with other antibiotics for Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* , 2850-2858.
- Konstantina Dafopoulou, O. Z. (2015). Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *American Society for Microbiology*, 4625–4630.

- LÁZARO, L. I. (2003). Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. *UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT DE BIOLOGIA DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA*.
- Liang Chen, B. M. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, 686–696.
- Luke F Chen, D. J. (2012). Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infectio and Drug Resistance* , 133–141.
- M. Gobernado, C. A. (2007). Ertapenem. *Rev Española de Quimioterapia* , 277-299.
- María Magdalena Rodríguez Palacios, V. T. (2015). Caracterización clínica y epidemiológica de brote a *Serratia marcescens* en una Unidad de CuidadoIntensivo Pediátrico. *Hospital Nacional de Itaugua*, 1-15.
- Marchetti María Laura, E. J. (20 de Noviembre de 2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de flujo Impacto en la multirresistencia . Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11280/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Manuel Cué Brugueras, M. M. (2005). Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia*.
- María Carmen Fariñas, L. M.-M. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , 402-409.
- Mezzatesta, M. (2017). In vitro activity of fosfomycin trometamol and other oral antibiotics against multidrug-resistant uropathogens. *Int J Antimicrob Agents.*, 763-766.
- Michele Yamamoto, A. E.-V. (2014). Treatment for infections with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: what options do we still have? *Critical Care*.
- Microbe online*. (30 de Enero de 2017). Obtenido de <https://microbeonline.com/e-test-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-results-and-interpretations/>
- Monge, K. M. (2013). CARBAPENÉMICOS: TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXX*, 599 - 605.
- Munoz-Price, L. S. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, 785–796.
- Natalia Andrea Maldonado, M. I. (2014). Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica* .
- Neil Gupta, B. M. (2011). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and

Prevention. *HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY*, 60-67.

Pai H, Kang C, Byeon K, Lee W, Park H, Kim E et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections cause by AmpC-type- β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 3720-8.

Papp-Wallace, K. M. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 4943–4960.

Patricia A. Bradford, K. M. (2016). Correlation of β -Lactamase Production and Colistin Resistance among Enterobacteriaceae Isolates from a Global Surveillance Program. American Society For Microbiology, 1385-1392.

Patrice Nordmann, A. J. (2016). Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Disease*, 1038–1043.

Patricia Salgado, F. G. (2015). Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. *Revista Española de Quimioterapia*, 12-15.

Pilar Sánchez-B, Rafael Muñoz-M. , & Norma P. Gutiérrez-M. (17 de Agosto de 2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos. Obtenido de Ediciones Universidad Cooperativa de Colombia: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/94>

Rapoport, M. (2016). First Description of mcr-1-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* , 4412-4413.

Rivas KB, R. M. (2002). CEFALOSPORINAS. DE LA PRIMERA A LA CUARTA GENERACIÓN. *Revista de la Facultad de Medicina.*

S. Dinicola, S. D. (2014). N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2942-2948.

Simona, B. (2005). Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection. *Antimicrob Agents Chemother.*, 3018–3020.

Suescún, A. V. (2006). Genes involved in fimbrial biogenesis affect biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. . *Biomédica*, 528-537.

Stefan Schwarz, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but Transferable resistance to colistin: a new but. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2066-2070

Tumbarello, M. (2012). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.*, 943-950.

- Tumbarello, M. (2015). Infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother.*, 2995.
- Tzouvelekis, L., & Markogiannakis, A. (2012). Carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias : una creciente crisis de Global Dimensiones. *Clin Microbiol Rev* , 682-707.
- Van Duin, D. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* , 115-120.
- Vademecum. (24 de Abril de 2016). Vademecum. Obtenido de Vademecum: <http://www.vademecum.es/principios-activos-fosfomicina-j01xx01>
- Vademecum. (9 de Mayo de 2016). Vademecum. Obtenido de Vademecum: <http://www.vademecum.es/principios-activos-tigeciclina-j01aa12>
- Vademecum, V. (1 de Agosto de 2016). Vademecum. Obtenido de Vademecum: <http://www.vademecum.es/principios-activos-colistina-j01xb01>
- W. Eugene Sanders JR, C. C. (1997). Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. *CLINICAL MICROBIOLOGY*, 220–241.
- Young-Mi Ah, A.-J. K.-Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8–15.
- Zárate, M., & Serruto, G. (2010). Actividad in vitro de la tigeciclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. multirresistentes. Comparación de diferentes métodos de evaluación. *Rev. argent. microbiol.*