



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia

Departamento de Bacteriología-Micología

**Tesis para optar por el título de Máster en
Bacteriología - Micología Médica**

**Determinación de susceptibilidad a la colistina en
aislados clínicos de enterobacterias, evaluación de
métodos y antibiogramas. Instituto “Pedro Kourí”,
2015 – 2018**

Autora: Q.F. Karla Estefanía Pacheco Cárdenas

La Habana, 2019



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia

Departamento de Bacteriología-Micología

Tesis para optar por el título de Máster en

Bacteriología - Micología Médica

**Determinación de susceptibilidad a la colistina en
aislados clínicos de enterobacterias y evaluación de
métodos y antibiogramas. Instituto “Pedro Kourí”,
2015 – 2018**

Autora: Q.F. Karla Estefanía Pacheco Cárdenas

Tutoras: Dra. Dianelys Quiñones Pérez, Dr C
Dra. Yenisel Carmona Cartaya, MsC

Asesora: Dra. Mislady Rodríguez Ortega, MsC

La Habana, 2019

A Dios por proveer la sabiduría y la oportunidad para escalar un peldaño más en mi vida profesional.

A mis padres, hermanos y sobrinito por el apoyo, amor, entrega y sobre todo por no detener mis pasos, aunque estos me aparten de ellos con la única finalidad de verme feliz y realizada.

Al hombre, amigo y confidente que la vida puso en mi camino Jhonnatan, a ti mi amor por ser mi compañero valiente y nunca soltar mi mano en el largo camino recorrido juntos.

Agradecimientos

Al personal docente, sobre todo a Dra. Thelma, sabia consejera, mil gracias por no dejarme sola en todo este trayecto y por velar siempre por mis intereses. A Marelys por su amistad y apoyo incondicional.

Al personal del LNR-IAAS, mis tutoras, Dra. Dianelys Quiñones por darme la oportunidad de elaborar mi tesis de investigación en tan prestigioso laboratorio por su colaboración, enseñanza y amistad. Dra. Yennisel gracias profe por su cariño e incesante esfuerzo en las largas horas de duro trabajo. Niurka y María Karla por las charlas y momentos de risa, importantes para levantarme el ánimo en los momentos difíciles.

A mi asesora Dra. Mislady Rodríguez por brindarme sus conocimientos y siempre con una sonrisa resolver mis dudas.

A Jenny Laura, mi amiga y profesora, por estar para mí en todo momento codo a codo en el arduo y difícil trabajo, gracias por toda la enseñanza brindada, las risas, los bellos momentos.

A mis profes Gilda, Bryan, Onelkis y Ángel, por ser tan grandes y maravillosas personas, por tener el tiempo, el cariño y la paciencia, de explicar paso a paso cada conocimiento brindado.

A Ana María por levantar mis fuerzas con sus consejos y su grandioso café, aprecio tantos momentos regalados por tan bella persona.

A mis compañeros de maestría Brenda, Camilo, Ruxana, Xavy, Yandy por su amistad y aliento para continuar en los momentos de cansancio, aunque las fuerzas estuviesen desvanecidas.

A todo el personal docente del Departamento de Microbiología y destacar además a Gerardo, Carlos y Ma. Teresa por su preocupación para que todo lo planificado saliera a tiempo. Por su calidad humana y profesional muchas gracias.

Si pudiera extenderme con todos los agradecimientos no me alcanzaría las hojas de esta tesis para nombrarlos, por tanto, agradezco al Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí por los conocimientos adquiridos en mi estancia en este país.

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

EPC: Enterobacterias Productoras de Carbapenemasa

EUCAST: Comité Europeo de Susceptibilidad Antimicrobiana

IAAS: Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria

KPC: *Klebsiella* productora de carbapenemasas

LNR-IAAS: Laboratorio Nacional de Referencia de las Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria.

LNR-IAAS/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia de las Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria/ Instituto Pedro Kourí

LPS: Lipopolisacárido

mcr-1: Resistencia transferible a colistina

MDR: Multidrogorresistencia

Minsap: Ministerio de Salud Pública

NDM: New Delhi Metalo Betalactamasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDR: Pandrogorresistencia

ReLAVRA: Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos

VIM: Verona Integrón Metalo Betalactamasa

XDR: Extremodrogorresistencia

La escasez de nuevos antibióticos resurge la colistina para el tratamiento de las infecciones por patógenos gram negativos multidrogorresistentes principalmente, enterobacterias, en instituciones de salud. Por tanto, es importante conocer la susceptibilidad a este antibiótico y disponer de metodologías robustas para su correcta interpretación *in vitro*. Se realizó un estudio descriptivo ambispectivo en el Laboratorio Nacional de Referencia de las Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria del Instituto Pedro Kourí que incluyó 130 aislados de enterobacterias procedentes de 24 hospitales de ocho provincias de Cuba. Se identificaron las especies por métodos bioquímicos, se determinó la susceptibilidad a la colistina por el método de microdilución en caldo y se evaluaron los métodos de difusión en gradiente E-test, elución de discos y predifusión con tabletas de colistina. Además, se determinaron los antibiotipos en los aislados objetos de estudio. Se obtuvieron 17 aislados resistentes a la colistina, el 41% provenientes de las unidades de cuidados intensivos y de muestras de hemocultivo donde *K. pneumoniae* fue la más representativa (70%). Los métodos de elución de discos y predifusión con tabletas de colistina mostraron concordancia adecuada, a diferencia de la pobre robustez del método E-test. El 68% de los antibiotipos fueron multidrogorresistentes, 20% extremodrogorresistente y 6% pandrogorresistentes. La elución de discos y predifusión con tabletas de colistina son herramientas útiles para la determinación correcta de la susceptibilidad a colistina. La multidrogorresistencia, extremodrogorresistencia y pandrogorresistencia con la resistencia a colistina añadida, pone de manifiesto la dificultad del manejo terapéutico en las infecciones graves por enterobacterias en hospitales cubanos.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS.....	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	5
	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	5
	Resistencia antimicrobiana	6
	Mecanismos de resistencia.....	6
	Situación actual de la resistencia de enterobacterias a antimicrobianos de uso clínico	10
	Colistina	13
	Historia.....	13
	Mecanismo de acción de Colistina	13
	Actividad antimicrobiana	14
	Mecanismos de resistencia	15
	Diagnóstico de resistencia a la colistina <i>in vitro</i> en laboratorios de microbiología	16
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	IV.1. Diseño metodológico	19
	IV.2. Definición y clasificación de las variables	19
	IV.3. Criterios de exclusión	21
	IV.4. Recolección de la información	21
	IV.5. Procedimientos de laboratorio	21
	IV.5.1. Conservación de aislados	21
	IV.5.2. Identificación de especies	21
	IV.5.3. Determinación de la susceptibilidad a la colistina por el método microdilución en caldo	22
	IV.5.4. Evaluación del desempeño de los métodos fenotípicos para determinar la susceptibilidad a la colistina	23

IV.5.4.2. Elución de discos de colistina	24
IV.5.5. Detección de antibiotipos en aislados clínicos objeto de estudio	26
IV.5.6. Procedimientos estadísticos y análisis de datos	27
IV.5.7.Aspectos éticos.....	28
Conflicto de intereses	29
Aspectos de Bioseguridad	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. BIBLIOGRAFÍA	46
IX. ANEXOS	55

I. INTRODUCCIÓN

La colistina es un antibiótico polipeptídico de la familia de las polimixinas que se introdujo en la práctica clínica en los años 50. A pesar de su efectividad sobre bacilos gram negativos, a partir de la década de los ochenta quedó en desuso por la aparición de nuevos antibióticos de menor toxicidad (1, 2).

El incremento de la resistencia antimicrobiana y el escaso desarrollo de nuevos antibióticos propician la incidencia elevada de patógenos gram negativos multidrogorresistentes (MDR). Esto demandó el resurgimiento de la colistina como terapia de última línea frente a las infecciones por aquellos resistentes a casi todos los antimicrobianos aprobados para su uso clínico, es decir extremadamente resistentes (XDR, por sus siglas en inglés) (1, 3). De aquí la importancia y la necesidad de conocer la susceptibilidad en enterobacterias a este antimicrobiano, como una de las alternativas terapéuticas en los pacientes infectados.

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo heterogéneo de bacterias donde se destacan: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, entre otros, por su elevada morbimortalidad relacionada con la resistencia a los antimicrobianos, principalmente, en instituciones de salud. Los antimicrobianos que más se afectan por esta resistencia son: las cefalosporinas de amplio espectro por la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); los carbapenémicos por la producción de carbapenemasas; las fluoroquinolonas por mutaciones en las topoisomerasas; los aminoglucósidos por enzimas modificantes y la colistina por modificaciones en los lipopolisacáridos. Esto constituye una amenaza global que ensombrece aún más las opciones terapéuticas para el control de infecciones por enterobacterias (3-5).

Hasta 2015, las mutaciones cromosómicas fueron la única causa conocida de resistencia adquirida a las polimixinas. En ese año, se documenta, por primera vez, la resistencia plasmídica a colistina mediada por el gen *mcr-1* (*Mobile Colistin Resistance*, por sus siglas en inglés) en aislados de *E. coli* en carne cruda, animales y pacientes hospitalizados (6, 7).

I. *Introducción*

Posterior a este reporte se connota la diseminación y presencia de resistencia a la colistina en pacientes ambulatorios, razón por la cual el protocolo de trabajo Red WHONET de Argentina en 2017, propone evaluar la susceptibilidad a la colistina en la comunidad, como pesquisa para la detección del gen *mcr-1* (8, 9).

En la última década se constata un incremento de la resistencia a la colistina en diferentes continentes como Europa, África y Asia (10-15). Las Américas no queda exenta a ésta problemática, si se considera que la resistencia a este antibiótico oscila entre el 2 al 10% en las tres regiones Norte, Centro y Sur América, con el reporte incluso, de patógenos portadores del gen *mcr-1* en Estados Unidos, Paraguay, Chile, Argentina, Venezuela, Ecuador y Perú (16-22), lo que constituyó una alerta epidemiológica para la región (23).

La determinación de la correcta susceptibilidad a la colistina se convierte en un pilar imprescindible para los laboratorios de microbiología, lo que constituye un desafío por la naturaleza catiónica de sus moléculas, la pobre difusión en agar, la heterogeneidad de su composición y el fenómeno de heterorresistencia. Esto hace que la interpretación de los resultados y la correlación clínica sea un reto aún no resuelto (1, 24).

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*CLSI*, por sus siglas en Inglés), en 2016, establece los métodos de evaluación de susceptibilidad a la colistina en tres categorías: los de referencia (la microdilución y macrodilución en caldo, dilución en agar y la PCR para detección del gen *mcr-1*); los aceptados (elución de discos de colistina, predifusión con tabletas de colistina, sensitire, walkaway microscan, COL-Agar Spot, COLTEST, rapid polymyxin NP test) y los cuestionados (difusión de discos, tiras de gradientes, VITEK2, PHOENIX) (24, 25).

En Cuba, se emplea el antibiograma por difusión de discos o difusión en gradiente (*E-test*) para determinar la susceptibilidad a la colistina por lo que se utilizan los métodos cuestionados. Por tal motivo, se considera oportuno comparar los métodos de elución de disco y predifusión (no aplicados previamente en el país), con la microdilución en caldo, técnica de referencia internacional, para avalar científicamente su desempeño en la determinación de la susceptibilidad a la

I. Introducción

colistina y valorar su introducción en la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología del país, ante la no disponibilidad de un método eficiente a este nivel.

El método de elución de discos de colistina se basa en dejar eluir discos de colistina a una concentración conocida en un mismo volumen de caldo para obtener concentraciones seriadas y así conocer la concentración mínima inhibitoria (CIM) de este antimicrobiano, mientras que, el método de predifusión con tabletas de colistina está fundamentado en mejorar la difusión de la colistina en el agar por un período de tiempo más prolongado al de la difusión estándar, lo que evidencia que son técnicas de fácil realización para la evaluación de la susceptibilidad a la colistina en la Red de Laboratorios de Microbiología (26, 27).

Cómo se mencionó anteriormente, el *E-test* se considera un método cuestionado debido a su baja sensibilidad y especificidad en la evaluación de la susceptibilidad a la colistina (24), pero teniendo en cuenta que, es una de las metodologías implementadas en la red de laboratorios bajo un presupuesto planificado por el Ministerio de Salud Pública (Minsap) para apoyar la vigilancia de la resistencia bacteriana en Cuba, se considera importante contar con evidencias científicas para proponer la no utilización del mismo. Por todo lo anterior, se consideró importante evaluar el desempeño del *E-test* en la determinación de la resistencia a la colistina en aislados cubanos de enterobacterias.

Hipótesis de trabajo

En Cuba la resistencia a la colistina en aislados clínicos de enterobacterias con antibiogramas multidrogaresistentes varía según especie, tipo de muestra y servicios afectados, donde el método de difusión en gradiente *E-test* muestra baja concordancia con el método de microdilución en caldo (referencia), a diferencia de los métodos elución de disco y de predifusión con tabletas.

II. OBJETIVOS

1. Determinar la susceptibilidad a la colistina en aislados clínicos de enterobacterias, mediante el método de referencia internacional y la distribución de aislados resistentes según especie, tipo de muestra y servicios afectados.
2. Evaluar el desempeño de tres métodos fenotípicos para determinar la susceptibilidad a la colistina en aislados clínicos de enterobacterias.
3. Determinar los antibiotipos acorde a la clasificación multidrogorresistente, extremodrogorresistente y pandrogorresistente.

