

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE
POSGRADO

PRUEBA ESBL DEL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK® 2 DE BIOMÉRIEUX
COMO HERRAMIENTA PARA LA DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO BLEE EN
CEPAS DE *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. Y
Klebsiella aerogenes AISLADAS EN EL HOSPITAL MÉXICO DURANTE EL AÑO
2021

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar
al grado y título de Especialista en Bacteriología Médica

ARIEL MIRANDA PADILLA
B44315

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-82-2023

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 18 de enero de 2023 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante Ariel Miranda Padilla carné #B44315, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Bacteriología Médica. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Heylin Estrada Murillo, Esp., quien preside y tutora, Randall León Solís, Esp. y Cristina García Marín, Esp., lectores.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Prueba ESBP del sistema automatizado Vitek@2 de Biomérieux como herramienta para la determinación del fenotipo BLEE en cepas de Enterobacter spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Morganella spp. y Klebsiella aerogenes aisladas en el Hospital México durante el año 2021"

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [X] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 17:40 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Heylin Estrada Murillo (Quien preside), Cristina García Marín, Randall León Solís, and Ariel Miranda Padilla (Estudiante).

Observaciones: Se acuerda otorgar mención de honor

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita
Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

Tabla de contenidos

Resumen	iv
Lista de cuadros	v
Lista de figuras	vi
Lista de abreviaturas	vii
Introducción.....	1
Antecedentes	1
Pregunta de investigación.....	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
Justificación.....	14
Materiales y métodos	15
Resultados	18
Discusión y Conclusiones.....	26
Limitaciones y Recomendaciones.....	35
Referencias bibliográficas.....	36
Anexos	39

Resumen

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) corresponden a enzimas catalíticas capaces de hidrolizar el enlace amídico del anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas, con excepción de las cefamicinas; y los monobactámicos; pero no los carbapenémicos. Su acción es inhibida clásicamente por el ácido clavulánico, característica de la cual se aprovecha la mayoría de metodologías utilizadas para su detección, siendo estas validadas casi de manera exclusiva para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca*. Particularmente, la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux emplea una combinación de oximinocefalosporinas de tercera y cuarta generación únicas y con ácido clavulánico para determinar un resultado negativo o positivo con base en la reducción cuantitativa o no del crecimiento a través de un lector óptico. No obstante, estudios previos destacan la capacidad diagnóstica de esta técnica para la detección de BLEE en otros *Enterobacterales*. Por lo que, para evaluar el uso extendido de este método a otros miembros del orden, se recolectaron 97 aislamientos clínicos de la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México durante el 2021 identificados como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp. y *Klebsiella aerogenes* sospechosos de portar BLEE. Se determinó el fenotipo BLEE mediante la prueba automatizada y el estándar de caracterización fenotípica definido por las pruebas epsilométricas y de variante de sinergia de doble disco. Incongruencias fueron resueltas mediante PCR dirigida a la detección de CTX-M. Se obtuvo una concordancia casi perfecta ($\kappa = 0.80$, $IC_{95\%} 1.00-0.60$), una sensibilidad del 97% y una especificidad del 88% (VPP = 79% y VPN = 98%) al comparar ambos resultados. En conclusión, la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux es una herramienta de cribado tiempo y costo efectiva en la determinación de este mecanismo de resistencia. A su vez, un algoritmo diagnóstico es propuesto para ser integrado en la rutina del laboratorio en función de garantizar el máximo desempeño y veracidad del resultado BLEE en estos microorganismos que permita extrapolar decisiones terapéuticas y epidemiológicas.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Clasificaciones propuestas para las betalactamasas bacterianas.	3
Cuadro 2. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 48 cepas en estudio de <i>Enterobacter</i> spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.....	19
Cuadro 3. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 15 cepas en estudio de <i>Citrobacter</i> spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.	21
Cuadro 4. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 14 cepas en estudio de <i>Morganella</i> spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.	22
Cuadro 5. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 12 cepas en estudio de <i>Klebsiella aerogenes</i> aisladas en el Hospital México en el 2021.....	23
Cuadro 6. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 8 cepas en estudio de <i>Proteus</i> spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.	24
Cuadro 7. Evaluación de la concordancia y la capacidad diagnóstica de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para la detección de BLEE en 31 cepas de <i>Enterobacterales</i> productoras de esta enzima y 66 no productoras, aisladas en el Hospital México durante el año 2021, con base en el estándar de referencia.....	25

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de distribución de los discos de antibióticos a utilizar en la prueba variante de sinergia de doble disco.	16
Figura 2. Propuesta de algoritmo a utilizar en la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México para la determinación del fenotipo BLEE en aislamientos clínicos identificados como <i>Klebsiella aerogenes</i> o pertenecientes a los géneros <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Morganella</i> y <i>Proteus</i>	31

Lista de abreviaturas

AMC	Amoxicilina-Ácido clavulánico
ATM	Aztreonam
BLEE (ESBL)	β -lactamasa de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CT/CTL	Cefotaxima/Cefotaxima-Ácido clavulánico
CTX	Cefotaxima
FEP	Cefepima
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM/PML	Cefepima/Cefepima-Ácido clavulánico
TZ/TZL	Ceftazidima/Ceftazidima-Ácido clavulánico



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Ariel Miranda Padilla, con cédula de identidad 1-1634-0144, en mi condición de autor del TFG titulado Prueba ESBL del sistema automatizado VITEK 2 de Biomérieux como herramienta para la determinación del fenotipo BLEE en cepas de Enterobacter spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Morganella spp. y Klebsiella aerogenes aisladas en el Hospital México durante el año 2021

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

Antecedentes

La producción de betalactamasas corresponde a uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los betalactámicos en enterobacteriales. Estas enzimas se caracterizan por su producción de tipo constitutiva o inducible. Además, se distinguen según se codifiquen por genes que pueden encontrarse en elementos genéticos móviles, denominadas como clásicas si son de naturaleza plasmídica, o en el cromosoma como las que se presentan en *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter koseri* probablemente derivadas de las PBP por su similitud en secuencia y estructura (García, de la Gándara & García, 2010).

En específico, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE o ESBL, por sus siglas en inglés) se definen como enzimas catalíticas capaces de hidrolizar el enlace amídico del anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas, con excepción de las cefamicinas; y los monobactámicos; pero no los carbapenémicos. Su acción depende de la cantidad de enzima producida y es inhibida clásicamente por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (García et al., 2010; Polsfuss et al., 2012; Brolund, 2014; Urquiza, Arce & Alanoca, 2018).

Otros inhibidores como el avibactam, el vaborbactam y el relebactam han sido aprobados en la última década por la agencia estadounidense de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) en un intervalo de tiempo menor a los cuatro años. Principalmente, como respuesta a la necesidad de implementar nuevas alternativas de tratamiento a través de moléculas con efecto sinérgico con distintos antibióticos dirigidos a ampliar la efectividad de estos inhibidores más allá de las BLEE. Por ejemplo, contra betalactamasas tipo AmpC, metalobetalactamasas y otras carbapenemasas (Riveros et al., 2021).

Sin embargo, recientemente se han encontrado cepas de bacterias resistentes a estos nuevos inhibidores comercializados. Por lo tanto, otras nuevas moléculas como el nacubactam, el zidebactam, el taniborbactam, el QPX 7728 y las rodaninas han sido desarrolladas y en su mayoría se encuentran actualmente en fase experimental;

pero con un avance pobre en cuanto a sus pruebas en fase clínica (Riveros et al., 2021).

La definición propuesta por Giske y colaboradores (2009) divide estas enzimas en tres grandes grupos: $ESBL_A$, $ESBL_M$ y $ESBL_{CARBA}$. Las $ESBL_M$ corresponden al grupo misceláneo donde las AmpC adquiridas son el tipo más común, mientras que en las $ESBL_{CARBA}$ se delimitan las enzimas con actividad carbapenemasa. Por último, las $ESBL_A$ incluyen las enzimas más frecuentemente encontradas, de transmisión horizontal y degradadas por ácido clavulánico como lo son las SHV, las TEM y las CTX-M (Brolund, 2014).

Por otra parte, Urquizo y colaboradores (2018) detallan una clasificación de las betalactamasas basadas en el peso molecular, el espectro y grado de homología de las secuencias de aminoácidos. Esta categorización según los criterios de Ambler, Jaurin y Grundström (Cuadro 1) encasillan estas enzimas dentro de las clases A y D. Las de Clase A corresponden a enzimas serinas con actividad preferentemente penicilinasas como SHV, TEM, CTX-M y otras BLEE menores tipo PER, GES y VER. Además, esta clase incluye serincarbapenemasas cromosomales como SME e IMI-1 o plasmídicas como KPC-2. Esta última identificable por su inhibición por el ácido borónico y no por el clavulánico (Bariani, 2015). En la Clase D o enzimas serinas que hidrolizan oxacilina se encuentran las de tipo OXA de espectro extendido (Urquizo et al., 2018).

Fuera del espectro de enzimas tipo BLEE, otras clases como la C de Ambler concentra enzimas cromosomales o plasmídicas denominadas AmpC capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y monobactámicos que no son inhibidas por los compuestos clásicos de las BLEE. Al mismo tiempo, las de clase B plasmídicas o metalobetalactamasas poseen actividad contra los carbapenémicos, pero no contra los monobactámicos y son inhibidas por quelantes de iones metálicos como el EDTA o el ácido dipicolínico debido a que poseen al menos un átomo de Zinc en su sitio activo (Bariani, 2015).

Asimismo, otras clasificaciones como la de Bush–Jacoby y Medeiros (Cuadro 1) consideran aparte de los criterios anteriormente mencionados, otros como la

codificación cromosómica o plasmídica, el espectro de hidrólisis y el de inhibición hacia clavulánico, cloxacilina, sulbactam, aztreonam y ceftazidima. Empero, otras variables como el punto isoelectrico o el sitio activo también son propuestas como criterios de agrupación (Urquiza et al., 2018).

Cuadro 1. Clasificaciones propuestas para las betalactamasas bacterianas.

Bush- Jacoby - Madeiros	Ambler	Sustratos preferidos	Enzimas representativas
1	C	Cefalosporinas	AmpC de bacterias Gramnegativas, MIR-1
2a	A	Penicilinas	Penicilinasas de bacterias Grampositivas
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1.
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Cefalosporinas de tercera generación, Monobactámicos	TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-46 a TEM-49, TEM-52 a TEM-57, TEM-59 a TEM-61, SHV-2 a SHV-9, SHV-12 y K1 de <i>K. oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	TEM-30 a TEM-41, TEM-44 a TEM-45, TEM-50, TEM-51, TEM-58, TEM-59 y SHV-10
2c	A	Penicilinas, Carbenicilinas	PSE-1 a PSE-3
2d	D	Penicilinas, Cloxacilinas	OXA-1 a OXA-21
2e	A	Cefalosporinas	Cefalosporinasas inducibles de <i>P. vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenémicos	NMC-A de <i>E. cloacae</i> , SME-1 de <i>S. marcescens</i>

3	B	Betalactámicos en general, incluyendo Carbapenémicos	VIM, IMP, SPM, NDM
4	No determinado	Penicilinas	Penicilinas de <i>Burkholderia cepacia</i>

Fuente: Modificado de Bush et al., 1995; Bariani, 2015.

Históricamente, la primera aparición de las betalactamasas fue en 1963 cuando se aislaron TEM-1, SHV-1 y PSE-1 en cepas de *Escherichia coli* (Urquiza et al., 2018). Sin embargo, el capítulo reciente de las BLEE inició en Alemania en la década de los ochenta con la identificación de una SHV-2, la cual debe su nombre a la variación en el grupo sulfhidrilo que le confiere su espectro de resistencia a penicilinas y cefalosporinas (Coral et al., 2020).

No mucho tiempo después, con un fenotipo semejante al anterior de hidrólisis de cefalosporinas de más alto espectro, y con mayor actividad frente a ceftazidima (Navarro et al., 2011), se describió en Francia una TEM-3. Familia cuya denominación deriva del nombre Temoneira, paciente de nacionalidad griega de quien se aisló por primera vez un microorganismo portador de esta enzima en 1965 (Coral et al., 2020).

Para el final de la década, se detectó en una cepa de *E. coli* con una enzima diferente de TEM y SHV que se denominó como CTX-M-1 debido a su preferencia en hidrolizar cefotaxima, la cual se presume deriva de penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. en un proceso que involucra fagos y secuencias de inserción para su salto a plásmidos (Farber et al., 2008). Al terminar el siglo, de manera simultánea ya muchos países a lo largo del mundo reportaban las primeras CTX-M adquiriendo relevancia epidemiológica por su rápida dispersión y su aislamiento en casi todas las enterobacterias (García et al., 2010, Navarro et al., 2011; Coral et al., 2020).

Según Coral y colaboradores (2020), hasta el 2016 se conocían 180 variantes de TEM en su mayoría BLEE, aproximadamente 237 para SHV y más de 210 CTX-Ms clasificadas en 6 grupos; pero cuya cifra sigue en constante crecimiento (García et al., 2010). Asimismo, estos autores exponen que a pesar de la continua descripción de nuevas BLEE como PER, VEB, GES, SFO, TLA, BEL, BES e IBC; las más

ampliamente distribuidas en la actualidad son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-32, CTX-M-9 y CTX-M-15, siendo esta última la de mayor prevalencia (García et al., 2010; Coral et al., 2020).

De manera puntual, el principal orden bacteriano asociado con la producción de BLEE y la reserva de genes de resistencia en general por su desempeño como colonizadores del tracto gastrointestinal es el de *Enterobacterales*. El espectro clínico de las infecciones provocadas por estas bacterias abarca desde las del tracto urinario y gastrointestinal hasta neumonías y del sistema nervioso central, e incluso algunas más severas y mortales como las del torrente sanguíneo. Infecciones para las cuales los antibióticos β -lactámicos son ampliamente utilizados como tratamiento, aparte de su uso profiláctico en procesos quirúrgicos (Brolund, 2014).

Estos fenotipos multidrogo resistentes que usualmente se presentan en *Enterobacterales* productoras de BLEE provocan el descarte de otros principales tratamientos empíricos como las fluoroquinolonas, aminoglucósidos y la trimetoprima-sulfametoxazol para pacientes severamente enfermos, lo cual limita entonces las opciones terapéuticas e incrementa la morbilidad y mortalidad asociada (Brolund, 2014; Singh & Singh, 2014). Por lo que, para un pronóstico favorable en los pacientes con infecciones severas que requieren un tratamiento temprano y adecuado, en un contexto donde los procedimientos diagnósticos son muy lentos, el conocimiento de la epidemiología local, así como la implementación de estrategias de intervención oportunas son indispensables para un abordaje exitoso de estas infecciones. Estrategia que por supuesto, incluye un tratamiento empírico adecuado (Spanu et al., 2006; Brolund, 2014).

La producción de β -lactamasas de espectro extendido constituye además una carga para los sistemas de salud, primordialmente de índole económica. De hecho, en un estudio publicado por Villanueva (2017) se concluye que para Latinoamérica en general la atención de cada caso de infección urinaria BLEE positivo cuesta alrededor de 2 mil dólares entre gastos que involucran la prescripción de antimicrobianos y la extensión de las estancias hospitalarias de los pacientes a quienes afectan. De manera que, conforme la transmisión nosocomial resulta más común, al mismo tiempo que se incrementa la tasa de portadores dentro de la población, el riesgo de

infectarse con cepas productoras de BLEE también aumenta (García et al., 2010; Brolund, 2014).

La transmisión de genes codificantes para enzimas BLEE ocurre por clones bacterianos emergentes mayoritariamente asociados con TEM y SHV. Asimismo, esta dispersión puede también responder al fenómeno de transferencia horizontal de genes entre bacterias de la misma o diferentes especies a través de plásmidos o integrones que pueden contener genes de resistencia contra muchas clases de antibióticos como el caso de las CTX-M y los genes *bla*_{BLEE} (García et al., 2010; Brolund, 2014).

Los factores de riesgo para la adquisición de infecciones por microorganismos BLEE positivos son múltiples. Urquiza y colaboradores (2018) señalan principalmente al proceso de selección de cepas resistentes por el uso empírico de antibióticos de amplio espectro que con frecuencia son administrados a pacientes gravemente enfermos. Sin embargo, otras variables como la adquisición nosocomial, el sondaje urinario, la enfermedad prostática, las infecciones urinarias recurrentes, la edad avanzada, el uso de catéter vesical o incluso la residencia en instituciones han sido justificados también como marcadores predictivos. Por tanto, es posible desmentir que la producción de estas enzimas es exclusiva de infecciones nosocomiales en pacientes con enfermedades debilitantes y con largas estancias hospitalarias. Es decir, actualmente estas infecciones también ocurren en pacientes ambulatorios.

El informe sistemático de la presencia de BLEE detectadas en aislamientos bacterianos del orden de los *Enterobacterales* a partir de muestras clínicas resulta útil (CLSI) o inclusive obligatorio (EUCAST) en el planteamiento de trabajo de cualquier laboratorio microbiológico bajo los propósitos del adecuado control de infecciones y del conocimiento de la epidemiología local (Singh & Singh, 2014). No obstante, diferentes estudios realizados en América y Europa demuestran que aproximadamente la mitad de los centros encargados del desarrollo de estos análisis no reportan, identifican o interpretan correctamente este mecanismo de resistencia (Simon & Glupczynski, 2008).

La gran mayoría de metodologías descritas para la detección de microorganismos productores de BLEE en el laboratorio de microbiología se basan en la inhibición de estas enzimas por el ácido clavulánico, principalmente, o de otros inhibidores. No obstante, estos procedimientos han sido diseñados de manera limitante únicamente para *E. coli* y *Klebsiella* debido a la complejidad que representa su determinación en enterobacterias portadoras de AmpC plasmídicas o productoras de AmpC cromosómicas cuya presencia o desrepresión suele enmascarar la presencia de BLEE (García et al., 2010).

Por tanto, García y colaboradores (2010) recomiendan que independientemente del método seleccionado para el estudio de producción de BLEE en enterobacteriales se debe analizar el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en conjunto con la lectura interpretada o sistema experto avanzado que permita detectar fenotipos compatibles con la presencia de estas enzimas. Esto debido a que para determinar este tipo de resistencia primero se debe sospechar su presencia, primordialmente debido al surgimiento de otros mecanismos de resistencia a los betalactámicos como alteraciones en la permeabilidad de la pared bacteriana o la desrepresión de bombas de expulsión, las cuales a pesar de no compartir aún el fenotipo de las BLEE nunca deberá menospreciarse su control.

Los sistemas automatizados mayoritariamente distribuidos generan alertas de una probable producción de BLEE en los aislamientos de microorganismos en estudio. De manera diferenciada, unos incrementan su sensibilidad al incluir diferentes combinaciones de cefalosporinas con ácido clavulánico, siendo aquellos que incorporen la cefepima los más capaces de detectar BLEE en una mayor cantidad de géneros bacterianos. No obstante, es necesario considerar que los múltiples estudios en los cuales se pretende evaluar su fiabilidad se han obtenido resultados tan diversos como los sistemas analizados (García et al., 2010).

El VITEK® 2 ESBL de bioMérieux consiste según casa comercial, en una prueba de confirmación para las BLEE inhibidas por ácido clavulánico que utiliza bajas concentraciones de cribado de cefepima (1.0 mg/L), cefotaxima (0.5 mg/L) y ceftazidima (0.5 mg/L) únicas y en combinación con ácido clavulánico (10, 4 y 4 mg/L, respectivamente) para determinar un resultado negativo o positivo (bioMérieux,

2020). En donde, una reducción cuantitativa del crecimiento detectada por el lector óptico en los pocillos que contienen cefalosporina-ácido clavulánico en comparación con aquellos que solo cuentan con una cefalosporina es considerado como indicativo de la producción de BLEE (Robin et al., 2007).