III. MARCO TEÓRICO

Familia *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son una familia heterogénea y amplia de bacterias gram negativas causantes de un número considerable de infecciones.

A pesar que muchos miembros de esta familia forman parte de la flora comensal estable o transitoria del tracto intestinal humano y animal, algunos actúan como patógenos oportunistas en pacientes con inmunidad conservada o con diferentes situaciones de inmunodepresión y causan infecciones secundarias en los tractos respiratorio, urinario y en el sistema circulatorio (28).

Las especies de esta familia se caracterizan por ser bacterias anaerobias facultativas, con forma bacilar o cocobacilar. Desde el punto de vista bioquímico metabolizan la glucosa de forma fermentativa, reducen nitratos a nitritos y carecen de actividad citocromooxidasa (29, 30).

Su envoltura, conformada por una estructura multilaminar, donde la membrana interna o citoplasmática consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa externa consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico rico en proteínas. La membrana externa, la más compleja, consiste en una capa doble de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) conformados a su vez por el antígeno O, núcleo y el lípido A o endotoxina que constituye un importante factor de virulencia; porinas, que facilitan el paso de diversas sustancias incluidos los antibióticos y otras proteínas de la membrana externa.(Figura III.1) (29, 31).

Entre las proteínas se puede hablar de organelos complejos que irradian al exterior de la bacteria como los flagelos útiles para la locomoción, fimbrias que sirven como adhesinas y pilis sexuales presentes en bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN (29).

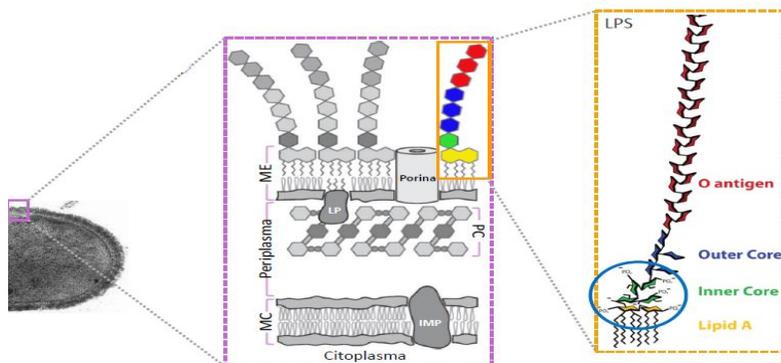


Figura III.1. Estructura de la membrana y pared celular de enterobacterias. Puerta A, 2010 (29).

Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se puede definir como la aparición de cepas refractarias al efecto inhibitorio (bacteriostático) o letal (bactericida) del antimicrobiano (32). La resistencia bacteriana es un problema de salud pública a nivel mundial en donde la consecuencia principal para su desarrollo es la sobreutilización de agentes antimicrobianos lo que se refleja en la exacerbación de mecanismo de resistencia y en la disminución de alternativas para el tratamiento de las infecciones (33).

Mecanismos de resistencia

Teniendo en cuenta que las bacterias gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos puede llevar a falla terapéutica, es importante conocer los más prevalentes:

1. **Bombas de expulsión:** ejercen su acción al tomar el antimicrobiano del espacio periplásmico y expulsarlo al exterior, con la finalidad de evitar que llegue a su sitio de acción. La importancia trascendental de este mecanismo de resistencia irradia en su sobre expresión en bacterias gram negativas lo que deriva en resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos (34).
2. **Alteraciones de la permeabilidad:** se altera principalmente por modificación de porinas. Las porinas son proteínas que forman canales de agua embebidos en la membrana externa y su función es regular la entrada de moléculas, entre ellas los antimicrobianos (5).

III. Marco teórico

La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico, pero la fusión con otro mecanismo de resistencia confiere altos niveles de resistencia y consecuentemente ocasiona fallos terapéuticos.

3. Alteraciones del sitio de acción: el cambio en la estructura donde los antimicrobianos ejercen su acción es otro mecanismo de resistencia, los sitios activos se pueden encontrar en diferentes componentes bacterianos que involucran actividades celulares vitales (34).
4. Inactivación enzimática: el principal mecanismo por el cual las bacterias crean cambios e inactivan a los antimicrobianos es por expresión de enzimas con función de hidrólisis, así tenemos:

- Betalactamasas

Las betalactamasas engloban un grupo muy heterogéneo de enzimas capaces de inactivar los betalactámicos, se clasifican según la estructura, la función, las sustancias que las inhiben y según el nivel de expresión (35). Son capaces de romper el anillo betalactámico, producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas y así evitar la unión del antibiótico a las proteínas transportadoras PBP (Proteínas Fijadoras de Penicilinas), con lo cual impiden la desestabilización de la pared bacteriana (35).

- Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Son enzimas que se reportan en múltiples especies bacterianas, las más frecuentes son *Klebsiella spp* y *E. coli*. Las BLEE son mediadas por plásmidos lo cual confiere una increíble capacidad de diseminación entre diferentes especies, además el mismo plásmido que porta el gen de resistencia de estas enzimas puede codificar resistencia a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas y Trimetropim/sulfametoxazol (36).

Son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por la hidrólisis que ejercen frente a cefalosporinas de segunda y tercera generación, monobactámicos, por su

incapacidad de hidrolizar a cefamicinas y carbapenémicos y por ser inhibidas por inhibidores de las betalactamasas (34).

Dentro de las BLEE de mayor importancia clínica destacan TEM, SHV y CTX-M. Se las puede caracterizar debido al espectro de hidrólisis que presentan frente a cefalosporinas es así que, TEM y SHV hidrolizan a ceftazidima con mayor eficacia que a ceftriaxona o cefotaxima, mientras que CTX-M hidroliza a cefotaxima, ceftriaxona y cefepime más rápidamente que ceftazidima (37-39).

- Betalactamasas tipo AmpC

Denominadas también cefalosporinasas, son enzimas activas frente a cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas, aztreonam e inhibidores de betalactamasas. Dichas enzimas se pueden codificar a nivel cromosomal como el caso de AMPCES (*Aeromonas spp*, *Morganella morganii*, *Providencia spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp* indol positivo, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp* y *Serratia spp*) y a nivel plasmídico como en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Salmonella spp* (34, 40).

- Carbapenemasas

Son enzimas con capacidad de hidrolizar a toda la familia de betalactámicos incluidos los carbapenémicos, se pueden encontrar codificadas tanto a nivel cromosomal como estar presentes en elementos genéticos móviles.

En enterobacterias se reporta una gran variedad de carbapenemasas que según la clasificación de Ambler se dividen en dos grupos. (Figura III.2)

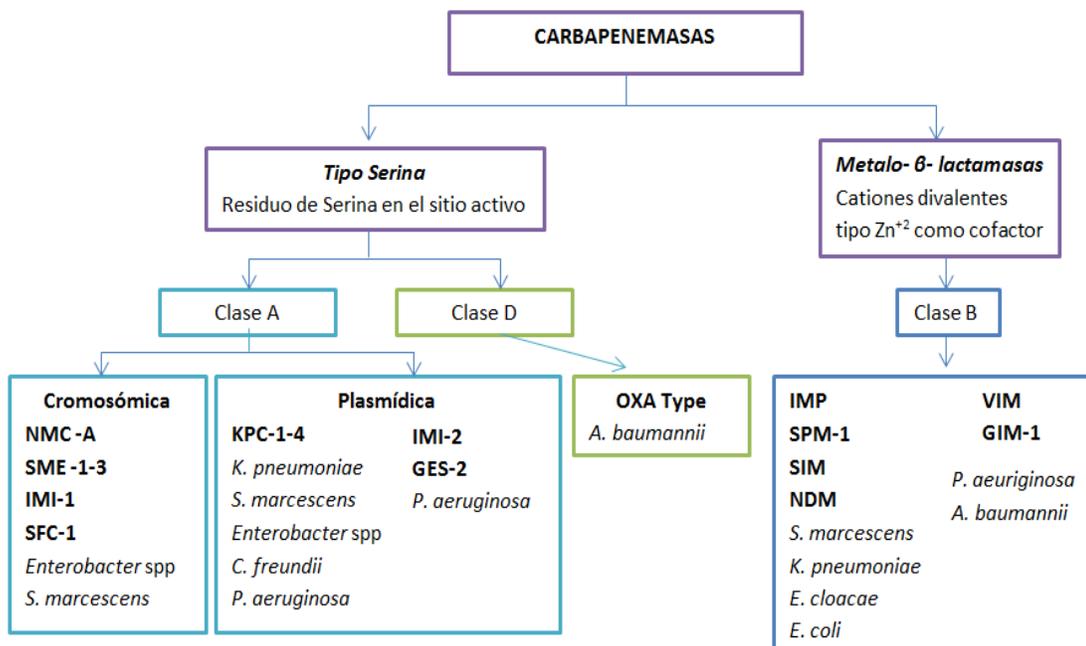


Figura III.2. Clasificación de carbapenemasas según la clasificación de Ambler. Tafur J, 2008 (34)

- Clase A de Ambler (serín carbapenemasas): son betalactamasas que se inhiben en mayor o menor medida por la acción del ácido clavulánico y del ácido fenilborónico e hidrolizan de forma efectiva a los carbapenémicos, cuya mayor eficacia es frente a imipinem (41).
- Clase D de Ambler (oxacilinasas): son enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas de primera generación y débilmente a los carbapenémicos, no hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación ni el aztreonam y son altamente resistentes a temocilina. Debido a su baja actividad contra carbapenémicos, las oxacilinasas tienen la capacidad de conferir resistencia a los carbapenémicos cuando la bacteria expresa algún otro mecanismo de resistencia, como el cierre de porinas y la expresión exagerada de bombas de expulsión (34).
- Clase B según la clasificación de Ambler (metalo betalactamasas): presentan actividad hidrolítica frente a los betalactámicos excepto aztreonam, no se inactivan por ningún inhibidor de betalactamasas y se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y ácido dipicolínico (34, 40).

Situación actual de la resistencia de enterobacterias a antimicrobianos de uso clínico

En la última década la resistencia bacteriana a los antibióticos se incrementó de forma drástica, alcanzando niveles sin precedentes. Esto afecta de forma muy importante la práctica clínica y se convierte en una amenaza para la salud pública a nivel mundial, motivo por el cual la OMS (Organización Mundial de la Salud) considera a las infecciones que causan los microorganismos multirresistentes como una de las enfermedades emergentes (42).

Las infecciones por patógenos resistentes se asocian con estancias hospitalarias prolongadas, mayores tasas de fracaso terapéutico, aumento de la mortalidad y un incremento en los costos derivados de la atención clínica que amenaza la sostenibilidad de cualquier sistema de salud. Entre los factores más importantes relacionados con la selección y diseminación de bacterias multirresistentes se encuentran, el uso inapropiado de antibióticos y la aplicación ineficiente de las medidas de barrera, la higiene de manos, limpieza y desinfección (4).

No existe una definición universalmente aceptada de bacteria multirresistente que sea aplicable a todas ellas; el concepto puede tener matices diferentes en función del enfoque ya sea clínico, microbiológico o epidemiológico (43).

Desde la perspectiva microbiológica adaptada por *ReLAVRA* (Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos) los gérmenes MDR, se definen como aquellos en los que se manifiesta la ausencia de sensibilidad a tres de doce familias de antibióticos consideradas de utilidad para el tratamiento. Cuando el nivel de la resistencia incrementa se encuentra a gérmenes XDR, definidos como aquellos en que la ausencia de sensibilidad afecta a once de doce familias de antibióticos testeados y por consiguiente, en el último nivel de resistencia tenemos a gérmenes pandrogorresistentes (PDR) que se caracterizan por la ausencia de sensibilidad a los doce antibióticos comúnmente probados en los laboratorios clínicos para detección de fenotipos de resistencia (44, 45) (Tabla III.1).

Tabla III.1. Antimicrobianos propuestos por *ReLAVRA* para facilitar el monitoreo de resistencia múltiple.

Definición	Grupos de antibióticos
MDR Resistente a 3 de los 12 grupos de antibióticos	Amoxicilina ác. clavulánico, o ampicilina sulbactam
	Piperacilina tazobactam
XDR Resistente a 10/11 de los 12 grupos de antibióticos	Ceftazidima, o cefotaxima/ceftriaxona, o cefepime
	Imipenem, o meropenem
	Aztreonam
	Gentamicina
PDR Resistente a 12 de los 12 grupos de antibióticos	Amikacina
	Ciprofloxacina
	Trimetoprima sulfametoxazol
	Fosfomicina
	Tigeciclina
	Colistina

Las primeras descripciones de las bacterias multirresistentes se corresponden con la aparición de las BLEE en 1983, aunque su verdadera incidencia se desconoce, se sabe que la producción de BLEE por *E. coli* y *K. pneumoniae* está en aumento entre un 10 a 40% (39, 46).

En la década de los ochenta, poco después de la comercialización de las cefalosporinas de amplio espectro, se registra por vez primera en el Este de Europa la presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas tipo CTX-M (47). Paulatinamente el uso y abuso de carbapenémicos para el tratamiento de bacterias productoras de BLEE incrementa la creciente amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) (48).

Se denomina EPC a cualquier enterobacteria en la que se demuestre mediante un ensayo microbiológico o espectrofotométrico la producción de una carbapenemasa en la que los valores de la CIM de al menos un antibiótico carbapenémico, sea igual o superior al punto de corte de resistencia establecido por EUCAST

III. Marco teórico

(Comité Europeo de la Susceptibilidad Antimicrobiana, por sus siglas en inglés) o por las normas del *CLSI* (49).