De hecho, Spanu y colaboradores (2006) describen esta prueba como una nueva herramienta para la rápida detección de BLEE cuyos resultados finales se obtienen en diez horas menos en promedio que con los ensayos confirmatorios o de tamizaje aprobados por el CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, por sus siglas en inglés). Sin embargo, dentro de las especificaciones del inserto su indicación de uso se restringe a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* según lo establece la FDA. Adicionalmente, de manera explícita recomiendan llevar a cabo un método de confirmación diferente antes de informar una cepa como productora de BLEE utilizando esta prueba (bioMérieux, 2020).

En cuanto a las pruebas fenotípicas de confirmación de BLEE, el método de difusión en agar con discos o microdilución en caldo para evaluar la sensibilidad a cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico corresponde al procedimiento recomendado por el CLSI. No obstante, en la práctica este puede ser sustituido por los procedimientos de sinergia de doble disco o de Epsilon-test[®] sólido (García et al, 2010; Garrec et al., 2011; Polsfuss et al., 2012; Singh & Singh, 2014). Los métodos moleculares se encuentran disponibles pero orientados a la investigación o estudios epidemiológicos pues no se consideran apropiados para la detección de rutina de producción de BLEE en la clínica (Spanu et al., 2006).

La prueba de sinergia de doble disco fue la primera metodología en ser planteada para el tamizaje de cepas productoras de BLEE. Se basa en la ampliación del halo de inhibición de los discos de cefotaxima, ceftazidima y aztreonam colocados alrededor del de amoxicilina-ácido clavulánico (20 µg/10 µg) en un medio sólido (García et al, 2010; Garrec et al., 2011; Polsfuss et al., 2012; Singh & Singh, 2014). En detalle, los discos deben emplearse con una carga estándar de 30 µg y separados por 30 mm entre sí. Sin embargo, si el resultado de la prueba es negativo y persiste la sospecha en una cepa identificada como *E. cloacae* se podrá aumentar la sensibilidad de esta al disminuir a 20 mm esta distancia entre los discos. Asimismo,

aumentar la distancia a 45 mm podría ayudar a detectar niveles bajos de expresión BLEE en aislamientos de *P. mirabilis*. Por tanto, esta metodología es dependiente de la habilidad en el montaje y en la interpretación del usuario (García et al., 2010).

Las tiras de Epsilon-test[®] representan por su parte un método mucho más sencillo, pero mucho más costoso entre sus similares para la detección de BLEE. Este estudio de confirmación consiste en un conjunto de tiras de Etest[®] que contienen un gradiente de concentración de cefotaxima, ceftazidima y/o cefepima en uno de sus extremos mientras que en el otro esta concentración creciente de cefalosporinas se encuentra asociada a una concentración constante de ácido clavulánico (4 µg/mL). Durante la lectura es importante seguir reglas para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) pues de no ser así la sensibilidad de la prueba se ve comprometida y se observarán discrepancias (García et al., 2010; Garrec et al., 2011; Singh & Singh, 2014).

Para ambos métodos se recomienda efectuar pequeñas modificaciones según contextos específicos. El caso más común se delimita a la detección de BLEE en cepas productoras de AmpC como lo son *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* y potencialmente cualquier otra enterobacteria por adquisición de plásmidos. Para estos aislamientos, se sugiere la inclusión de una cefalosporina de cuarta generación como la cefepima pues estas betalactamasas de tipo AmpC generalmente la hidrolizan en menor medida que las BLEE, aun cuando estas últimas muestran actividad mínima contra esta cefalosporina (García et al., 2010). Es decir, que la expresión de estas cefalosporinas enmascarara la sinergia entre cefalosporinas de tercera generación normalmente utilizadas y el ácido clavulánico, lo cual es un requisito para la detección de BLEE. Por tanto, la prueba estándar no resulta útil (Stuart et al., 2011).

Stuart y colaboradores (2011) añaden que esta prueba variante para la detección de BLEE en enterobacterias con AmpC inducible de por sí no tiene consecuencias terapéuticas en la práctica debido a que los clínicos consideran las cefalosporinas, y por ende la cefepima, inadecuadas para el tratamiento de infecciones causadas por estas especies. Esta razón explica por qué existe escasa información de la prevalencia de BLEE en estos casos. Además, en Costa Rica el uso de cefepima se restringe por su exclusión de la Lista Oficial de Medicamentos del Seguro Social y la

alta precaución que su uso supone en relación con las consecuencias de un efecto inóculo (Caja Costarricense del Seguro Social, 2014; Hospital Clínico San Borja Arriarán, 2019).

No obstante, Ruiz (2013) visibiliza la cefepima como una opción de tratamiento empírico debido a que se ha visto que su uso desplaza cepas productoras de AmpC por no productoras, lo cual se explica por ser poco hidrolizado por la enzima y por su pobre capacidad inductora de AmpC con respecto a otros antibióticos como los carbapenémicos, los cuales son los antibióticos recomendados como primera línea para el manejo dirigido de estas infecciones (Hospital Clínico San Borja Arriarán, 2019).

Esta recomendación, a su vez, se fundamenta según Aguilar (2016) debido a la alta estabilidad de estos agentes ante la hidrólisis ocasionada por las BLEEs y su excelente distribución entre los tejidos corporales que les permite alcanzar altas concentraciones sin el efecto inóculo. Es decir, sin el aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en función de un número mayor de bacterias en la muestra. En contrapeso, entre sus limitantes destacan además de su costo relativamente alto y la necesidad de administrarlos por vía parenteral, la potencial selección de cepas productoras de carbapenemasas e infecciones por hongos como consecuencia de su amplio espectro de actividad y su uso indiscriminado no planificado. En donde, para las infecciones provocadas por estas cepas las opciones antimicrobianas disponibles son reducidas, posicionando así a los pacientes involucrados en un estado máximo de vulnerabilidad su estado salud cuya frecuencia de complicaciones y mortalidad asociada aumenta ante la prescripción de un tratamiento inadecuado (Simon & Glupczynski, 2008).

Pregunta de investigación

¿Puede ser la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux utilizada como herramienta para la determinación del fenotipo BLEE en cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021?

Hipótesis

La prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux sí puede ser utilizada como herramienta para la determinación del fenotipo BLEE en cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el uso de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux como herramienta para la determinación del fenotipo BLEE en cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021.

Objetivos Específicos

1. Definir el fenotipo BLEE de cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021 utilizando la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux.
2. Determinar la producción de BLEE en cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021 mediante las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilometría.
3. Comparar los fenotipos BLEE de cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021 obtenidos a partir de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux con respecto a los equivalentes por caracterización fenotípica.
4. Evaluar la aplicación de técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la discriminación de cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021 como productoras o no de BLEE cuando la prueba automatizada y el estudio fenotípico resulten discrepantes entre sí.
5. Calcular la sensibilidad y especificidad de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para determinar el fenotipo BLEE de cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México durante el año 2021.

Justificación

Los resultados obtenidos por Spanu y colaboradores (2006) en un estudio previo desarrollado en Italia demostraron que la prueba VITEK[®]2 ESBL, incluida en las tarjetas de pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los sistemas automatizados bioMérieux, es una herramienta rápida y confiable para la identificación rutinaria de aislamientos de *Enterobacterales* productores de BLEE. Esta afirmación fue posible debido a la confirmación de los resultados obtenidos de la prueba VITEK[®]2 ESBL mediante una caracterización sólida basada en técnicas moleculares, bioquímicas y el ensayo recomendado por el CLSI de difusión en discos para corroborar expresión fenotípica.

Por lo tanto, esta investigación pretende utilizar las mismas bases metodológicas para reproducir la evaluación de la misma prueba VITEK[®]2 ESBL como herramienta en la detección de BLEE en cepas de *Enterobacterales* aisladas rutinariamente en la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México que se caractericen por presentar un perfil de resistencia a antibióticos sugestivo; pero estableciendo como medida de comparación las pruebas fenotípicas al alcance y facilidad del centro como las epsilométricas y variantes de sinergia de doble disco. Restringiendo el uso de pruebas moleculares como última alternativa de discriminación. Esto, con la finalidad de optimizar recursos y tiempos de respuesta sin comprometer la calidad de los resultados.

Materiales y métodos

Selección de las cepas

Este proyecto de investigación empleó un diseño experimental utilizando 97 aislamientos clínicos no duplicados de *Enterobacter* spp. (48), *Citrobacter* spp. (15), *Proteus* spp. (8), *Morganella* spp. (14) y *Klebsiella aerogenes* (12) recolectados en el Hospital México durante el año 2021 sugestivos de ser productores de BLEE de acuerdo con el perfil de resistencia de las diferentes cefalosporinas; pero no a carbapenémicos, en el antibiograma generado por el sistema automatizado VITEK®2 de bioMérieux.

Determinación del fenotipo BLEE mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux

Para todos los aislamientos escogidos se sustituyó momentáneamente su respectiva identificación por la de *Escherichia coli* para obtener la lectura de BLEE. El resultado negativo o positivo de esta prueba se revisó y almacenó en conjunto con el perfil de sensibilidad a los antibióticos de cada uno de los aislamientos en un registro exclusivo del proyecto.

Mantenimiento de las cepas

Se realizó un repique de las cepas seleccionadas en agar sangre certificado y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Seguidamente, se tomó un exceso de colonias con asa bacteriológica y se resuspendió en un criopreservante especialmente formulado para el almacenamiento a bajas temperaturas contenido en un vial de tipo MICROBANK™ con microesferas de vidrio poroso en suspensión. Se vortexeó y descartó el mayor volumen de criopreservante con ayuda de una pipeta Pasteur. Por último, se congelaron las microesferas porosas a -20°C debidamente identificadas.