Las carbapenemasas son los miembros más versátiles de la familia de las betalactamasas debido a su capacidad para hidrolizar tanto los antibióticos betalactámicos tradicionales como los carbapenémicos, que representan los últimos antibióticos de espectro más amplio disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas gram negativas (33). La aparición de las carbapenemasas es constante en el tiempo, es así que, al recabar la historia se constata que las primeras carbapenemasas transferibles descritas en gram negativos fueron de la clase metalo betalactamasas del tipo IMP (Imipenemasa) en un aislado clínico de *P. aeruginosa* en Japón en 1991 y posteriormente en *S. marcescens*. En 2001 se describe la primera EPC del tipo KPC-1 (*Klebsiella* Productora de Carbapenemasa) en Carolina del Norte, desde entonces su diseminación a nivel mundial estableciéndose en Grecia e Israel (50). A principios de 2003 por una diseminación de enterobacterias en hospitales de Grecia junto con brotes en hospitales de Francia y España se detectaron EPC del tipo VIM (del inglés Verona Integron Metalo Betalactamasa) (31).

En 2006 se describieron los primeros casos de EPC tipo OXA-48 en un brote en Turquía con posterior diseminación a Europa y África (31). Desde 2008 la detección de carbapenemasas tipo NDM-1 (del inglés New Delhi Metalo Betalactamasa) se convirtió en endémica en todo el sur de Asia y los países balcánicos, y se implica en las infecciones nosocomiales que evoluciona por brotes en todos los continentes habitados (51) .

Un aspecto importante a destacar es que con frecuencia las EPC también son portadoras de otras resistencias, tanto a betalactámicos como a otros grupos de antibióticos, lo que contribuye a la aparición de los fenómenos de multirresistencia, resistencia extrema o incluso, pandrogresistencia antibiótica.

En la última década el incremento global en el reporte de infecciones XDR por enterobacterias resistentes a carbapenémicos y con susceptibilidad solamente a la colistina y la tigeciclina, es lo que genera un gran impacto clínico al reducir

sustancialmente las opciones terapéuticas, mucho más cuando el desarrollo e investigación de nuevas moléculas ha declinado en todo el mundo, lo cual conlleva al resurgimiento de antimicrobianos abandonados en la práctica clínica como el caso de las polimixinas (3).

Colistina

Historia

Las polimixinas pertenecen a un grupo de antibióticos descubiertos en 1947, aislados de *Paenibacillus polymyxa* de los que derivaron cinco diferentes compuestos de polimixinas desde la A hasta la E, pero clínicamente solo B y E se consideran de uso terapéutico y se emplearon en la clínica durante dos décadas, sin embargo su uso se discontinuó por problemas de toxicidad renal, neuronal y por el amplio desarrollo de nuevos agentes activos sobre bacilos gram negativos mejor tolerados (1, 21).

No obstante y como se constata, el incremento sostenido e insospechado de la resistencia antimicrobiana y la falta de nuevos antibióticos para combatir a estos patógenos nos impulsa a recurrir a un antimicrobiano del grupo de las polimixinas, debido a que en nuestro medio solo se dispone para uso sistémico de polimixina E (colistina), nos enfocaremos en el análisis de este sub-grupo (2, 52).

Mecanismo de acción de Colistina

La colistina es un antimicrobiano bactericida que actúan a nivel del LPS el mismo que está conformado por el antígeno O, el núcleo y el lípido A o endotoxina que funciona como ancla del LPS a la membrana externa (figura III.1). El lípido A es específicamente el sitio diana para la acción de la colistina ya que presenta una fuerte carga neta negativa conferida por los aniones fosfato y carboxilato que componen la capa de LPS (21, 53).

III. Marco teórico

De forma esquemática se puede dilucidar que se produce por los siguientes mecanismos:

Al ser moléculas catiónicas rompen la membrana celular bacteriana por actividad electrostática desplazando los iones de calcio y magnesio (21).

Al ser agentes anfipáticos penetran en la membrana bacteriana e interactúan con sus componentes fosfolípidicos lo que conlleva a la desestructuración de la misma, el acceso del fármaco y en consecuencia su efecto bactericida (2).

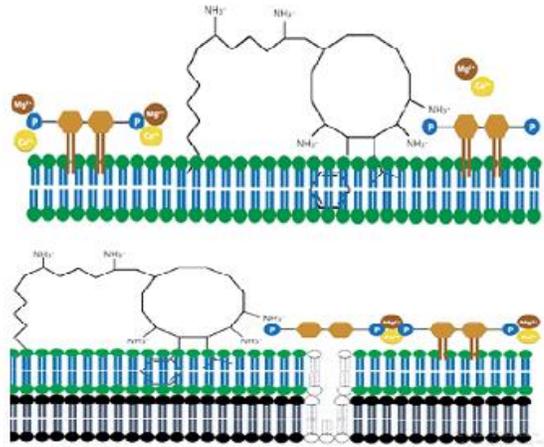


Figura III.3. Mecanismo de acción de la colistina. Aguayo A, 2016 (2)

Actividad antimicrobiana

El espectro de colistina incluye a la mayoría de las bacterias gram negativas aerobias, como las enterobacterias y bacilos no fermentadores (*Acinetobacter baumannii* y *P. aeruginosa*), se debe tener en cuenta que hay patógenos naturalmente resistentes a la colistina que se los puede distinguir con el acrónimo PPBS (*Proteus spp*, *Providencia spp*, *Burkholderia spp*, *Serratia spp* y *Stenotrophomona maltophilia*). Carece de actividad además frente a bacterias grampositivas y anaerobios. Por lo que se consideran antimicrobianos de espectro reducido (2).

Los punto de corte establecidos en 2016 por EUCAST para considerar un aislado sensible a la colistina es CIM ≤ 2 mg/L tanto para enterobacterias como para *Pseudomona spp* y *A. baumannii* y como resistente con una CIM ≥ 4 mg/L; es importante destacar que el uso de colistina se debería reservar para el tratamiento específico de infecciones por microorganismos resistentes a los betalactámicos, en particular los carbapenémicos (2, 53, 54).

Mecanismos de resistencia

Los cambios de la estructura bacteriana que disminuyen la sensibilidad a las polimixinas se relacionan con alteraciones de la arquitectura de las moléculas de LPS en la pared bacteriana, lo que interfiere con la interacción de los péptidos catiónicos de la polimixina y las moléculas aniónicas del LPS (2, 6).

Por tanto, el principal mecanismo es a través de la modificación del sitio blanco del antimicrobiano, es decir, del lípido A. Para ello el sistema más descrito es la mutación y la sobre expresión de los genes *pmrA* y *pmrB* (*polimyxy resistance*) que conlleva al aumento de la cantidad de fosfoetanolamina en el lípido A. La adición covalente de estas moléculas de carga positiva, hacen que la carga neta del lípido A sea menos negativa, lo que impide la atracción electrostática (6).

La capacidad adaptativa de una bacteria para lograr ventajas evolutivas le permite dejar de expresar estructuras determinantes. Es así que, diferentes eventos moleculares tales como deleciones, inserciones o mutaciones puntuales pueden inactivar los genes de la vía sintética del lípido A e incrementar la síntesis de otras estructuras como fosfolípidos o lipoproteínas. Por tanto, la ausencia del sitio blanco hace inviable la acción de las polimixinas (2).

Hasta este punto los mecanismos descritos eran mediados a nivel cromosómico, lamentablemente por un estudio realizado por Liu y colaboradores a partir de animales de criadero en China (6, 21), describen el primer mecanismo plasmídico de resistencia a la colistina en enterobacterias y su eventual diseminación tanto en animales como en humanos denominado *mcr-1* que corresponde a una fosfoetanolamina transferasa, capaz de modificar el sitio blanco y así disminuir la afinidad de colistina por el lípido A.

El potencial de *mcr-1* para que se convierta en una preocupación global se debe a la estabilidad de sus plásmidos y su capacidad para transferirse a cepas patógenas humanas lo que estipula el riesgo de una transferencia epidémica ambiental, animal-hombre que nos llevaría lamentablemente a una era post-antibiótica.

Diagnóstico de resistencia a la colistina *in vitro* en laboratorios de microbiología

La determinación de la correcta susceptibilidad a la colistina es un desafío en los laboratorios de microbiología a nivel mundial (24).

Existe una gran versatilidad en cuanto a las metodologías descritas para la evaluación de la susceptibilidad a este antimicrobiano, por tanto el *CLSI* en 2016 establece tres categorías para la evaluación de la colistina como se aprecia en la tabla III.2. (25).

Tabla III.2. Métodos propuestos para la evaluación de la susceptibilidad a la colistina.

Métodos para evaluación de susceptibilidad a la colistina		
Referencia (MR)	Aceptados (MA)	Cuestionados (MC)
Microdilución en caldo	Sensitire	Difusión con discos
Macrodilución en caldo	Walkaway Microscan	Tiras de gradiente
PCR <i>mcr-1</i>	Predifusión con Tabletas COL	VITEK 2
	COL-Agar Spot	PHOENIX
	COL-TEST	
	Elución Discos de COL	
	Rapid Polymyxin NP test	

Leyenda: MR (Métodos Recomendados), MA (Métodos Aceptados), MC (Métodos Cuestionados), PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), COL (Colistín)

Desde el 2016 la técnica de microdilución en caldo es la recomendada como método de referencia internacional para evaluar la susceptibilidad a la colistina en los laboratorios de microbiología de referencia, debido a su difícil implementación en la rutina de los laboratorios de microbiología convencionales.

III. Marco teórico

Excluyen además la determinación de susceptibilidad a este antimicrobiano mediante los métodos de difusión en disco, *E-test* y métodos automatizados VITEK2 y PHOENIX debido a la presencia de altas tasas de errores, falsa sensibilidad y baja especificidad, por ende no se describirán dichos métodos (24, 25).

La versatilidad en cuanto a las metodologías es muy amplia pero de importante conocimiento para decidir el empleo de uno u otro método en los laboratorios de microbiología, así tenemos:

- Macrodilución en caldo: se basa en medir la actividad *in vitro* de la sal de sulfato de colistín en caldo Müller Hinton ajustado a cationes, en diluciones seriadas al doble entre los rangos 0,06 - 64 ug/mL dispuestos en tubos de vidrio en una cantidad de 1 mL, en donde las cepas resistentes a la colistina enturbian el caldo mientras que, en las cepas sensibles se carece de dicha turbidez (55) .
- PCR *mcr-1*: se basa en la búsqueda del gen *mcr-1* que se visualiza en gel de agarosa, se debe tener en cuenta que debido a cambios en secuencias amidácidas han surgido nuevas variantes *mcr-1* - *mcr-8* (6).
- Sensititre: el sistema automatizado sensititre se basa en el empleo de placas estándar para la determinación de la CIM y paneles que permiten realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con resultados de alta calidad y reproducibilidad (56).
- Walkaway Microscan: sistema automatizado que incluye un software diseñado para detectar el crecimiento, la identificación de microorganismos y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (56) .
- Rapid Polimixyn NP: es un método rápido colorimétrico, se basa en evaluar la utilización de D-glucosa como fuente de carbono por el microorganismo en presencia de la colistina, con el empleo del indicador de pH rojo fenol. Las cepas bacterianas con resistencia a colistina fermentan la glucosa con la producción de metabolitos ácidos que viran el indicador del naranja al amarillo. Por el contrario en las cepas sensibles, se inhibe su desarrollo

III. Marco teórico

bacteriano impidiéndose la fermentación de la glucosa y por ende el viraje del indicador. La obtención de la susceptibilidad bacteriana es en aproximadamente 2.30 horas (57).

- COL-Agar spot: el método se basa en emplear placas de agar Mueller Hinton preparadas de forma manual con una concentración de 3 µg/mL de sal de colistín sulfato, en la cual se siembra un spot del aislamiento a investigar. El aislado bacteriano será resistente cuando se observe la presencia de más de una colonia, por el contrario será sensible si se observa una colonia o no tenga desarrollo bacteriano (58).
- COL-TEST: se trata de placas de agar comercial para la evaluación de la sensibilidad a colistín en agar spot. Por tanto el procedimiento y la interpretación se realizan de igual manera al de COL agar spot (58).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diseño metodológico

Se realizó un estudio observacional descriptivo ambispectivo entre enero de 2015 a diciembre de 2018. Este incluyó, de manera retrospectiva, 18 aislados clínicos de enterobacterias resistentes a colistina evaluados por los métodos actualmente cuestionados (una *E. coli*, 17 *K. pneumoniae*) que forman parte de la colección de cultivo del Laboratorio Nacional de Referencia de Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria del IPK (LNR-IAAS/IPK) identificadas entre enero 2015 y diciembre 2017. Por otra parte, se trabajaron de manera prospectiva 112 aislados de enterobacterias provenientes de muestras clínicas de 24 hospitales de ocho provincias cubanas (Camagüey, Guantánamo, Isla de la Juventud, La Habana, Matanzas, Pinar del Río, Santic Spíritus y Santiago de Cuba) que arribaron al LNR-IAAS/IPK, como parte de la vigilancia nacional desde el 1ro de enero al 31 de diciembre de 2018 para un tamaño muestral de n=130.

IV.2. Definición y clasificación de las variables

1. Susceptibilidad antimicrobiana: cualitativa nominal politómica

Definición: traducción de la respuesta in vitro de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, como factor predictivo de eficacia clínica.

Escala de clasificación

- Sensible: cuando un aislamiento bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- Intermedia: cuando un aislamiento bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- Resistente: cuando un aislamiento bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad de fracaso terapéutico.