Caracterización fenotípica de aislamientos

Prueba variante de sinergia de doble disco

Para cada uno de los aislamientos preservados se tomó una microesfera de los crioviales y se cultivó en agar sangre certificado y se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente, a partir de colonias puras y aisladas se realizó una suspensión

bacteriana 0,50 McFarland y se rayó en mínimo 3 direcciones esparciéndola de manera homogénea en una placa de agar Müller-Hinton certificado de 4mm de espesor con una torunda estéril. Se dejó secar por 15 minutos y se colocaron con una pinza estéril los discos de amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP) y aztreonam (ATM) según la Figura 1, separados de 20 a 25 mm entre sí. Se incubó por 16-20 horas a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se interpretaron los resultados obtenidos considerando como positivo por BLEE ya sea la ampliación del halo de inhibición de CTX, CAZ, FEP o ATM en la zona próxima a AMC o la inhibición del crecimiento (conocido como presencia de zona fantasma) entre los antibióticos y el inhibidor.

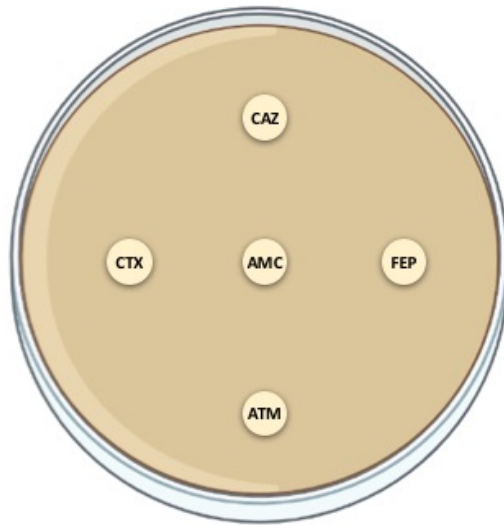


Figura 1. Esquema de distribución de los discos de antibióticos a utilizar en la prueba variante de sinergia de doble disco.

Fuente: Elaboración propia.

Prueba epsilométrica o confirmación fenotípica mediante Etest®

Para cada uno de los aislamientos conservados se tomó una microesfera de los crioviales y se cultivó en agar sangre certificado y se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente, a partir de colonias puras y aisladas se realizó una suspensión bacteriana 0,50 McFarland y se rayó en mínimo 3 direcciones esparciéndola de manera homogénea en tres placas de agar Müller-Hinton certificado de 4mm de espesor con una torunda estéril. Se dejaron secar por 15 minutos y se colocaron con una pinza estéril las tiras de cefotaxima/cefotaxima-ácido clavulánico (CT/CTL), ceftazidima/ceftazidima-ácido clavulánico (TZ/TZL) y cefepima/cefepima-ácido

clavulánico (PM/PML) individualmente y procurando que se encontraran completamente en contacto con la superficie del agar sin burbujas. Se incubaron por 18-24 horas a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se llevó a cabo la lectura de las MIC e interpretaron los resultados como positivos cuando la razón de las MIC del antibiótico y el antibiótico más inhibitor fuera igual o mayor a 8, o cuando se presentaran los fenómenos de zona fantasma o deformación de la elipse en al menos uno de los tres antibióticos analizados.

Caracterización molecular de aislamientos

Se seleccionaron todas las cepas cuyas pruebas de VITEK®2 ESBL y las fenotípicas de Etest® y de variante de sinergia de doble disco resultaran incongruentes entre sí. Para cada una de las cepas se tomó una microesfera de los crioviales conservados a -20°C y se cultivó en agar sangre certificado. Se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente, a partir de colonias puras y aisladas se realizó una suspensión bacteriana 0,50 McFarland. Se transfirieron 50 µL de esta suspensión a un Panel de Gram Negativos ePlex System de GeneMark Diagnostics y se introdujo al equipo. Al finalizar, se realizó la lectura de resultados como negativa o positiva por la presencia de genes *bla*_{CTX-M}.

Análisis estadístico

El Índice kappa Cohen (κ) se utilizó para comparar en términos de concordancia los resultados obtenidos en la determinación del fenotipo BLEE mediante la prueba de ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux con respecto a la caracterización fenotípica. La estimación del grado de acuerdo se estableció según los límites propuestos por Landis y Koch (1977) con base en el cálculo de κ . La sensibilidad, especificidad y los respectivos valores predictivos tanto positivos como negativos fueron también calculados como la respectiva medida de la capacidad diagnóstica.

Resultados

Con el objetivo de maximizar el provecho de la prueba ESBL incluida en las tarjetas para el análisis de sensibilidad a antimicrobianos de Gram Negativos del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux (AST-N401, AST-N402 y AST-N403), así como de acelerar el reporte final de aislamientos identificados como *Klebsiella aerogenes* o como especies de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Proteus* sospechosos de expresar BLEE; se asociaron las respectivas pruebas de sensibilidad a antibióticos de las 97 cepas en estudio a una identificación de *Escherichia coli* como lo establecen Robin y colaboradores (2007) para obtener una lectura.

Los resultados de BLEE desplegados por este sistema automatizado para cada uno de los 97 aislamientos tras esta manipulación fueron tabulados según identificación (Cuadros 2-6) en conjunto con los equivalentes obtenidos mediante caracterización fenotípica e individualmente por las pruebas de variante de sinergia de doble disco y las epsilométricas que componen esta metodología de referencia. Combinación que es utilizada convencionalmente en la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México en función de garantizar la mayor sensibilidad y especificidad en los resultados de las cepas en estudio (Simon & Glupczynski, 2008).

Sin embargo, partiendo de la incertidumbre al conocer las limitaciones de las técnicas basadas en fenotipo se ejecutó una prueba PCR dirigida a la detección de genes *bla_{CTX-M}*, facilitada por la División de Biología Molecular del mismo centro, debido a la amplia distribución y alta frecuencia de esta familia de BLEEs (Coral et al., 2020). Esto para ratificar la interpretación del estándar de referencia fenotípico utilizado para comparar contra la generada por el sistema automatizado.

Empero, debido a una limitante de índole económica este análisis molecular solo se planteó como una medida resolutoria cuando se evidenciaron discrepancias al comparar ambas metodologías. Dichos resultados se encuentran de igual manera asociados en los Cuadros 2-6, distinguidos por sombreado, mostrando una perfecta congruencia con los obtenidos a través de la caracterización basada en fenotipo.

Cuadro 2. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 48 cepas en estudio de *Enterobacter* spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.

N°	Interpretación BLEE		Prueba de Sinergia	Pruebas fenotípicas (PF)			Prueba Molecular* (CTX-M)
	VITEK	PF		Prueba Epsilométrica			
				CT/CTL	TZ/TZL	PM/PML	
01	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/1.0	No realizado
02	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/>4.0	No realizado
03	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32/0.50	Deformación de la elipse	No realizado
04	NEG	POS	POS	>16/0.50	Zona fantasma	>16/0.064	POS
05	POS	POS	POS	>16/0.50	>32/0.19	Deformación de la elipse	No realizado
06	POS	NEG	NEG	4/>1.0	8/4.0	0.75/0.75	NEG
07	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	2.0/>4.0	No realizado
08	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/1.5	No realizado
09	POS	POS	POS	No determinable	>32/0.25	Zona fantasma	No realizado
10	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/1.5	No realizado
11	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.5/>4.0	No realizado
12	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	No determinable	No realizado
13	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.25/0.125	No realizado
14	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.50/0.50	No realizado
15	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32/0.75	Zona fantasma	No realizado
16	NEG	NEG	NEG	1.0/>1.0	0.50/>4.0	<0.25/<0.064	No realizado
17	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/2.0	No realizado

18	POS	POS	POS	>16/1.0	>32/0.25	Zona fantasma	No realizado
19	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32/0.19	Deformación de la elipse	No realizado
20	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	2.0/>4.0	No realizado
21	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.25/0.38	No realizado
22	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	3.0/>4.0	No realizado
23	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32/0.25	Deformación de la elipse	No realizado
24	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.25/0.25	No realizado
25	POS	POS	POS	No determinable	>32/0.50	Zona fantasma	No realizado
26	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32/0.25	Deformación de la elipse	No realizado
27	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	3.0/>4.0	No realizado
28	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.38/1.5	No realizado
29	NEG	NEG	NEG	<0.25/0.38	<0.50/0.094	<0.25/<0.064	No realizado
30	POS	POS	POS	Zona fantasma	Zona fantasma	Deformación de la elipse	No realizado
31	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	No determinable	No realizado
32	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	3.0/>4.0	No realizado
33	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	3.0/>4.0	No realizado
34	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	3.0/>4.0	No realizado
35	POS	POS	POS	Zona fantasma	>32.0/0.25	Deformación de la elipse	No realizado
36	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	2.0/>4.0	No realizado
37	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.5/1.0	No realizado

* Se ejecutó únicamente cuando los resultados del sistema automatizado y la caracterización fenotípica discreparan entre sí en definir el fenotipo BLEE de un determinado aislamiento.	38	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	6.0/>4.0	No realizado
	39	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	4.0/>4.0	No realizado
	40	POS	POS	POS	No determinable	>32/0.50	Deformación de la elipse	No realizado
	41	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	2.0/>4.0	No realizado
	42	POS	POS	POS	Zona fantasma	Zona fantasma	Deformación de la elipse	No realizado
	43	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.5/2.0	No realizado
	44	POS	POS	POS	No determinable	No determinable	>16/0.50	No realizado
	45	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.38/0.25	No realizado
	46	POS	POS	POS	No determinable	Zona fantasma	>16/<0.064	No realizado
47	POS	POS	POS	No determinable	Zona fantasma	Deformación de la elipse	No realizado	
48	POS	NEG	NEG	1.0/>1.0	1.0/>4.0	0.50/0.25	NEG	

Cuadro 3. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 15 cepas en estudio de *Citrobacter* spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.

N°	Interpretación BLEE		Prueba de Sinergia	Pruebas fenotípicas (PF)			Prueba Molecular* (CTX-M)
	VITEK	PF		Prueba Epsilométrica			
				CT/CTL	TZ/TZL	PM/PML	
01	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.50/1.0	No realizado
02	POS	POS	POS	>16/0.125	>32/0.25	>16/<0.064	No realizado
03	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.50	No realizado
04	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.50/0.50	No realizado
05	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.75	No realizado
06	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.50/0.50	No realizado

* Se ejecutó únicamente cuando los resultados del sistema automatizado y la caracterización fenotípica discreparan entre sí en definir el fenotipo BLEE de un determinado aislamiento.

Cuadro 4. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL

07	POS	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/0.75	NEG
08	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.50	No realizado
09	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.50	No realizado
10	POS	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.5/1.5	NEG
11	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/1.0	No realizado
12	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.75	No realizado
13	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	2.0/1.5	No realizado
14	POS	POS	POS	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	No realizado
15	POS	NEG	NEG	No determinable	No determinable	1.0/0.50	NEG

del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 14 cepas en estudio de *Morganella* spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.

N°	Interpretación BLEE		Pruebas fenotípicas (PF)				Prueba Molecular* (CTX-M)
	VITEK	PF	Prueba de Sinergia	Prueba Epsilométrica			
				CT/CTL	TZ/TZL	PM/PML	
01	NEG	NEG	NEG	<0.25/>1.0	<0.5/0.5	<0.25/<0.064	No realizado
02	POS	POS	POS	Zona fantasma	Deformación de la elipse	Zona fantasma	No realizado
03	NEG	NEG	NEG	<0.25/0.032	<0.5/0.064	<0.25/<0.064	No realizado
04	NEG	NEG	NEG	No determinable	8.0/>4.0	<0.25/0.064	No realizado
05	NEG	NEG	NEG	1.5/>1.0	1.5/>4.0	<0.25/0.064	No realizado
06	NEG	NEG	NEG	0.75/>1.0	1.0/>4.0	<0.25/<0.064	No realizado

<p>* Se ejecutó únicamente cuando los resultados del sistema automatizado y la caracterización fenotípica discreparan entre sí en definir el fenotipo BLEE de un determinado aislamiento.</p> <p>Cuadro 5. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la</p>	07	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/<0.064	No realizado
	08	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/0,125	No realizado
	09	NEG	NEG	NEG	<0.25/0.047	<0.50/<0.064	<0.25/<0.064	No realizado
	10	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/0.094	No realizado
	11	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/<0.064	No realizado
	12	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/<0.064	No realizado
	13	POS	POS	POS	Zona fantasma	Deformación de la elipse	Zona fantasma	No realizado
	14	POS	NEG	NEG	<0.25/0.25	<0.50/0.38	<0.25/0.064	NEG

prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 12 cepas en estudio de *Klebsiella aerogenes* aisladas en el Hospital México en el 2021.

N°	Interpretación BLEE		Prueba de Sinergia	Pruebas fenotípicas (PF)			Prueba Molecular* (CTX-M)
	VITEK	PF		Prueba Epsilométrica			
				CT/CTL	TZ/TZL	PM/PML	
01	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	<0.25/0.19	No realizado
02	POS	POS	POS	>16/0.094	>32/0.38	Zona fantasma	No realizado
03	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.25/0.19	No realizado
04	POS	POS	POS	No determinable	No determinable	>16/0.125	No realizado
05	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	4.0/>4.0	No realizado
06	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.38/0.19	No realizado
07	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.30/0.25	No realizado

* Se ejecutó únicamente cuando los resultados del sistema automatizado y la caracterización fenotípica discreparan entre sí en definir el fenotipo BLEE de un determinado aislamiento.	08	POS	POS	POS	>16/0.38	>32/0.75	>16/0.064	No realizado
	09	NEG	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.25/0.19	No realizado
	10	POS	NEG	NEG	No determinable	No determinable	0.75/0.38	NEG
	11	POS	POS	POS	No determinable	1.0/>32	Zona fantasma	No realizado
	12	POS	POS	POS	No determinable	No determinable	Deformación de la elipse	No realizado

Cuadro 6. Resumen de los resultados del fenotipo BLEE obtenidos mediante la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux, las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas, así como de las moleculares para las 8 cepas en estudio de *Proteus* spp. aisladas en el Hospital México en el 2021.

N°	Interpretación BLEE		Pruebas fenotípicas (PF)				Prueba Molecular* (CTX-M)
	VITEK	PF	Prueba de Sinergia	Prueba Epsilométrica			
				CT/CTL	TZ/TZL	PM/PML	
01	POS	NEG	NEG	<0.25/0.016	<0.5/0.064	<0.25/<0.064	NEG
02	POS	POS	POS	>16/0.047	Deformación de la elipse	>16/0.19	No realizado
03	NEG	NEG	NEG	<0.25/<0.016	<0.50/<0.064	<0.25/0.064	No realizado
04	POS	POS	POS	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	No realizado
05	POS	POS	POS	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	Deformación de la elipse	No realizado
06	POS	POS	POS	Zona fantasma	Deformación de la elipse	Zona fantasma	No realizado
07	POS	POS	POS	Zona fantasma	Deformación de la elipse	Zona fantasma	No realizado
08	NEG	NEG	NEG	<0.25/0.016	<0.50/<0.064	<0.25/<0.064	No realizado

* Se ejecutó únicamente cuando los resultados del sistema automatizado y la caracterización fenotípica discreparan entre sí en definir el fenotipo BLEE de un determinado aislamiento.

El perfil esperado de concordancia entre la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux y las utilizadas en conjunto como parte de la caracterización fenotípica para la determinación BLEE en los 97 aislamientos de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. y *Klebsiella aerogenes* del Hospital México en el 2021 se describe como muy bueno o casi perfecto ($\kappa > 0.80$) con base en la escala de Landis y Koch (1977) para la estimación del grado de acuerdo.

Asimismo, se proyecta un desempeño de esta prueba automatizada similar al reportado por Spanu y colaboradores (2006) con valores superiores al 98% de sensibilidad y especificidad para clasificar las 31 cepas definidas como productoras de esta enzima y las 66 no productoras mediante pruebas fenotípicas y moleculares. Salvo de un 85% de sensibilidad para los casos particulares de *Enterobacter* spp. y *Klebsiella aerogenes*.

En términos generales, con el modelo experimental ejecutado se obtuvo una concordancia entre el sistema automatizado y la metodología de referencia en el valor límite de bueno o sustancial y muy bueno o casi perfecto ($\kappa = 0.80$, $IC_{95\%}$ 1.00-0.60) para las 97 cepas evaluadas. Tendencia que se mantuvo en el análisis diferenciado para los 48 aislamientos de *Enterobacter* spp. ($\kappa = 0.87$, $IC_{95\%}$ 1.15-0.59), los 12 de *Klebsiella aerogenes* ($\kappa = 0.83$, $IC_{95\%}$ 1.39-0.28), los 14 de *Morganella* spp. ($\kappa = 0.76$, $IC_{95\%}$ 1.27-0.25) y los 8 de *Proteus* spp. ($\kappa = 0.71$, $IC_{95\%}$ 1.38-0.05); más no así para los 15 correspondientes a *Citrobacter* spp., los cuales mostraron un grado de acuerdo menor clasificado como moderado ($\kappa = 0.47$, $IC_{95\%}$ 0.90-0.04) (Cuadro 8).

Por otra parte, la sensibilidad de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para determinar la verdadera producción de BLEE en los 97 aislamientos analizados fue de 97% (VPN = 98%) con respecto al estándar. Destacándose dentro de este el 100% de sensibilidad calculada para las cepas identificadas como *Klebsiella aerogenes* o como parte de los géneros *Citrobacter*, *Morganella* y *Proteus*. Finalmente, la especificidad total de esta prueba automatizada fue de 88% (VPP = 79%) siendo tan heterogénea entre los grupos de microorganismos como el 94% obtenido para los aislamientos de *Enterobacter* spp. con respecto al 67% calculado para *Proteus* spp. (Cuadro 8).

Cuadro 7. Evaluación de la concordancia y la capacidad diagnóstica de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para la detección de BLEE en 31 cepas de *Enterobacterales* productoras de esta enzima y 66 no productoras, aisladas en el Hospital México durante el año 2021, con base en el estándar de referencia.

Microorganismo (N° de aislamientos)	N°. de aislamientos BLEE-positivos identificados por VITEK 2 como:		N°. de aislamientos BLEE-negativos identificados por VITEK 2 como:		κ	EE de κ	IC (95%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
	BLEE positivo	BLEE negativo	BLEE positivo	BLEE negativo							
<i>Enterobacter</i> spp. (48)	16	1	2	29	0.87	0.14	1.15 – 0.59	94	94	89	97
<i>Citrobacter</i> spp. (15)	2	0	3	10	0.47	0.22	0.90 – 0.04	100	77	40	100
<i>Morganella</i> spp. (14)	2	0	1	11	0.76	0.26	1.27 – 0.25	100	92	67	100
<i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i> (12)	5	0	1	6	0.83	0.28	1.39 – 0.28	100	86	83	100
<i>Proteus</i> spp. (8)	5	0	1	2	0.71	0.34	1.38 – 0.05	100	67	83	100
Total (97)	30	1	8	58	0.80	0.10	1.00 – 0.60	97	88	79	98

κ : Índice Kappa de Cohen, EE: Error Estándar, IC: Intervalo de Confianza, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo.

Discusión y Conclusiones

VITEK® 2 ESBL de bioMérieux es una de las metodologías automatizadas para la detección de BLEE en aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca*. Se hipotetiza que su uso puede extenderse a todo el orden de los *Enterobacterales* partiendo del supuesto que para este sistema en particular todos sus exponentes comparten el mismo algoritmo de crecimiento (Robin et al.,

2007). A pesar de algunos pocos reportes durante la primera década del siglo sobre el uso y capacidad diagnóstica de esta prueba en la identificación del fenotipo BLEE en cepas de *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp. y *Klebsiella aerogenes*; su incorporación y aplicación rutinaria en los laboratorios microbiológicos como el del Hospital México carece de un criterio suficiente y homogéneo.