Medida de resumen: frecuencia absoluta y relativa

2. Servicio médico: cualitativa nominal politómica

Definición: prestación médica del hospital que brinda asistencia sanitaria especializada.

Escala de clasificación: Cirugía, Consulta Externa (C/E), Litotricia, Medicina, Neonatología, Neurología, Urología, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), otros (Geriatría, Angiología, Miscelánea, Nefrología, Puerperio, Trasplante)

Medida de resumen: frecuencia absoluta y relativa.

3. Tipo de muestra: cualitativa nominal politómica

Definición: cualquier material biológico de origen humano que se obtiene del paciente, el tipo de muestra se clasifica en dependencia del lugar anatómico de donde se recolecta.

Escala de clasificación: catéter, exudado de piel, hemocultivo, herida quirúrgica, líquido cefalorraquídeo, urocultivo, otros (aspirado bronquial, lavado brocoalveolar, líquido ascítico, loquios, rafia, tubo endotraqueal)

Medida de resumen: frecuencias absoluta y relativa.

4. Categorización de resistencia: cualitativa nominal politómica

Definición: terminología internacional estándar para categorizar la resistencia adquirida de microorganismos causantes de infecciones frente a las drogas antimicrobianas.

Escala de clasificación (Tabla III.1)

- Multidrogorresistente (MDR): ausencia de sensibilidad a partir de tres familias de antibióticos considerados útiles para el tratamiento.

- Extremodrogorresistente (XDR): ausencia de sensibilidad a todas las familias de antibióticos considerados útiles para el tratamiento y sensible para uno o dos.
- Pandrogorresistente (PDR): ausencia de sensibilidad a todas las familias de antibióticos útiles para el tratamiento.

Medida de resumen: frecuencia absoluta y relativa.

IV.3. Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio aquellos aislados: no viables, contaminados, no confirmados como enterobacterias y/o los que no disponían de toda la información contenida en el modelo de recolección de datos.

IV.4. Recolección de la información

Todos los aislados objeto de estudio, se acompañaron de un modelo de recolección de datos diseñado por el IPK–Minsap para la vigilancia nacional de patógenos donde se registró la información clínico-epidemiológica de las infecciones (Anexo I).

IV.5. Procedimientos de laboratorio

IV.5.1. Conservación de aislados

Todos los aislados se conservaron a -80 °C (REVCO, EE.UU) en caldo Triptona Soja (CTS) (Biolife, Italia) con 15% de glicerol (DIFCO, Alemania) hasta su posterior caracterización microbiológica.

IV.5.2. Identificación de especies

La identificación de especies de los aislados correspondientes a los años 2015 - 2017 se tomaron de la base de datos creada al efecto de la vigilancia nacional de la resistencia de enterobacterias relacionadas con las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria del LNR-IAAS/IPK.

El material biológico conservado se transfirió a placas de Petri con agar Mac Conkey (Biolife, Italia) y se incubaron a 37 °C (Incubadora Memmert, Alemania) en aerobiosis durante 18 a 24 horas, para corroborar la viabilidad y pureza del cultivo.

IV. Materiales y métodos

La identificación de especies se realizó por el método convencional mediante pruebas bioquímicas según el MOPD (Manual de Operaciones de Procedimientos Diagnósticos) del LNR-IAAS. El método semiautomatizado API 20E (Biomérieux, S.A. Francia) se usó en aquellos aislados que resultaron dudosos en la identificación de las especies, acorde a las instrucciones del fabricante.

Para el método convencional se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar hierro dos azúcares de Kligler (Biolife), agar citrato de Simmons (Biolife), agar urea de Christensen (Biolife), agar movilidad-indol (Biolife), malonato de sodio (DIFCO), caldo lisina descarboxilasa (DIFCO) y caldo ornitina descarboxilasa (DIFCO).

IV.5.3. Determinación de la susceptibilidad a la colistina por el método microdilución en caldo

Se llevó a cabo en los 130 aislados objeto de estudio acorde al procedimiento recomendado en el manual del *CLSI*, 2018 (59).

Se recubrieron policubetas de fondo redondo con 100 uL de diluciones seriadas de la sal de colistín sulfato (Sigma) en caldo Müller Hinton ajustado a cationes, dentro de los rangos 0,06 - 64 ug/mL.

A partir de un cultivo puro se tomaron colonias aisladas, que se resuspendieron en 5 mL de solución salina estéril hasta llegar a una turbidez comparable a la escala 0,5 de Mac Farland. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 a partir de la suspensión bacteriana anterior en 1 mL de solución salina estéril.

Antes de transcurridos 15 minutos se inóculo con pipeta multicanal 5 uL de la suspensión bacteriana diluida en cada pocillo de la policubeta recubierta previamente. Las mismas se sellaron con una película plástica autoadhesiva y se incubaron entre 35 ± 2 °C durante 20 a 24 horas.

Se utilizó como control de calidad del proceso la cepa *E. coli* ATCC 25922 sensible a la colistina y la cepa referencia DQ *E. coli* 324 resistente a la colistina (CIM: 16 µg/mL).

IV. Materiales y métodos

Lectura e interpretación

Se interpretó la CIM como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en los pocillos de microdilución, definido a ojo desnudo por la presencia o ausencia de turbidez:

- Cepa sensible ≤ 2 ug/mL (EUCAST, 2018)
- Cepa resistente ≥ 4 ug/mL (EUCAST, 2018)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura IV.1. Esquema empleado en las lecturas de la CIM. LNR-IAAS/IPK

IV.5.4. Evaluación del desempeño de los métodos fenotípicos para determinar la susceptibilidad a la colistina

IV.5.4.1. Método de difusión en gradiente *E-test*

Se realizó a los 130 aislados objeto de estudio acorde al procedimiento recomendado en el manual del *CLSI*, 2018 (60).

A partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas de crecimiento en agar Mac Conkey, se preparó un inóculo en 3 mL de solución salina estéril hasta alcanzar una densidad óptica correspondiente a la escala 0,5 de Mac Farland.

Antes de transcurrir quince minutos del ajuste del inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión bacteriana y se roto varias veces por las paredes del tubo por encima del nivel del líquido con el fin de eliminar el exceso de inóculo. Posteriormente, sobre la superficie de placas con agar Müller Hinton se sembró con el hisopo en tres direcciones, rotando la placa en un ángulo de 60° cada vez sin dejar zona libre, con el propósito de obtener un cultivo homogéneo. Luego de cinco minutos las tiras de *E-test* se colocaron sobre la superficie del medio previamente inoculado.

Lectura e interpretación

La CIM del antibiótico se determinó por el punto de corte donde la elipse de inhibición del crecimiento interceptó la escala de la tira de *E-test* (de acuerdo a las instrucciones del fabricante):

- Cepas sensibles a colistina: en correspondencia a una CIM ≤ 2 ug/mL.
- Cepas resistentes a colistina: en correspondencia a una CIM ≥ 4 ug/mL.

Debido a que la prueba corresponde al gradiente de antimicrobianos continuo, se puede obtener valores de CIM que se encuentran entre dos diluciones, seleccionándose como valor final el valor mayor.

IV.5.4.2. Elución de discos de colistina

Se realizó a los 130 aislados objeto de estudio acorde al protocolo recomendado por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”, 2017 (26).

Se rotularon cuatro tubos con 1, 2, 4 ug/mL y control de crecimiento bacteriano, a los cuales se les agregó 10 mL de caldo Müller Hinton ajustado a cationes (CAMHB).

Asépticamente se introdujo 1 disco de colistina de 10 ug/mL al tubo rotulado con “1 ug/mL”, dos discos al tubo “2 ug/mL” y cuatro discos al tubo “4 ug/mL” y se permitió que los discos eluyan por media hora a temperatura ambiente.

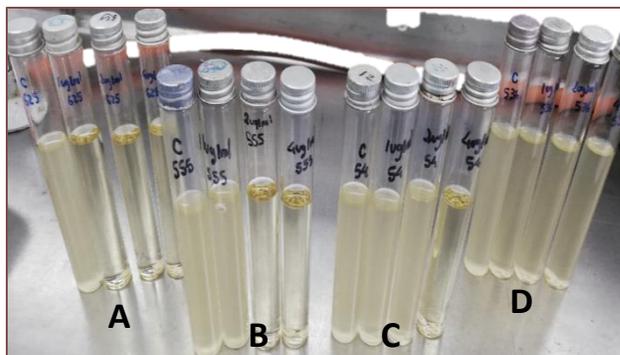
El inóculo obtenido a partir de cepa pura, se resuspendió en 5 mL de solución salina estéril hasta alcanzar la densidad óptica correspondiente a la escala 0,5 de Mac Farland y se procedió a agregar 50 μ L del inóculo a cada uno de los cuatro tubos (1, 2, 4 y control) con posterior incubación entre 35 y 37 °C de 18 a 20 horas. Se utilizó como control de calidad del proceso la cepa *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* NCTC 13846 (*mcr-1* positiva).

Lectura e interpretación

1. Examinar el tubo control: se debe observar turbidez para validar la prueba.
2. Leer la CIM como la menor concentración en la que no se observa turbidez.
3. Interpretar el resultado como sensible a la colistina si la CIM es ≤ 2 ug/mL o resistente si la CIM es ≥ 4 ug/mL.

Figura IV.2. Interpretación del método elución de discos de colistina. LNR-IAAS/IPK

- A. Aislado sensible a colistina ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$.
- B. Aislado sensible a colistina 2 $\mu\text{g/mL}$.
- C. Aislado resistente a colistina 4 $\mu\text{g/mL}$.
- D. Aislado resistente a colistina ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$.



IV.5.4.3. Predifusión con tabletas de colistina

Para la realización del método de predifusión con tabletas de colistina, se seleccionaron los aislados resistentes por el método de microdilución en caldo, y por aleatorización simple aislados sensibles hasta completar un total de 50 determinaciones, por cuestiones de factibilidad de recursos.

Se determinó mediante el estuche comercial para detección de resistencia a la colistina en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* (Rosco Diagnostica, Dinamarca) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (27).

Sobre la superficie seca de una placa de agar Müeller Hinton sin inocular se colocó una tableta de colistina (10 μg) y se incubó durante 2 horas entre 35 y 37 $^{\circ}\text{C}$, posterior a esta incubación se removió la tableta del agar con un golpe suave y se dejó la placa pre-difundida a temperatura ambiente entre 18 y 24 horas previas a inoculación.

Para hisopar la superficie del agar pre-difundido se preparó una suspensión bacteriana equivalente a 0,5 de Mac Farland a partir de un cultivo puro y se incubó en aerobiosis entre 35 y 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 20 horas.

Como control de calidad del proceso se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Lectura e interpretación

Medir la zona de inhibición generada e interpretar de acuerdo a las recomendaciones del fabricante:

IV. Materiales y métodos

- Enterobacterias y *P. aeuroginosa*: Sensible ≥ 16 mm; Intermedia 15 – 12 mm; Resistente < 12 mm
- *Acinetobacter spp*: Sensible ≥ 20 mm; Intermedia 19 – 14 mm; Resistente < 14 mm

IV.5.5. Detección de antibiogramas en aislados clínicos objeto de estudio

Se llevó a cabo por el método *E-test* y difusión en disco (Kirby-Bauer) para diferentes antimicrobianos donde para infecciones hospitalarias se evaluaron 12 antimicrobianos acorde a lo establecido por el *CLSI* 2018 y para infecciones comunitarias se evaluaron 10 antimicrobianos según recomendaciones de *WHONET* 2017 (8, 60). (Tabla IV.1).

Los antibiogramas se definieron como multidrogosresistentes, extremodrogosresistentes ó pandrogosresistentes acorde a las recomendaciones propuestas por *ReLAVRA*, 2019 (45) (Tabla III.1).

Para el control de la calidad se emplearon las cepas ATCC: *E. coli* 25922, 35218 y *Staphylococcus aureus* 27212.

Tabla IV.1. Antimicrobianos evaluados en aislados hospitalarios y comunitarios.

*Antimicrobianos	Contenido	Abreviatura	Hospitalarios	Comunitarios
Ampicilina	0.016–256 g/L	AMP		X
Ampicilina/sulbactam	0.016–256 g/L	AMS	X	X
Piperacilina/tazobactam	100/10 μ g	TZP	X	
Aztreonam	30 μ g	ATM	X	
Cefazolina	30 μ g	CFZ		X
Cefotaxima	0.016–256 mg/L	CTX	X	
Meropenem	0.002–32 μ g	MRP	X	
Gentamicina	0.064–1024 mg/L	CN	X	X

IV. Materiales y métodos

Amikacina	30 µg	AK	X	
Ácido nalidíxico	30 µg	NA		X
Ciprofloxacina	0,002–32 mg/L	CIP	X	X
Fosfomicina	200 µg	FOS	X	X
Trimetropim/ sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	SXT	X	X
Nitrofurantoína	300 µg	F		X
Colistina	0.016–256 mg/L	COL	X	X
Tigeciclina	0.016–256 mg/L	TIG	X	

*Casa comercial: (Liofilchem)

IV.5.6. Procedimientos estadísticos y análisis de datos

La información se almacenó en una base de datos en Microsoft Excel procesados con el paquete estadístico Epidat v4.2.

Los resultados de las pruebas diagnósticas fueron clasificados como verdaderos positivos, falso positivos, verdaderos negativos y falsos negativos comparados con la microdilución en caldo como método de referencia, datos con lo que se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Validez: se midió por los cálculos de la sensibilidad y la especificidad. La interpretación de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo).

- a) Sensibilidad diagnóstica: es la probabilidad de clasificar correctamente a una cepa resistente a la colistina. Las cepas se clasificaron en verdaderos positivos y falsos negativos tomando como referencia o prueba de oro: la microdilución en caldo.