En el presente trabajo se ha tomado ventaja de observaciones metodológicas y experimentales previas, generados por grupos de investigación europeos, con el fin de abordar la pregunta del desempeño de la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux. Estas observaciones indican que, para aislamientos pertenecientes a otras especies no validadas para esta prueba, la lectura de esta puede permitirse al cambiar la identificación a *E. coli* obteniéndose resultados rápidos altamente sensibles y específicos (Spanu et al., 2006; Robin et al., 2007).

Esta hipótesis, sin embargo, se dificulta de comprobar experimentalmente reproduciendo el modelo dual basado en métodos de caracterización molecular y fenotípica, o tripartita si se incluye la de tipo bioquímica, empleado en estos estudios debido a los alcances y oferta del servicio. En contraste, se utilizaron las pruebas fenotípicas epsilométricas y de variante de sinergia de doble disco con la inclusión de cefepima y aztreonam como parte de las modificaciones planteadas para la optimización del rendimiento (García et al., 2010).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa dirigida a la detección de la principal familia de este tipo de betalactamasas, se reservó únicamente ante la necesidad de resolver discordancias entre el sistema automatizado y las pruebas fenotípicas. De hecho, Spanu y colaboradores (2006) plantean delimitar la caracterización molecular cuando medien exclusivamente intereses epidemiológicos o investigativos, como en este caso, pudiendo entonces considerar esta herramienta en la toma de decisiones; pero prescindir de la misma en la elaboración de futuros protocolos para determinar rutinariamente en clínica la expresión de BLEE.

Partiendo de estas premisas, la capacidad diagnóstica calculada para esta prueba ESBL automatizada difiere de la reportada por Spanu y colaboradores (2006) en su

estudio con el triple de aislamientos analizados para los mismos organismos. Principalmente, en términos de un 100% de especificidad en comparación con el 88% obtenido. En cuanto a sensibilidad, no es para la totalidad de las cepas en donde se exhibe la diferencia sino cuando se interpretan individualmente los resultados para *Enterobacter* spp. y *Klebsiella aerogenes*, pues esta investigación muestra un valor superior al reportado por estos pares italianos.

Del mismo modo, Robin y colaboradores (2007) obtienen métricas de desempeño que contrastan con las expuestas en el Cuadro 7 de una mayor sensibilidad que especificidad. Este estudio francés es reiterativo en caracterizar esta prueba automatizada como 100% específica pero cuya sensibilidad se encuentra comprometida sin realizar ninguna salvedad con respecto al género o especie bacteriana identificada. Interesantemente, su metodología empleó aproximadamente la mitad de aislamientos clínicos que la de este análisis.

La mayor sensibilidad de la prueba ESBL automatizada para la detección de BLEE en aislamientos productores de AmpC de este proyecto (refiérase a *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp. y *Klebsiella aerogenes*) en relación con los dos estudios europeos anteriores e incluso comparado con otras metodologías estándar, puede deberse a que a pesar de utilizar tres oximinocefalosporinas incluyendo la cefepima, la mayoría de enzimas no detectadas corresponden a las familias TEM y SHV. Probablemente, debido a una baja resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación que algunos de sus exponentes presentan. Mientras que todas las CTX-M, familia reconocida como la más frecuente y distribuida (Coral et al., 2020), son identificadas correctamente como productoras de BLEE con excepciones poco comunes como la CTX-M-6 (Spanu et al., 2006; Robin et al., 2007). Sin embargo, estudios moleculares más dirigidos serán necesarios para ratificar esta asociación en un contexto del desconocimiento de la epidemiología local del centro médico.

En este trabajo, el único falso negativo obtenido para un aislamiento identificado como *Enterobacter* spp. puede explicarse como el resultado de un alto nivel de expresión de AmpC codificada cromosómicamente, la cual al ser inducida por ácido clavulánico fortalece la resistencia a otras drogas testeadas y enmascara el efecto inhibitorio

esperado (Spanu et al., 2006). Por tanto, a estas cefalosporinasas inducibles en conjunto con otros mecanismos como la disminución de la permeabilidad por modificación de porinas se les ha descrito como los principales interferentes en todas las pruebas de sinergia en general, como la aquí evaluada, dificultando la detección de BLEE (Simon & Glupczynski, 2008; Stuart et al., 2011).

Es decir, aunque el uso de la prueba ESBL de VITEK® 2 no se encuentra validada para este grupo de organismos, pues su detección parece ser más difícil especialmente con sistemas automatizados (Robin et al., 2007), según los hallazgos de este proyecto esta metodología sí es entonces efectiva en la identificación de BLEEs entre *Enterobacterales* productores de AmpC y se demuestra en el 97% y 98% de sensibilidad y valor predictivo negativo calculados (Cuadro 7), respectivamente. No obstante, la resistencia de algunos laboratorios microbiológicos a implementar esta herramienta puede deberse a que la primera generación de tarjetas de VITEK ESBL detectaban menos del 10% de cepas de *Enterobacter* spp. productoras de BLEE (Robin et al., 2007).

Por otra parte, falsos positivos en la determinación del fenotipo BLEE por la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux han sido reportados en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* hiperproductores de SHV-1. Estos aislamientos mostraban un aumento único en la CMI de ceftazidima de hasta 32 µg/mL, por sobre las equivalentes de ceftriaxona y cefepima, con una disminución de menos de 3 diluciones provocada por ácido clavulánico, característica que no es posible conocer a través de metodologías automatizadas. Este patrón parece estar presente en los 4 aislamientos mal clasificados como productores de BLEE en *Enterobacter* spp., *Morganella* spp. y *Proteus* spp. (Anexos 1, 3 y 5). Por lo que, es probable que estas cepas sean entonces grandes productores de penicilinasas con cierta inhibición por ácido clavulánico.

La expresión de una BLEE de la familia TEM, debido a la mayor actividad de estas enzimas frente a la ceftazidima (Navarro et al., 2011) como una explicación de estos 4 falsos positivos no fue considerada, tanto por el contundente resultado negativo definido por la caracterización fenotípica así como por la nula descripción de experiencias similares en la bibliografía consultada. Sin embargo, solo un análisis

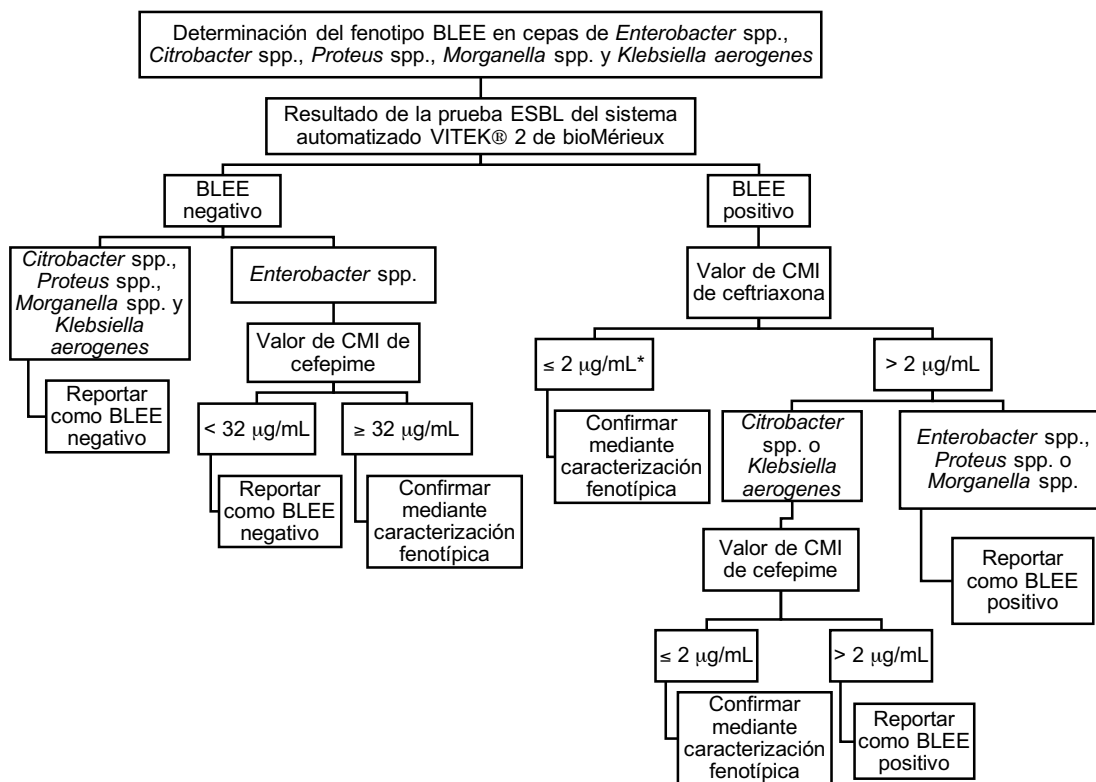
molecular dirigido podría desestimar esta posibilidad, en cuyo caso tampoco parece tener la justificación necesaria.

Para el caso particular de los otros 4 falsos positivos entre *Citrobacter* spp. y *Klebsiella aerogenes* se dificulta proponer cuáles podrían ser las razones involucradas, pues estudios previos no se han enfrentado a estos casos en particular ya que al reportar especificidades perfectas se enfocan en explicar en cambio su baja sensibilidad. Asimismo, no es posible deducir alguna interferencia sugestiva por la distribución de las CMI_s (Anexos 2 y 4) así como tampoco descartar la expresión conjunta de AmpC y penicilinasas en hiperproducción. Esta coexpresión otorgaría sentido al perfil de CMI_s característico de estas cefalosporinasas eclipsando el esperado para estas penicilinasas anteriormente descritas, más no su inhibición por ácido clavulánico y la consecuente interpretación de un falso positivo por reducción del crecimiento en los pocillos. Empero, un mayor análisis será requerido para generar y corroborar posibles hipótesis.

Ahora bien, debido a la destacada sensibilidad y la concordancia casi perfecta mostrada en este estudio entre la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux y la combinación de las pruebas fenotípicas de variante de sinergia de doble disco y epsilométricas definidas como el estándar de referencia ($\kappa = 0.80$, IC_{95%} 1.00-0.60), lo cual asegura acaparar la totalidad de verdaderos positivos a través de resultados similares entre estas más allá de la probabilidad dada por el azar. Se propone utilizar en la División de Microbiología esta prueba automatizada como un cribado para la determinación de fenotipo BLEE en *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus* y *Klebsiella aerogenes*. Planteamiento que concuerda con lo expuesto por Farber y colaboradores (2008) de no emplear sistemas automatizados como único método para detectar la producción de BLEE.

En la Figura 2 se plantea una propuesta basada en la evidencia recolectada para esta prueba que garantiza el 100% de sensibilidad y especificidad en la detección de BLEE en los 97 aislamientos analizados. En donde, se establece que ante un resultado de BLEE negativo desplegado por este sistema deberá solo confirmarse en función de un valor de CMI de cefepima superior o igual a 32 para aquellos identificados dentro del género *Enterobacter*. El desempeño de la prueba hasta valores menores de 32

obtenidos en este estudio parecen no precisar esta confirmación (Anexos 1, 2, 4 y 5), y dado el alto valor predictivo negativo (VPN = 98%) calculado se espera sea una minoría de casos los candidatos a pruebas complementarias.



*Considerar también si el valor de CMI de ceftazidima es mayor al de ceftriaxona y/o cefepime

Figura 2. Propuesta de algoritmo a utilizar en la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México para la determinación del fenotipo BLEE en aislamientos clínicos identificados como *Klebsiella aerogenes* o pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Proteus*.

De hecho, esta medida se origina en función de posibilitar la correcta identificación de la producción de BLEE, tipo CTX-M según el estudio molecular, en el único aislamiento en la cual la prueba ESBL no lo detectó. Se trata de una cepa identificada como *Enterobacter hormaechei* cuya CMI de cefepime fue mayor o igual a 32 (Cuadro 2 y Anexo 1). Por lo que, se hubiera categorizado como sospechosa de un probable falso negativo siendo las pruebas fenotípicas las encargadas de corregir este resultado.

Un análisis más riguroso se deberá desarrollar para los casos en que se obtenga un resultado BLEE positivo con la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de

bioMérieux debido al pobre valor predictivo positivo calculado en este estudio (VPP = 79%) reflejado en el 88% de especificidad reportada. Parámetros que encajan en la afirmación hecha por Farber y colaboradores (2008) de una mejora en la sensibilidad, pero no de especificidad cuando se integra esta prueba ESBL en los paneles de VITEK para la detección de estas enzimas en todas las especies.

En primera instancia, se recomienda evaluar la CMI de ceftriaxona y en cuyos casos esta sea determinada como menor o igual a 2 efectuar la caracterización fenotípica. Concentraciones las cuales a pesar de encasillarse dentro de los valores interpretables como sensibles para el orden de los *Enterobacterales* y fuera de la sospecha de ser portadores de BLEE varios autores coinciden en advertir la existencia de un relativamente alto número de cepas BLEE falsamente notificadas por metodologías automatizadas como sensibles a cefalosporinas de tercera y cuarta generación e incluso el aztreonam según los puntos de corte convencionales. Siendo el corto período de incubación de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos el motivo de este problema, y por ende la extensión de los tiempos de análisis la corrección sugerida más no abierta a manipulación por parte del usuario (Robin et al., 2007; Simon & Glupczynski, 2008; Navarro et al., 2011).

Este comportamiento se plantea como una respuesta al gran número de enzimas con diferentes afinidades por sustratos y la variedad de niveles en la expresión de su actividad enzimática. Razón por la cual, el CLSI recomienda entonces definir como resistentes o incluir una breve nota en el informe de laboratorio advirtiendo el posible fracaso terapéutico si se utiliza penicilinas, cefalosporinas o aztreonam (Simon & Glupczynski, 2008). Empero, el análisis de esta variable se extralimita de los alcances de este proyecto y podrá ser objeto de estudio en posteriores investigaciones.

Asimismo, a esta consideración a partir de la CMI para ceftriaxona, podría también sumarse el evaluar la correspondiente a ceftazidima con el objetivo de reconocer un valor mayor de esta en comparación con el resto de cefalosporinas, cuya explicación, aunque discutida anteriormente ahora concierne en cuanto a que este patrón podría ayudar a sospechar de estos y otros casos como falsos positivos.

Si la interpretación de ceftriaxona es por otra parte resistente o en su defecto con una CMI mayor o igual a 4, dilución doble inmediatamente después de 2, la posibilidad de detectar un verdadero positivo por BLEE aumenta debido a la extrapolación de este valor al de cefotaxima (CLSI, 2022). Antibiótico hidrolizado preferentemente por las CTX-Ms a razón de una mayor afinidad (Farbert et al., 2008), lo cual se complementa con su alta prevalencia reportada (Coral et al., 2020), como se ha mencionado reiteradamente.

Hasta este punto, el algoritmo resulta crucial para el estudio de cepas pertenecientes al género *Morganella* en donde la determinación del valor de CMI para cefepima no se realiza como parte de una limitación de la actual y más reciente versión de VITEK (bioMérieux, 2020). Por lo que, el resultado se define con base en esta única observación. Por ejemplo, solo un exponente de este género fue reportado falsamente como portador de BLEE con un resultado de CMI de 2 y 8 ug/mL para ceftriaxona y ceftazidima, respectivamente (Anexo 3), valores con los cuales se hubiera podido descartar su presencia. Sorpresivamente, también parece ser suficiente para descartar otros resultados similares obtenidos en *Enterobacter* y *Proteus* con base en las CMIs reportadas para estos dos antibióticos (Anexos 1 y 5) sin la necesidad de profundizar con algún otro criterio.

Sin embargo, en el inserto de las tarjetas de VITEK AST se alerta precisamente que para los especímenes de *Enterobacter cloacae* complejo, *Proteus vulgaris* y del género *Morganella* el resultado de ceftriaxona deberá corroborarse mediante otra metodología porque como tal se considera otra de las limitaciones de este sistema automatizado (bioMérieux, 2020).

Por último, para aquellos aislamientos en los que la resistencia a ceftriaxona no representa un criterio con el poder discriminativo necesario para cuestionar la detección de BLEE por parte de la prueba ESBL automatizada, su complemento con el análisis de los valores de CMI de cefepima parece ser la medida resolutive. En específico para tres de las cepas de *Citrobacter* spp y una de *Klebsiella aerogenes*. En donde, aunque para aquellos verdaderos positivos la resistencia hacia esta cefalosporina de cuarta generación pareciera ser categórica en su mayoría, para algunos falsos y otros verdaderos positivos los valores de CMI coinciden hasta los 2

ug/mL (Anexo 2 y 4). Por lo que, se plantea que precisamente este valor sea el punto de corte para el cual todo resultado menor o igual deberá confirmarse.

A su vez, este punto de corte es mínimamente más exigente al establecido por Seral, Pardos y Castillo (2010) al plantear confirmar la detección de BLEE por esta prueba ESBL automatizada incluyendo valores de CMI equivalentes a 2 ug/mL a pesar de que estos autores consideran este resultado como de alta sospecha para el acarreo de BLEE. Premisa fundamentada en los pocos casos de BLEEs con actividad mínima sobre esta cefalosporina de cuarta generación especialmente en portadores de AmpC, como lo son *Citrobacter* y *Klebsiella aerogenes*, siendo excepcionales los casos en donde una hiperproducción originada a partir de una alteración en algún aminoácido, logra hidrolizar este antibiótico.

Cabe destacar que con la aplicación de este algoritmo, aparte de obtener resultados altamente confiables, solo sería necesaria la ejecución de once pruebas de confirmación, de las cuales 9 serían completamente indispensables para corregir los fenotipos erróneos desplegados por el sistema automatizado. Hecho que se traduce en un ahorro económico y de tiempo significativo (Farber et al., 2008) en el reporte final de aproximadamente el 90% de estos aislamientos, atribuyéndose todas las ventajas terapéuticas y epidemiológicas del caso.

En conclusión, dado el muy buen grado de acuerdo y la alta sensibilidad diagnóstica obtenido en este estudio para la prueba ESBL del sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux en la determinación del fenotipo BLEE en aislamientos clínicos de *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. y *Klebsiella aerogenes* con respecto al estándar de referencia basado en caracterización fenotípica; su uso como herramienta de cribado en la detección de este mecanismo de resistencia en la División de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital México representaría un recurso tiempo y costo efectivo. En donde, solo una minoría de la totalidad de casos deberán esperar una confirmación basada en la combinación de varios métodos fenotípicos, esencial para la mejora significativa en la especificidad de los resultados.

Limitaciones y Recomendaciones

El tamaño de muestra utilizado en este proyecto responde a un factor limitante de abastecimiento y costo económico de los recursos necesarios para su desarrollo, así como de la variabilidad en la frecuencia de aislamientos clínicos con los criterios de selección definidos como requisito. Por lo que, el incremento en número de estas unidades poblacionales únicamente dependerá de la solvencia en las variables

anteriormente descritas. No obstante, se recomienda a quienes se propongan extender las dimensiones aquí pautadas estudiar una mayor cantidad de aislamientos por especie bacteriana para establecer conclusiones estadísticamente significativas para cada una de estas más allá de la perspectiva general presentada en esta investigación.