- b) Especificidad diagnóstica: es la probabilidad de clasificar correctamente a una cepa como no resistente a la colistina.

Confiabilidad: está determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo.

- a) Valor predictivo positivo: probabilidad de estar infectado por una enterobacteria resistente a la colistina cuando se obtiene un resultado positivo con el diagnosticador *E-test*, elución de discos de colistina y predifusión con tabletas de colistina. Se calculó según la fórmula: $VPP = VP / VP + FP$.
- b) Valor predictivo negativo: probabilidad de no estar infectado por una enterobacteria resistente a la colistina cuando se obtiene un resultado negativo con el diagnosticador *E-test*, elución de discos de colistina y predifusión con tabletas de colistina. Se calculó según la fórmula: $VPN = VN / VN + FN$.

Error muy mayor: definida como falsa sensibilidad, la cual se connota cuando la prueba de referencia proporciona resultados de resistencia y el método en comparación revela resultados de sensibilidad.

Error mayor: definida como falsa resistencia, la cual se connota cuando la prueba de referencia proporciona resultados de sensibilidad y el método en comparación revela resultados de resistencia.

Prueba de concordancia: se determinó el índice de validez o concordancia por el coeficiente de Kappa (K) como grado de concordancia no aleatoria entre las mediciones de los resultados obtenidos entre los tres diagnosticadores en estudio y la microdilución en caldo. Para establecer la concordancia entre los métodos se aplicó la clasificación de Landis y Koch: muy buena: 0,8 a 1; buena: 0,6 a 0,8; moderada: 0,4 a 0,6; pobre o débil: valores menores a 0,4 (61).

IV.5.7. Aspectos éticos

El presente trabajo de tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología, cuenta con la aprobación de la Comisión Científica Especializada de Microbiología y del Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (Anexos 2 y 3).

IV. Materiales y métodos

Conflicto de intereses: Se declara la ausencia de conflictos de intereses con los productores, comercializadores ni otras partes involucradas.

Aspectos de Bioseguridad: Todo los investigadores, el alumno de tesis y personal técnico que participó en la investigación estuvo capacitado e instruido en las operaciones relacionadas con su trabajo y siguieron lo dispuesto en el Manual de Bioseguridad del IPK en relación a las buenas prácticas y uso de equipos de protección personal (batas, sobretatas, guantes entre otros). El LNR-IAAS seleccionado para el estudio presentó las condiciones para el correcto procesamiento y caracterización de las cepas, así como para garantizar la eliminación final del material de desecho contaminado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria por enterobacterias, se consideran un verdadero problema de salud pública y Cuba no escapa de esta problemática. Este grupo de bacilos gram negativos, que son parte de la microbiota normal del ser humano lo afectan, tanto, por vía endógena como exógena y desafían en la actualidad los modernos antibióticos (29, 62).

Durante el período de estudio de la presente investigación se caracterizaron 130 aislados de enterobacterias (91 hospitalarias y 39 comunitarias) recibidos en el LNR-IAAS, procedentes de pacientes atendidos en diferentes hospitales del país. Los aislados prospectivos se identificaron como 74 *E. coli*, 30 *Klebsiella spp.*, y ocho *E. cloacae spp.*

Desde 2018 la OMS clasifica las enterobacterias como superbacterias, debido a la emergencia de la producción de carbapenemasas y a su capacidad de evadir la acción de diversas familias de antibióticos. Adicionalmente, la falta de opciones terapéuticas conlleva a la creciente utilización de la colistina con el consecuente incremento en la resistencia (63).

La implementación de la técnica de microdilución en caldo, por vez primera en el LNR-IAAS/IPK, para determinar la susceptibilidad a la colistina permitió identificar 13% (17/130) de aislados resistentes, como se refleja en el figura V.I.

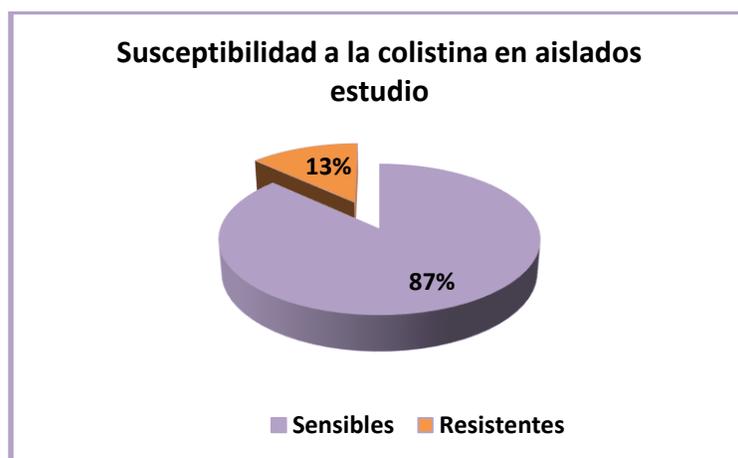


Figura V.1. Porcentaje de susceptibilidad a la colistina entre los aislados objeto de estudio (n=130). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

V. Resultados y discusión

Este hallazgo ratifica la circulación en Cuba de aislados resistentes a la colistina documentados previamente por Quiñones y colaboradores en 2014 (13%) y Pérez y colaboradores en 2016 (4%). No obstante, es importante resaltar que en estas investigaciones se emplearon los métodos actualmente cuestionados, en el primer estudio se determinó por *E-test* y en el segundo por difusión en disco. Por tanto, existe la posibilidad de que desde ese período se subestimaré la verdadera resistencia a este antimicrobiano si se tiene en cuenta que el mayor problema de estos métodos es la no detección de aislados resistentes (64).

De las especies resistentes a la colistina detectadas en el presente trabajo, *K. pneumoniae* fue la más prevalente (12/17), como se observa en la figura V.2.

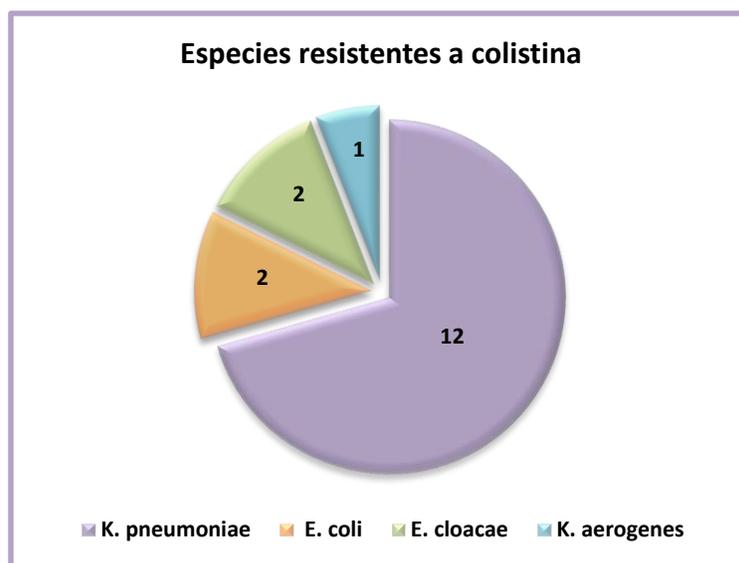


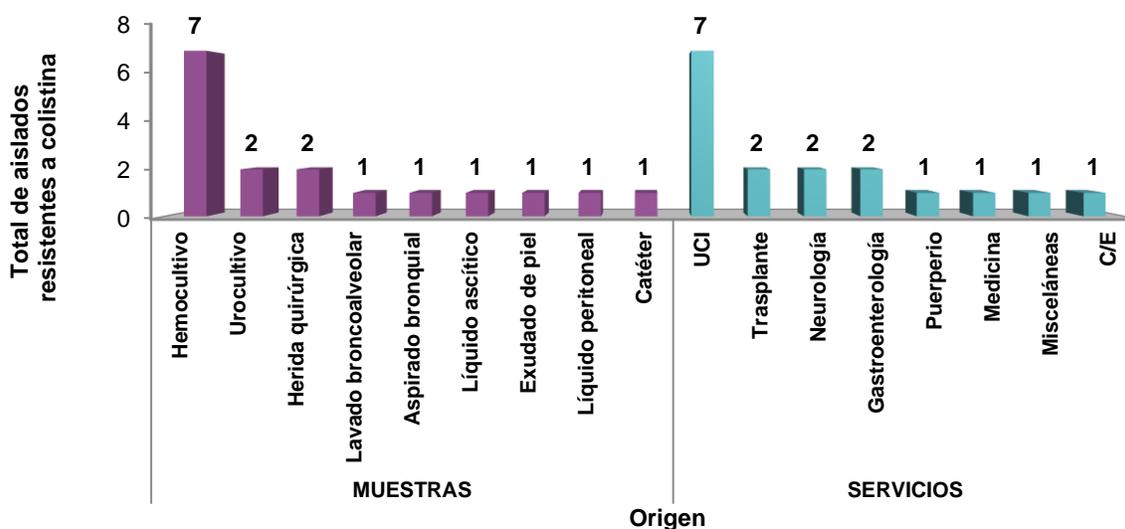
Figura V.2. Distribución de las especies resistentes a la colistina de aislados clínicos de enterobacterias objeto de estudio (n=17). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

Los resultados encontrados en la presente investigación se corresponden con el estudio de Melgarejo y colaboradores (2018) en Paraguay, en el que las especies más resistentes a la colistina fueron *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*, a diferencia de lo reportado por Heras y colaboradores (2017) en España quienes notifican *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. aerogenes* (9, 17).

V. Resultados y discusión

Aunque la resistencia a la colistina en enterobacterias únicamente se asociaba con modificaciones en el cromosoma que afectan la permeabilidad a la droga, en 2015 Liu y colaboradores encontraron por primera vez el gen *mcr-1* de codificación plasmídica en los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* (6). Lo cual podría justificar la rápida diseminación inter e intra especie que conlleva este tipo de resistencia antimicrobiana, ya que como se evidencia en tan corto período se observa el emerger de nuevas especies asociadas a la resistencia a este antimicrobiano de último recurso terapéutico.

La resistencia a la colistina a través de la vía horizontal constituye una emergencia grave ya que, desde el punto de vista epidemiológico cobra cada vez más importancia el control de estos en los servicios asistenciales. Por tanto, al realizar el análisis de esta temática según tipo de muestra y servicios, se observó que el 41% (7/17) fue causa de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI), como se observa en la figura V.3.



Leyenda: UCI (Unidad de Cuidados Intensivos), C/E (Consulta Externa)

Figura V.3. Distribución de aislados clínicos de enterobacterias resistentes a la colistina por tipos de muestra y servicios afectados (n=17). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

V. Resultados y discusión

Este comportamiento concuerda con el estudio de Nastro (2016), en Argentina, donde el 33,3% presentó resistencia a la colistina en UCI, en contraposición al 4%, encontrado por Pérez y colaboradores, 2015-2016 en el hospital Joaquín Albarrán de La Habana, Cuba, todo lo cual pudiera estar subestimado debido al método utilizado por los autores (Método de difusión en disco) (64, 65).

Es importante mencionar que, a pesar de que en consulta externa solo se detectó un aislado con resistencia a la colistina, esto constituye una alarma. El hallazgo concuerda con lo reportado por Legarraga (2017) en Chile (22) y Melgarejo (2018) en Paraguay (17), donde se reveló la resistencia, en pacientes ambulatorios, asociada con la circulación del gen *mcr-1*. Problemática que nos alerta para la toma de conciencia y generar las acciones oportunas para su contención. Pese al elevado coste de la pesquisa del gen tanto para los aislados en hospitales y en la comunidad (uso de medios selectivos cromogénicos y técnica molecular PCR), es importante reflexionar al respecto para la toma de decisión e iniciar dicha vigilancia en Cuba.

En cuanto al tipo de muestra, el hemocultivo aportó mayor número de aislados resistentes (41%), lo que coincide con el estudio de Nastro aunque en menor proporción (11,1%) (65).

La unidad de cuidados intensivos y hemocultivo son considerados de alto riesgo por la asociación de la flora intrahospitalaria y los métodos invasivos que incrementan de forma significativa el riesgo de adquirir infecciones asociadas a la atención con marcada resistencia antimicrobiana (66, 67).

Como se conoce, en las UCI es donde más se usa la colistina lo que facilita la aparición de poblaciones resistentes por el uso indiscriminado del antimicrobiano, lo que conlleva a la consecuente aparición del fenómeno de heterorresistencia.

La resistencia a colistina cobra cada vez mayor importancia, ya que al considerarse como fármaco de elección para infecciones causadas por bacterias gram negativas multirresistentes y como último recurso, su consumo se incrementa, por tanto para su contención resulta imprescindible la correcta evaluación de la susceptibilidad.

V. Resultados y discusión

En la red de laboratorios del país solo se dispone para este fin los métodos cuestionados. Por tanto, se impone la necesidad de recurrir a métodos alternativos que tengan una buena correlación al estándar (microdilución en caldo) como elución de discos y predifusión de tabletas de colistina que permitan detectar la susceptibilidad correcta a este antibiótico.

Los resultados del presente estudio muestran que el método de *E-test* a pesar de presentar valores adecuados de sensibilidad (94,12%) y valor predictivo negativo (98,70%), presentó valores muy bajos en cuanto a especificidad (67,26%) y valor predictivo positivo (30,19%), como se reflejan en la tabla V.1. En esta se puede observar la fiabilidad de cada uno de los métodos fenotípicos empleados para la determinación de la susceptibilidad a la colistina

Tabla V.1. Atributos relacionados al desempeño de los métodos fenotípicos para la evaluación de la susceptibilidad a la colistina en aislados clínicos de enterobacterias. Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

Métodos	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	K	VM	M
<i>E-test</i>	94,12	67,26	30,19	98,70	0,32	1	37
Predifusión	76,47	100	100	89,19	0,81	4	0
Elución	100	100	100	100	1	0	0

Leyenda: VPP (valor predictivo positivo), VPN (valor predictivo negativo), K (índice de correlación de Kappa), VM (error muy mayor), M (error mayor)

Por tal razón, esta investigación constituye un valioso aporte al conocimiento de la susceptibilidad a colistina en Cuba, y por primera vez se compara los resultados del método *E-test* con el de referencia, siendo un método cuestionado y avala científicamente su pobre desempeño, por lo que consideramos que se debe valorar su desuso en los laboratorios de la red de microbiología del país.

V. Resultados y discusión

Aunque en décadas anteriores el método de difusión en gradiente se empleó como referencia y así consta en el estudio de Siniritas y colaboradores en Turquía (2008) (68), su uso declinó por la baja sensibilidad y especificidad o por la presencia de errores, lo cual se asocia preponderantemente con la pobre difusión de la colistina a partir de las tiras en el agar de Müller Hinton (3).

En cuanto a los tipos de errores, en el análisis se encontró que 37 fueron de tipo mayores y uno de tipo muy mayor, lo cual se traduce en pobre concordancia con el método estándar, por tanto la utilización de esta técnica en la rutina se desaconseja (24). Además, Arroyo y colaboradores en España y Somily en Arabia Saudita, sugieren que, debido a la posibilidad de que aparezcan estos errores, los resultados del *E-test* se deben confirmar por el método de dilución (69, 70).

Al evaluar la utilidad de tabletas de colistina por el método de predifusión se encontró sensibilidad de 76,47% y especificidad de 100%, con valores predictivos positivos y negativos de 100 y 89,19% respectivamente. No se encontró error mayor y se obtuvo cuatro errores muy mayores. Estos se presentaron en cuatro aislados que tuvieron valores de CIM 4 $\mu\text{g/mL}$ que los define como resistentes, mientras que por predifusión se produjo halos de entre 28 a 32 mm de diámetro correspondientes a la categoría sensible. Este inconveniente lo describen en Argentina, Herrera y colaboradores en 2011 y más recientemente Nastro en 2016; ambos concuerdan en que el principal problema de la predifusión se encuentra a nivel de los errores muy mayores, principalmente, en cepas donde la CIM está entre 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$ (65, 71).

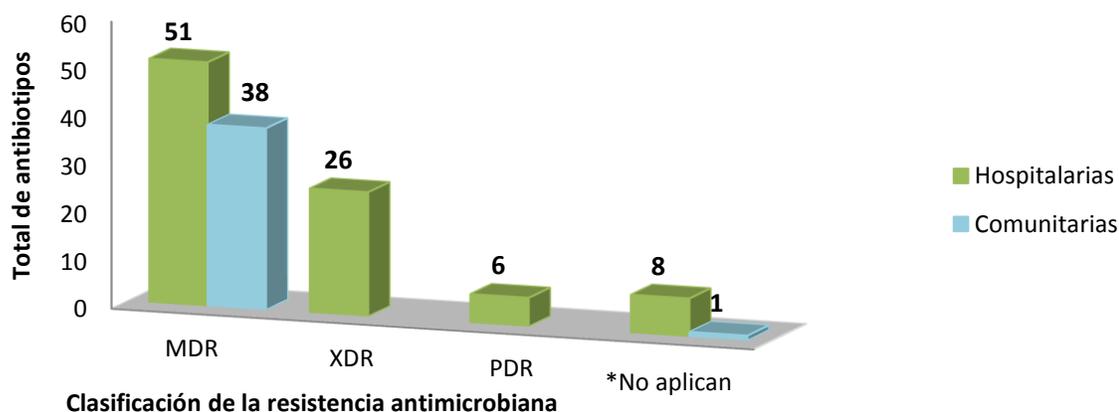
El método de elución de discos se introdujo en 1973 por Wilkins para conocer las CIM de diferentes antimicrobianos en bacterias anaerobias fastidiosas, donde se reflejaba como una metodología replicable y confiable para su análisis. El método se basa en emplear discos del antibiótico a probar a una concentración conocida que se dejan eluir en un mismo volumen de caldo, para así obtener diluciones dobles y determinar finalmente las concentraciones mínimas inhibitorias del antimicrobiano (72).

V. Resultados y discusión

En este estudio el método de elución de discos de colistina presentó 100% de sensibilidad y especificidad y no se presentaron errores (muy mayores o mayores). Aunque en la actualidad las técnicas para la detección de susceptibilidad a esta droga son controversiales y muy diversas, de acuerdo con esta investigación, este es un método factible para el uso rutinario en la red de laboratorios de microbiología de Cuba.

En consonancia con estos resultados, Simner y colaboradores plantean que el método de elución es una prueba fácil y práctica para evaluar la susceptibilidad a colistina y recomiendan que en aquellos aislados que por elución presenten CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ se realice la pesquisa del gen *mcr-1* (73).

En la figura V.4 se puede observar la distribución de los aislados acorde a la clasificación de la resistencia antimicrobiana propuesta por *ReLAVRA* 2019, donde se puede apreciar que la multidrogorresistencia fue la que más prevaleció con 68% correspondientes al 39% de aislados hospitalarios y al 29% de comunitarios. Los aislados extremo y pandrogorresistentes se presentaron solamente en los de origen hospitalario con el 20% y 5%, respectivamente.



Leyenda: MDR (multidrogorresistencia), XDR (extremodrogorresistencia), PDR (pandrogorresistencia)

*Nueve aislados no cumplieron con los criterios establecidos por *ReLAVRA* para incluirlos dentro de las clasificaciones

Figura V.4. Distribución de los aislados clínicos de enterobacterias según categoría multidrogorresistentes, extremodrogorresistentes y pandrogorresistentes. (n=130). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

V. Resultados y discusión

El incremento de la multidrogorresistencia en el ámbito hospitalario y comunitario, es un fenómeno que se observa con mayor frecuencia, y constituye una gran preocupación sobre todo cuando los factores de supervivencia bacteriana conllevan al incremento de resistencias más extremas como las XDR y PDR, en las cuales la carencia de alternativas terapéuticas es preocupante (37, 74, 75).

De los 130 aislados que se estudiaron 89 (68%) se caracterizaron como MDR (resistentes a tres o más familia de antimicrobianos). De ellas, 51 fueron de origen hospitalario y 38 procedieron de muestras comunitarias para un 39% y 29%, respectivamente.

En los aislados hospitalarios MDR, *E. coli* fue el microorganismo más frecuente (63%). En total se encontraron 42 antibiotipos de multidrogorresistencia, de los cuales 35 se presentaron de forma individual y siete se repitieron en más de un aislado. Estos últimos se muestran en la tabla V.2 donde se puede apreciar que predominó la resistencia a penicilinas con inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas, aztreonam y trimetropim/sulfametoxazol.

Tabla V.2. Antibiotipos más frecuentes de resistencia en aislados hospitalarios asociados a multidrogorresistencia. (n=51). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

Patrón	Total	Antibiotipos de MDR en aislados hospitalarios									
1	3	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS	CIP	MRP	CN	SXT	
2	3	AMS		CTX	ATM		CIP		CN	AK	SXT
3	2	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS		MRP			SXT
4	2	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS		MRP	CN	AK	SXT
5	2	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP				SXT
6	2	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP	MRP	CN	AK	SXT
7	2	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP		CN		SXT

Leyenda: AMS (Ampicilina/sulbactam), TZP (Piperacilina/tazobactam), CTX (Cefotaxima), ATM (Aztreonam), CIP (Ciprofloxacina), CN (Gentamicina), SXT (Trimetropim/sulfametoxazol)

V. Resultados y discusión

El porcentaje de aislados MDR de origen hospitalario que se encontró en esta investigación es consistente con lo que reportan investigaciones previas del LNR-IAAS/IPK en Cuba (49,5%), donde predominó la combinación de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, quinolonas y trimetoprin/sulfametoxazol (76). Por otra parte, estos resultados son similares a los que reportan Castro y colaboradores en Colombia (57,8%) quienes informan como perfil más frecuente la combinación de resistencia a ampicilina/sulbactam, norfloxacin, gentamicina y amikacina (74).

Un porcentaje más elevado de aislados MDR (85,7%) se observa en el estudio de Leski y colaboradores en Sierra Leona donde el perfil que predominó fue la combinación de resistencia a ampicilina/sulbactam, gentamicina, cloranfenicol y ciprofloxacina (77). Esto evidencia cómo varían los porcentajes de resistencia entre las distintas áreas geográficas a nivel mundial.

La resistencia a diversos antimicrobianos se puede deber a varios mecanismos generados por la presión selectiva que ejercen estos frente a las bacterias. Uno de los mecanismos asociados a la resistencia en enterobacterias con mayor difusión en la literatura es el enzimático, sobre todo en cuanto a la producción de BLEE.

Las BLEE confieren resistencia a las cefalosporinas de segunda y tercera generación y al aztreonam. Además, se consideran como buen marcador de fenotipos de multirresistencia ya que las mismas se transmiten mediante plásmidos que pueden transportar genes que codifican para la resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas (36, 78).

Rahal y colaboradores sugieren que para la disminución de BLEE y con ello de MDR, la restricción del uso de cefalosporinas de tercera generación, constituye una estrategia exitosa (79).

En Cuba, varios autores describen la prevalencia alta de BLEE en la familia *Enterobacteriaceae* (76, 80, 81). Por tanto, este pudiera ser el mecanismo responsable de la multirresistencia en los aislados objetos de estudio, teniendo en cuenta que, los siete patrones de MDR más frecuentes presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam.

V. Resultados y discusión

El fenómeno de la multidrogorresistencia no solo se restringe al ámbito hospitalario, sino que su emergencia se ha expandido a la comunidad. En esta investigación se encontró un total de 18 patrones de MDR en aislados comunitarios, de los cuales siete incluyeron más de un aislado y 11 contienen aislados individuales donde *E. coli* fue la enterobacteria más prevalente 92% (36/39).

En la tabla V.3, se visualizan los patrones más frecuentes donde se aprecia que predominó la combinación de resistencia frente a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, quinolonas y trimetropim/sulfametoxazol.

Tabla V.3. Antibiótipos más frecuentes de resistencia en aislados comunitarios asociados a multidrogorresistencia. (n=38). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018

Patrón	Total	Antibiótipos de MDR en aislados comunitarios						
1	13	AMP	AMS	CFZ	NA	CIP	CN	SXT
2	3	AMP	AMS	CFZ	NA	CIP	CN	
3	3	AMP	AMS	CFZ	NA	CIP		
4	2	AMP	AMS		NA	CIP	CN	SXT
5	2	AMP	AMS	CFZ	NA	CIP		SXT
6	2	AMP		CFZ	NA	CIP		SXT
7	2	AMP			NA			SXT

Leyenda: AMP (Ampicilina), AMS (Ampicilina/sulbactam), CFZ (Cefazolina), FOS (Fosfomicina), NA (Ácido Nalidíxico), CIP (Ciprofloxacina), COL (Colistina), CN (Gentamicina), SXT (Trimetropim/sulfametoxazol) y NIT(Nitrofurantoína).

En la presente investigación los patrones de MDR que presentaron los aislados comunitarios no difieren a los que se encontraron en los de origen hospitalario. Desde 2007, López y Pascual plantean la coresistencia en cepas productoras de infecciones de origen comunitario y las de origen hospitalario, donde, fundamentalmente, la resistencia se produce frente a quinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos (37).

V. Resultados y discusión

Por otra parte, Castro y colaboradores en Colombia, en un estudio de uropatógenos gram negativos, *E. coli* fue el microorganismo más frecuente, con predominio de la combinación de resistencia a ampicilina/sulbactam, norfloxacino, gentamicina y Trimetropim/sulfametoxazol, tanto en aislados hospitalarios como de la comunidad (74).

La emergencia de infecciones producidas por enterobacterias multirresistentes en la comunidad supone un desafío, al quedar invalidados casi todos los antibióticos efectivos en su manejo, lo que complica la evolución favorable del paciente y la necesidad de atención a nivel hospitalario. Por tanto, el conocer su comportamiento epidemiológico conlleva a evitar su transmisibilidad y favorece el rescate de antibióticos existentes, teniendo en cuenta que la producción de antimicrobianos nuevos y eficaces está muy deprimida.

En la tabla V.4 se observan los patrones de XDR (ver definición en página 24) de los aislados hospitalarios. Estos representaron 29% (26/91) de los mismos. No se encontraron patrones de resistencia extrema en los de origen comunitario. En total se presentaron cinco patrones y el microorganismo más frecuente fue *K. pneumoniae* con 92%.

Tabla V.4. Antibiotipos en aislados hospitalarios asociados a extremodrogoresistencia. (n=26). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018

Patrón	Total	Antibiotipos de XDR en aislados hospitalarios											
1	8	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS	CIP	MRP		CN	AK	SXT	
2	7	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP	MRP		CN	AK	SXT	TIG
3	5	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS	CIP	MRP		CN	AK	SXT	TIG
4	5	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP	MRP	COL	CN	AK	SXT	TIG
5	1	AMS	TZP	CTX	ATM		CIP	MRP	COL	CN	AK	SXT	

Leyenda: AMS (Ampicilina Sulbactam), TZP (Piperacilina Tazobactam), CTX (Cefotaxima), ATM (Aztreonam), FOS (Fosfomicina), CIP (Ciprofloxacina), MRP (Meropenem), COL (Colistina), CN (Gentamicina), AK (Amikacina), SXT (Trimetropim sulfametoxazol), TIG (Tigeciclina).