Aunado a esto, debido al desenvolvimiento de este trabajo de manera concomitante a la atención de la pandemia por COVID-19, se prescindió de determinados protocolos de la rutina en función de redirigir los esfuerzos para subsanar las altas demandas de trabajo esencial en un contexto del recargo de funciones para cada una de las divisiones y sus colaboradores. Dentro de estos protocolos en pausa, se destaca el control de calidad en el Laboratorio de Microbiología. Por tanto, se exalta a aquellos interesados en reproducir esta propuesta a implementar un aseguramiento de la calidad del sistema automatizado, los discos de antibióticos, las pruebas epsilométricas y moleculares como parte de los objetivos, lo cual escapó del presente análisis.

Referencias bibliográficas

Aguilar, D. (2016). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*, 22(2), 57-63.

Bariani, L. (2015). *Detección y caracterización genética de Betalactamasas y Betalactamasas de espectro extendido en aislamientos de enterobacterias.*

bioMérieux. (2020). *VITEK®2 AST-N402*. España.

- Brolund, A. (2014). Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infection ecology & epidemiology*, 4(1), 24555.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Caja Costarricense del Seguro Social. (2014). *Lista oficial de medicamentos y normativa*.
- CLSI. (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 32^{ava} Edición. CLSI guideline M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coral, D., Yauri, M. F. & Alcocer, I. (2020). Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados bacterianos clínicos de la familia *Enterobacteriaceae*. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 42(1): 63-77.
- Farber, J., Moder, K. A., Layer, F., Tammer, I., König, W., & König, B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase detection with different panels for automated susceptibility testing and with a chromogenic medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3721-3727.
- García, C. S., de la Gándara, M. P., & García, F. J. C. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 12-18.
- Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J. L., Jarlier, V., & Robert, J. (2011). Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β -lactamase production by *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 49(3), 1048-1057.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., ... & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 1-4.
- Hospital Clínico San Borja de Arriarán. (2019). *Programa de uso racional de antibióticos. Guía para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas frecuentes en el adulto hospitalizado*. Unidad de Infectología, Servicio de Medicina.

- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534.
- Polfuss, S., Bloemberg, G. V., Giger, J., Meyer, V., Böttger, E. C., & Hombach, M. (2012). Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology and infection*, 18(12), 1194-1204.
- Riveros, W. A. R., Cepeda, D. A., Lozano, D. C., & Ladino, K. N. S. (2021). Nuevos inhibidores de betalactamasas: actualidad y aplicación en la práctica. *Hechos Microbiológicos*, 12(1), 41-55.
- Simon, A. & Glupczynski, Y. (2008). *ESBLs: Detection, Surveillance, Prevention and Control*. bioMérieux S.A. Marcy l'Etoile, Francia.
- Singh, R. M., & Singh, H. L. (2014). Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(04), 408-415.
- Spanu, T., Sanguinetti, M., Tumbarello, M., D'Inzeo, T., Fiori, B., Posteraro, B., ... & Fadda, G. (2006). Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3257-3262.
- Stuart, J. C., Diederer, B., Al Naiemi, N., Fluit, A., Arents, N., Thijsen, S., ... & Leverstein-van Hall, M. (2011). Method for phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases in enterobacter species in the routine clinical setting. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2711-2713.
- Urquiza, G., Arce, J., & Alanoca, G. (2018). Resistencia bacteriana por beta lactamasas de espectro extendido: un problema creciente. *Revista Médica La Paz*, 24(2), 77-83.
- Villanueva, R. V. (2017). El costo en el tratamiento de pacientes con infección urinaria según diagnóstico de betalactamasa de espectro extendido positivo en el Hospital Sergio Bernales 2015. Universidad César Vallejo, Perú.

Anexos

Anexo 1. Perfil de resistencia a las cefalosporinas analizadas por el sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para los 48 aislamientos de *Enterobacter* spp. seleccionados para el estudio en conjunto con el resultado de BLEE determinado por esta misma metodología y el estándar de referencia.

No.	Identificación	CMI (µg/mL)				BLEE	
		Cefazolina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Vitek	Estándar
01	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG

02	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	4	NEG	NEG
03	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	32	1	POS	POS
04	<i>Enterobacter hormaechei</i>	≥64	≥64	≥64	≥32	NEG	POS
05	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	POS	POS
06	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	2	16	0.5	POS	NEG
07	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
08	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
09	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	≥32	POS	POS
10	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
11	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
12	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	8	NEG	NEG
13	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	0.25	NEG	NEG
14	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
15	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	POS	POS
16	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	8	0.25	≤0.12	NEG	NEG
17	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
18	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	2	POS	POS
19	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	16	32	0.5	POS	POS
20	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	2	NEG	NEG
21	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	No realizado	NEG	NEG

22	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	No realizado	No realizado	≥64	4	NEG	NEG
23	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	2	POS	POS
24	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
25	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	8	POS	POS
26	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	0.5	POS	POS
27	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
28	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
29	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	1	NEG	NEG
30	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	16	≥64	0.5	POS	POS
31	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	8	NEG	NEG
32	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
33	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	4	NEG	NEG
34	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	4	NEG	NEG
35	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	16	32	1	POS	POS
36	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
37	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
38	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
39	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
40	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	0.5	POS	POS
41	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG

42	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	32	≥64	1	POS	POS
43	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
44	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	2	POS	POS
45	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	≥64	0.25	NEG	NEG
46	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	32	16	POS	POS
47	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	≥64	32	≥32	POS	POS
48	<i>Enterobacter cloacae</i> complejo	≥64	1	4	1	POS	NEG

Anexo 2. Perfil de resistencia a las cefalosporinas analizadas por el sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para los 15 aislamientos de *Citrobacter* spp. seleccionados para el estudio en conjunto con el resultado de BLEE determinado por esta misma metodología y el estándar de referencia.

No.	Identificación	CMI (µg/mL)				BLEE	
		Cefazolina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Vitek	Estándar
01	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	≤1	NEG	NEG
02	<i>Citrobacter koseri</i>	≥64	≥64	8	≥32	POS	POS
03	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	≥32	POS	POS
04	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	32	0.5	NEG	NEG
05	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.25	NEG	NEG
06	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
07	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
08	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	2	POS	NEG
09	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
10	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
11	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	1	POS	NEG

12	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
13	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
14	<i>Citrobacter freundii</i>	≥64	≥64	≥64	2	NEG	NEG
15	<i>Citrobacter werkmanii</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	POS	NEG

Anexo 3. Perfil de resistencia a las cefalosporinas analizadas por el sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para los 14 aislamientos de *Morganella* spp. seleccionados para el estudio en conjunto con el resultado de BLEE determinado por esta misma metodología y el estándar de referencia.

No.	Identificación	CMI (µg/mL)			BLEE		
		Cefazolina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Vitek	Estándar
01	<i>Morganella morganii</i>	≥64	8	8	No realizado	NEG	NEG
02	<i>Morganella morganii</i>	≥64	≥64	≤1	No realizado	POS	POS
03	<i>Morganella morganii</i>	≥64	0.5	2	No realizado	NEG	NEG
04	<i>Morganella morganii</i>	≥64	0.5	2	No realizado	NEG	NEG
05	<i>Morganella morganii</i>	≥64	0.5	2	No realizado	NEG	NEG
06	<i>Morganella morganii</i>	≥64	0.5	2	No realizado	NEG	NEG
07	<i>Morganella morganii</i>	≥64	2	16	No realizado	NEG	NEG
08	<i>Morganella morganii</i>	≥64	8	≥64	No realizado	NEG	NEG
09	<i>Morganella morganii</i>	≥64	≤0.25	2	No realizado	NEG	NEG
10	<i>Morganella morganii</i>	≥64	4	≥64	No realizado	NEG	NEG
11	<i>Morganella morganii</i>	≥64	32	≥64	No realizado	NEG	NEG
12	<i>Morganella morganii</i>	≥64	2	16	No realizado	NEG	NEG
13	<i>Morganella morganii</i>	≥64	≥64	2	No realizado	POS	POS

14	<i>Morganella morganii</i>	≥64	2	8	No realizado	POS	NEG
----	----------------------------	-----	---	---	-----------------	-----	-----

Anexo 4. Perfil de resistencia a las cefalosporinas analizadas por el sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para los 12 aislamientos de *Klebsiella aerogenes* seleccionados para el estudio en conjunto con el resultado de BLEE determinado por esta misma metodología y el estándar de referencia.

No.	Identificación	CMI (µg/mL)				BLEE	
		Cefazolina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Vitek	Estándar
01	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	0,25	NEG	NEG
02	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	≥32	POS	POS
03	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
04	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	≥32	POS	POS
05	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	4	NEG	NEG
06	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
07	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	0.5	NEG	NEG
08	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	≥32	POS	POS
09	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	0.25	NEG	NEG
10	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	2	POS	NEG
11	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	2	POS	POS
12	<i>Klebsiella aerogenes</i>	≥64	≥64	≥64	2	POS	POS

Anexo 5. Perfil de resistencia a las cefalosporinas analizadas por el sistema automatizado VITEK® 2 de bioMérieux para los 8 aislamientos de *Proteus* spp. seleccionados para el estudio en conjunto con el resultado de BLEE determinado por esta misma metodología y el estándar de referencia.

No.	Identificación	CMI (µg/mL)				BLEE	
		Cefazolina	Ceftriaxona	Ceftazidima	Cefepima	Vitek	Estándar
01	<i>Proteus hauseri</i>	≥64	2	4	≤1	POS	NEG

02	<i>Proteus mirabilis</i>	≥64	≥64	2	16	POS	POS
03	<i>Proteus mirabilis</i>	≤4	≤0.25	≤0.12	≤0.12	NEG	NEG
04	<i>Proteus mirabilis</i>	≥64	≥64	0.5	2	POS	POS
05	<i>Proteus mirabilis</i>	≥64	≥64	8	16	POS	POS
06	<i>Proteus mirabilis</i>	≥64	≥64	2	8	POS	POS
07	<i>Proteus vulgaris</i>	≥64	≥64	0.5	≤0.12	NEG	NEG
08	<i>Proteus mirabilis</i>	≥64	≥64	2	8	POS	POS