V. Resultados y discusión

En Cuba, Zayas en 2012, en un estudio que incluyó aislados del género *Klebsiella* de 19 hospitales distribuidos en cinco provincias del país, no reporta aislados XDR (76). Sin embargo, el hallazgo de 26 aislados con resistencia extrema en la presente investigación seis años más tarde pone en evidencia el incremento de la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias causantes de infecciones en paciente hospitalizados. Este aumento, según reportes del LNR-IAAS/IPK, obedece a la producción de carbapenemasas de tipo NDM, las que presentan una rápida diseminación epidemiológica en diferentes hospitales del país (82).

A pesar de que tigeciclina no se encuentra dentro del cuadro básico nacional de medicamentos, en los aislados XDR se encontró 65% de resistencia a la misma. En Cuba, Quiñones y colaboradores (2014), no reportan resistencia a la tigeciclina en aislados de *Klebsiella spp.*; sin embargo, resaltan que 4% mostró sensibilidad intermedia a este antimicrobiano (83, 84).

Los mecanismos implicados en la resistencia a la tigeciclina no está bien definidos en la literatura, aunque se describe la asociación del incremento de las bombas de eflujo (AcrAB) que involucran la salida de una variedad de antibióticos (betalactámicos, cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas, ácido fusídico y tetraciclinas) con la resistencia cruzada a este antimicrobiano (85, 86). Por tanto, esta hipótesis pudiera guardar relación con la resistencia que se encontró a la tigeciclina en este estudio.

No obstante, el hallazgo de aislados resistentes constituye una alerta para el uso adecuado de la misma de producirse su introducción en el cuadro básico de medicamentos del país, ya que como se conoce, la resistencia a tigeciclina se asocia con el uso frecuente en sitios anatómicos donde su penetración es mala, por tanto al no alcanzar la concentración terapéutica adecuada para ejercer el efecto óptimo, podría conducir al desarrollo de mutantes de resistencia (87).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, entre los aislados XDR se presentó mayor sensibilidad (77%) frente a la colistina, lo cual es un efecto alentador ya que se mantiene la utilidad de la misma para el manejo de infecciones por bacterias que exhiben resistencia a múltiples antimicrobianos.

V. Resultados y discusión

A pesar de esto, como se muestra en la tabla V.5 entre los aislados de origen hospitalarios, seis fueron PDR para un 7% (6/91) (ver definición en página 24) los que se correspondieron únicamente con *K. pneumoniae*.

Tabla V.5. Antibiotipos en aislados hospitalarios asociados a pandrogresistencia. (n=6). Instituto Pedro Kourí, 2015 – 2018.

Patrón	Total	Antibiotipos de PDR en aislados hospitalarios											
1	6	AMS	TZP	CTX	ATM	FOS	CIP	MRP	COL	CN	AK	SXT	TIG

Leyenda: AMS (Ampicilina/sulbactam), TZP (Piperacilina/tazobactam), CTX (Cefotaxima), ATM (Aztreonam), FOS (Fosfomicina), CIP (Ciprofloxacina), MRP (Meropenem), COL (Colistina), CN (Gentamicina), AK (Amikacina), SXT (Trimetropim/sulfametoxazol), TIG (Tigeciclina).

La resistencia elevada antimicrobiana se puede deber a: mecanismos evolutivos, transferencia horizontal de genes y con ello el incremento de su diseminación, debilitamiento de programas de control de infecciones, uso y abuso de antimicrobianos, lo cual consecuentemente crea mecanismos de resistencias bacterianos cada vez más sólidos, visualizando una era post-antibiótica (88, 89).

La preocupación global con la emergencia de resistencia a la colistina por el gen *mcr-1* radica en la estabilidad que presenta el plásmido que lo porta y la capacidad del mismo para transferirse de cepas de origen tanto ambiental como animal a cepas patógenas para el hombre (18, 20). Esto constituye un factor predisponente para que se produzca la transferencia epidémica ambiental. Por tal motivo, la implementación de la vigilancia de la resistencia transferible a la colistina mediante el gen *mcr-1* en Cuba constituye una de las principales proyecciones del LNR-IAAS del IPK.

Por lo mencionado, se puede evidenciar que la resistencia bacteriana se ha convertido actualmente en un serio problema de salud mundial y requiere del máximo esfuerzo de todas las instituciones gubernamentales que garanticen su control.

Es importante destacar que, en el país, la colistina es la única alternativa terapéutica disponible para el tratamiento de las enterobacterias multirresistentes, ya que en

V. Resultados y discusión

Cuba no existen otros antimicrobianos de nueva generación como la tigeciclina, lo que trae consigo el fracaso de la terapia antimicrobiana, el aumento de la morbi-mortalidad y de los costos de la atención médica en hospitales cubanos.

Por tal razón, estrategias inmediatas para fortalecer la lucha contra la RAM (Resistencia Antimicrobiana) se enfocan en programas de vigilancia y uso racional de medicamentos que pueden tener impacto en la disminución significativa de gérmenes multirresistentes, por lo que se requiere el perfeccionamiento de protocolos encaminados a fortalecer las estrategias de control de infecciones y el manejo racional de antibióticos en cada hospital, donde la vigilancia del uso y de la resistencia debe ser una prioridad, además del uso adecuado de antibióticos en animales.

VI. CONCLUSIONES

- Se detectó resistencia a la colistina en diferentes especies de enterobacterias que causaron infección severa, en unidades de cuidados intensivos de diferentes hospitales del país, lo que constituye una alarma por la no disponibilidad de antimicrobianos de nueva generación para el manejo terapéutico, lo que a su vez incrementa el riesgo de muerte.
- El método de difusión en gradiente *E-test* no debe continuar su uso rutinario en la red de laboratorios del país, y se requiere la necesidad de implementar los métodos de elución de discos y/o de predifusión con tabletas de colistina, que constituyen herramientas útiles para evaluar la susceptibilidad a este antibiótico.
- La presencia de aislados clínicos de enterobacterias con extremodrogresistencia y pandrogresistencia no reportados con anterioridad por el LNR-IAAS/IPK suponen una amenaza grave para el manejo terapéutico de las infecciones por enterobacterias.

VII. RECOMENDACIONES

- Informar a las autoridades de salud pública de Cuba sobre la circulación de aislados resistentes a colistina, la elevada resistencia antimicrobiana tanto a nivel hospitalario como comunitario y el incremento concomitante de aislados XDR y PDR, con vista a lograr el monitoreo continuo de la susceptibilidad antimicrobiana en el país.
- Implementar los métodos de elución de discos de colistina y/o predifusión con tabletas de colistina como herramientas confiables para la correcta evaluación de la susceptibilidad a este antimicrobiano en los laboratorios de microbiología de la red del país y proponer el desuso de las tiras de gradiente de concentración (*E-test*) debido a su baja robustez.
- Realizar estudios de caracterización molecular para determinar la posible circulación del gen *mcr-1* relacionado con la resistencia transferible a la colistina, por su trascendencia clínica, epidemiológica y terapéutica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Montero Hernández A, Gutiérrez Urbón J. Colistina, aprendiendo a dosificar este viejo antibiótico. Dialnet [Internet]. 2015 [citado 17 de diciembre 2018];9:59-65. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/278848467_N9_Revista_Multidisciplinar_de_Insuficiencia_Cutanea_Aguda.
2. Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Domínguez M, González-Rocha G. Colistín en la era post-antibiótica. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2016 [citado 2 de octubre 2018];33(2):166-76. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182016000200006&nrm=iso.
3. Higueta Gutiérrez L, Jiménez Quiceno J. Brotes hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: revisión sistemática de la literatura. Infectio [Internet]. 2017 [citado 29 de noviembre 2018];21(4):214-22. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012393922017000400214&nrm=iso.
4. Hernández C, Blanco V, Mota G, Correa A, Maya J, De la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Biomédica [Internet]. 2014 [citado 13 de diciembre 2018];34(1):91-100. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1667>.
5. Loera P, López C, Romero C, Luévanos M, Balagurusamy N. Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. RMT [Internet]. 2016 [citado 03 de diciembre 2018];8(2):67-76. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/312324922>.
6. Yi-Yun L, Yang W, Walsh T, Ling-Xian Y, Rong Z, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2016 [citado 02 de octubre 2018];16(2):161-68. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(15\)00424-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00424-7/fulltext).
7. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2017 [citado 02 de octubre 2018];30(2):557-96. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355641/>.
8. WHONET. "XVII Taller WHONET-Argentina". [Internet]. 2017 [citado 15 de octubre 2018]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-2017-final.pdf>.
9. Heras V, López L, Díaz P, Pascual Á. Baja prevalencia de aislados *mcr-1* positivos en enterobacterias en nuestra área. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2017 [citado 16 de enero 2018];35(7):465-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.09.004>.
10. Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day Ma, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella* enterica and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2016 [citado 16 de enero 2018];71(8):2300-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090630>.

VIII. Bibliografía

11. Rolain J, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olumuyiwa A a, Le Page S, et al. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [citado 14 de enero 2018];60(11):6994-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075128/>.
12. Terveer E, Nijhuis R, Crobach M, Knetsch C, Veldkamp K, Gooskens J, et al. Prevalence of colistin resistance gene (*mcr-1*) containing *Enterobacteriaceae* in feces of patients attending a tertiary care hospital and detection of a *mcr-1* containing, colistin susceptible *E. coli*. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 [citado 15 de enero 2019];12(6):1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178598>.
13. Berrazeg M, Hadjadj L, Ayad A, Drissi M, Rolain J. First detected human case in Algeria of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in a 2011 *Escherichia coli* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [citado 14 de enero 2019];60(11):6996-7. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/60/11/6996>.
14. Leangapichart T, Gautret P, Brouqui P, Mimish Z, Raoult D, Rolain J. Acquisition of *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [citado 18 de enero 2019];60(11):6998-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AAC.01486-16>.
15. Singh S, Pathak A, Kumar A, Rahman M, Singh A, Gonzalez B, et al. Emergence of chromosome-borne colistin resistance gene *mcr-1* in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from India. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 [citado 14 de enero 2018];62(2):1-3. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AAC.01885-17>.
16. Mediavilla J, Patrawalla A, Chen L, Chavda K, Mathema B, Vinnard C, et al. Colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and bla_{NDM-5}, causing a complicated urinary tract infection in a patient from the United States. *mBIO* [Internet]. 2016 [citado 17 de enero 2019];7(4):1-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578755>.
17. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón Miryan, Busignani S, Espínola C, et al. Resistencia plasmídica a colistin por el gen *mcr-1* en *Enterobacteriaceae* en Paraguay. *Rev Salud Pública Parag* [Internet]. 2018 [citado 22 de enero 2019];8(1):44-8. Disponible en: www.ins.gov.py/revistas/index.php/rspp/article/view/507.
18. Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Alerta epidemiológico: Emergencia de resistencia plasmídica (transferible) a colistina/polimixina B *mcr-1** en Argentina. *Boletín informativo 22* [Internet]. 2016 [citado 20 de noviembre 2018](Febrero):1-9. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/02/Alerta-epidemiol%C3%B3gico.pdf>.
19. Ortega D, Barba P, Zurita J. Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2016 [citado 17 de enero 2018];144:2967–70. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>.
20. Delgado J, Ovejero C, Abadia L, Gonzalez B. Coexistence of *mcr-1* and bla_{NDM-1} in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 [citado 17 de enero 2019];60(1):6356–8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27431212>.
21. Ugarte R, Olivo J, Corso A, Pasteran F, Albornoz E, Sahuanay Z. Resistencia a colistín mediado por el gen *mcr-1* identificado en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Primeros reportes en el Perú. *An Fac med* [Internet]. 2018 [citado 09 de

VIII. Bibliografía

- octubre 2018];79(3):213-7. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832018000300004&nr m=iso.
22. Legarraga P, Wozniak A, Prado S, Estrella L, García P. Primera comunicación en Chile de la detección del gen *mcr-1* en un aislado clínico de *Escherichia coli* resistente a colistín. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2018 [citado 14 de enero 2019];35(4):453-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30534935>.
23. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Alerta Epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud publica en las Américas. [Internet]. 2016 [citado 22 de febrero 2018]. Disponible en: www.paho.org.
24. Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Desafíos en los métodos de evaluación de la sensibilidad a polimixinas (colistina/polimixina b). Boletín informativo 5 [Internet]. 2017 [citado 2 de octubre 2018](Septiembre):1-15. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Boletin-PCC-NAC-Nro.5-Metodos-de-Evaluacion-Sensibilidad-a-POLIMIXINAS-Sep-20171.pdf>.
25. CLSI-EUCAST. Polymyxin breakpoints working group. recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLS/271-EUCAST Working Group [Internet]. 2016 [citado 14 de diciembre 2017]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf.
26. Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Método de elución de discos de colistín. Protocolo adaptado por el Laboratorio Nacional de Referencia [Internet]. 2017 [citado 3 de octubre 2018];2(Agosto):1-4. Disponible en: <https://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Met-deEluci%C3%B3n-de-Discos-de-COL-version2-Agosto2017.pdf>.
27. Inserto Kit Tabletas de colistín Rosco Neosensitabs. Kit for detection of COLISTIN resistance in *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* and *Acinetobacter* - (98018) -. [Internet]. 2016 [citado 10 de enero 2018]. Disponible en: www.rosco.dk.
28. Guerrero C, Guillén A, Rojas R, Díaz A, Noriega E. Resistencia antibiótica de bacilos gram negativos de ambientes intrahospitalarios. Cátedra Villareal [Internet]. 2016 [citado 03 de diciembre 2018];4(1):101-14. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316288568_Resistencia_antibiotica_de_bacilos_gramnegativos_de_ambientes_intrahospitalarios.
29. Puerta A, Mateos F. Enterobacterias. Medicine [Internet]. 2010 [citado 04 de diciembre 2018];10(51):3426-31. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541210700561>.
30. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. *Enterobacteriaceae*. Diagnóstico microbiológico. Vol 4. 3era ed. México: Médica Panamericana; 1988. p. 203-67.
31. Ruiz Carrascoso G. Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 en el contexto de un brote hospitalario,. [Tesis Doctoral]. España, Universidad Complutense de Madrid; 2016.
32. Cué Brugueras M, Morejón García M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. Rev Cubana Med Gen Intefr [Internet]. 1998 [citado 02 de octubre 2018];14(4):347-61. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251998000400008.

VIII. Bibliografía

33. Serra Valdés M. Resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Rev Haban Cienc Méd* [Internet]. 2017 [citado 03 de diciembre 2018];16(3):402-19. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2017000300011.
34. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *ACIN* [Internet]. 2008 [citado 03 de diciembre 2018];12(3):217-26. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>.
35. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. *Rev Cubana Med* [Internet]. 2013 [citado 15 de diciembre 2018];52(4):272-80. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232013000400006.
36. López M, Barcenilla F, Amaya R, Garnacho J. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Med Intensiva* [Internet]. 2011 [citado 03 de diciembre 2018];35(1):41-53. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912011000100008&nrm=iso.
37. López L, Pascual Á. Epidemiología de las BLEE en la comunidad: un problema emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007 [citado 04 de diciembre 2018];25(2):23-8. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-13112085>.
38. Martínez L. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Rev Med Valdecilla* [Internet]. 2016 [citado 05 de diciembre 2018];1(1):7-16. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/13879>.
39. Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2015 [citado 30 de noviembre 2018];33(10):692-9. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>.
40. Moreno Monge K. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Rev Méd Costa Rica y Centroamerica* [Internet]. 2013 [citado 15 de octubre 2017]:599-605. Disponible en: www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf.
41. Cercenado E. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2015 [citado 13 de diciembre 2018];28(1):8-11. Disponible en: http://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_sup1_cercenado.pdf.
42. Rodríguez Cundín P, Antolín F, Wallmann R, Fabo M, Portal T, H. RR. Epidemiología de los gérmenes multirresistentes. *Rev Med Valdecilla* [Internet]. 2016 [citado 15 de diciembre 2018];1(1):26-30. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/13822>.
43. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infec* [Internet]. 2011 [citado 25 de octubre 2018];18(3):268-81. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
44. RENAVE. Protocolo de vigilancia y control de microorganismos multirresistentes o de especial relevancia clínico-epidemiológica (Protocolo-MMR). Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica [Internet]. 2016 [citado 01 de noviembre 2018]:1-85. Disponible en: http://www.isciii.es/isciii/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/pdf_2016/protocolo-mmr.pdf.

VIII. Bibliografía

45. Detección y notificación de patógenos multi-resistentes, con resistencia extrema o pan-resistentes. Uruguay: Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos y Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos 2019.
46. Pineda L, Tzoc E, Rivera M, Herrera L, Moncada M. Caracterización clínico y epidemiológica en pacientes con infección por *Enterobacteriaceae* productoras de B-lactamasas de espectro extendido (BLEE), Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras, Año 2013. Revista Ciencia y Tecnología [Internet]. 2017 [citado 13 de diciembre 2018];20:50-66. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S119801020653>.
47. Valverde A, Coque T, García L, Baquero F, Cantón R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum B-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2008 [citado 8 de abril 2019];61(4):64-72. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/5878121_Complex_molecular_epidemiology_of_extended-spectrum_b-lactamases_in_Klebsiella_pneumoniae_A_long-term_perspective_from_a_single_institution_in_Madrid.
48. Salgado P, Gilsanz F, Maseda E. Aproximación terapéutica empírica a la infección por gram negativos resistentes. Valor de los factores de riesgo. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2016 [citado 13 de diciembre 2018];29(1):26-30. Disponible en: <https://seq.es/resumen-del-articulo/resumen-articulo-2016/rev-esp-quimioter-2016-29suppl-126-30/>.
49. Ocampos Ugarte J, Takahasi Alvarez E. Enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes del Servicio de Clínica Médica del Hospital Nacional de Itaguá. Rev virtual Soc Parag Med Int [Internet]. 2015 [citado 13 de diciembre 2018];2(2):33-42. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S2312-38932015000200004&script=sci_abstract&tlng=es.
50. Diene S, Rolain J. Carbapenemase genes and genetic platforms in gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2014 [citado 10 de diciembre 2018];20:831-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14650874>.
51. Salgado P, Gilsanz F, Maseda E. Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. Rev Esp Quimioter [Internet]. 2015 [citado 26 de octubre 2018];28(1):12-5. Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/28/sup1/salgado.pdf>.
52. Coria J, Ramírez A, Gutiérrez Y. Polimixinas en la era de la multidrogorresistencia. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría [Internet]. 2011 [citado 17 de octubre 2018];25(98):66-70. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinped/eip-2011/eip114i.pdf>.
53. Medina J, Paciel D, Noceti O, Rieppi G. Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. Rev Méd Urug [Internet]. 2017 [citado 11 de octubre 2018];33(3):195-206. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902017000300079&nrm=iso.
54. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos y polimixinas. Enferm Infect Microbiol Clin [Internet]. 2009 [citado 17 de diciembre 2018];27(3):178-88. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aminoglucosidos-polimixinas-S0213005X09000986>.

55. Turlej A, Zarkotou O, Basil X, Pournaras S, Malhotra S. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017 [citado 4 de febrero 2019];2(1):1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3140-3>.
56. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin e evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2018 [citado 7 de enero 2019];24:865-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29221995/>.
57. Rodríguez C, Maza J, Vay C, Nastro M, Famiglietti A. Detección rápida de resistencia adquirida a colistina en *Enterobacteriaceae*. *UBA* [Internet]. 2017 [citado 20 de marzo 2018];1(2):1-8. Disponible en: https://www.aam.org.ar/src/img_up/19092017.1.pdf.
58. Servicio Antimicrobianos del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Método de Screening “COLISTIN AGAR-SPOT”. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>.
59. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Pennsylvania, USA 2018. Available from: www.clsi.org.
60. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial disk susceptibility tests. Pennsylvania, USA 2018. Available from: www.clsi.org.
61. Cortés Reyes E, Rubio Romero J, Gaitán Duarte H. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Fecolsog* [Internet]. 2010 [citado 17 de mayo 2019];61(3):1-12. Disponible en: http://www.fecolsog.org/userfiles/file/revista/Revista_Vol61No3_Julio_Septiembre_2010/v61n3a09.htm.
62. Oliva Menacho J, Oliva Candela J, Garcia Hjarle M. Bacterias patógenas multidrogoresistentes aisladas en estetoscopios de médicos en un hospital de nivel III. *Rev Med Hered* [Internet]. 2017 [citado 23 de abril 2019];28:242-6. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2017000400005.
63. Antibacterial agents in clinical development. An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Available from: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>.
64. Pérez Vereá L, Olivera Reyes Y, Alcalde Mustelier G. Infecciones nosocomiales y resistencia antimicrobiana en la UCI del Hospital J. Albarrán 2015-2016. *Rev Cub Med Int Emerg* [Internet]. 2018 [citado 7 de enero 2019];2:1-10. Disponible en: <http://www.revmie.sld.cu/index.php/mie/article/view/475>.
65. Nastro M. Enterobacterias con resistencias emergentes: Caracterización fenotípica y genotípica y evaluación de la actividad de viejos y nuevos antimicrobianos. [Tesis Doctoral]. Argentina, Universidad de Buenos Aires; 2016.
66. Vázquez Belizón YE, González Aguilera JC, González Pompa JA, Santisteban García AL. Factores de riesgo de infección intrahospitalaria en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos. *MEDISAN* [Internet]. 2013 [citado 3 de mayo 2019];17(8):3068-76. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192013000800012.

VIII. Bibliografía

67. McGowan J, Carlet J. Antimicrobial resistance: A worldwide problem for health care institutions. *Am J Infect Control* [Internet]. 1998 [citado 14 de febrero 2019];26(6):541-3. Disponible en: [https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(98\)00107-2/fulltext](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(98)00107-2/fulltext).
68. Siniritas M, Akalin H, Gedikoglu S. Investigation of colistin sensitivity via three different methods in *Acinetobacter baumannii* isolates with multiple antibiotic resistance. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2009 [citado 12 de febrero 2019];13:217-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230734>.
69. Arroyo LA, García M, Pachón M, Llanos A, Ruiz M, Pachón J, et al. *E-test* y Microdilucion reliability of the *E-Test* method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J CLIN MICROBIOL* [Internet]. 2005 [citado 9 de abril 2019];43(2):903–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695701>.
70. Somily AM. Comparación de la prueba *E-test* y los métodos de difusión en disco para la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de la colistina en bacilos gram negativos multirresistentes. *Saudi Med J* [Internet]. 2010 [citado 6 de diciembre 2018];31(5):1-2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/20464039/?i=2&from=/18328674/related>.
71. Herrera M, Mobilia L, Posse Graciela. Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima: Detección de aislamientos heterorresistentes. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet]. 2011 [citado 10 de enero 2019];43(2):115-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213019228009>.
72. Wilkins T, Thiel T. Modified Broth-Disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1973 [citado 10 de diciembre 2018];3(3):350-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC444414/>.
73. Simner P, Bergman Y, Trejo M, Roberts A, Marayan R, Tekle T, et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against gram negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2019 [citado 4 de marzo 2019];57(2):1-7. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/57/2/e01163-18>.
74. Castro Orozco R, Barreto Maya A, Guzmán Álvarez H, Ortega Quiroz R, Benítez Peña. Patrones de resistencia antimicrobiana en uropatógenos gram negativos aislados de pacientes ambulatorios y hospitalizados Cartagena, 2005-2008. *Rev salud pública* [Internet]. 2010 [citado 8 de mayo 2019]; 12(6):1010-9. Disponible en: <https://scielosp.org/pdf/rsap/2010.v12n6/1010-1019>.
75. Cornejo Avendaño J, Ramírez Rosales A. Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la unidad de cuidados intensivos de adultos. *Enf Inf Microbiol* [Internet]. 2012 [citado 16 de enero 2019];32(4):127-33. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/287459847>.
76. Zayas A. Caracterización microbiológica de *Klebsiella* aisladas en hospitales cubanos. [Tesis Maestría], Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012.
77. Leski T, Taitt C, Bangura U, Stockelman M, Ansumana R, Cooper W, et al. High prevalence of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolated from outpatient urine samples but not the hospital environment in Bo, Sierra Leone. *Infectious Diseases* [Internet]. 2016 [citado 10 de marzo 2019];16(167):2-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090787>.
-

VIII. Bibliografía

78. Livermore D, Woodford N. The B-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol [Internet]. 2006 [citado 18 de marzo 2019];14(9):413-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876996>.
79. Rahal J, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J, et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. JAMA [Internet]. 1998 [citado 12 de marzo 2019];280:1233-7. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/188047?apld=scweb>.
80. Carmona Y. Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas procedentes de hospitales cubanos. [Tesis Maestría]. La Habana, Instituto de medicina tropical "Pedro Kourí"; 2016.
81. García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gram negativas. Rev Cub Salud Pública [Internet]. 2014 [citado 12 de enero 2019];40:129-35. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000100013&nrm=iso.
82. Quiñones D, Carvajal I, Perez Y, Hart M, Perez J, Garcia S, et al. High prevalence of bla_{OXA-23} in *Acinetobacter* spp. and detection of bla_{NDM-1} in *A. soli* in Cuba: report from National Surveillance Program (2010–2012). New Microbe and New Infect [Internet]. 2015 [citado 20 de mayo 2019];7:52-6. Disponible en: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.
83. Endimiani A, Patel G, Hujer K, Swaminathan M, Perez F, Rice L, et al. *In vitro* activity of fosfomicin against bla_{KPC} containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2010 [citado 19 de mayo 2019];54(1):526-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798518/>
84. Quiñones D, Carmona Y, Zayas A, Abreu M, Salazar D, García S, et al. Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Klebsiella* spp. y producción de B-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2014 [citado 02 de octubre 2018];66:386-99. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(15\)00424-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00424-7/fulltext).
85. Sheng Z, Hu F, Wang W, Guo Q, Chen Z, Xu X, et al. Mechanisms of Tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2014 [citado 31 de mayo 2019];58(11):6982-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4249433/>
86. Chiu S, Chan M, Huang L, Lin Y, Lin J, Lu P, et al. Tigecycline resistance among carbapenemresistant *Klebsiella Pneumoniae*: clinical characteristics and expression levels of efflux pump genes. PLoS ONE [Internet]. 2017 [citado 31 de mayo 2019];12(4):1-15. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175140>
87. Barrantes González M. Estudio prospectivo observacional del uso de tigeciclina: efectividad, factores de riesgo de mortalidad y evolución temporal de consumo y prescripción tras una serie de alertas de seguridad. [Tesis Doctoral]. España, Universidad Autónoma de Barcelona; 2017.
88. Quiñones Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Rev Cub Med Trop [Internet]. 2017 [citado 22 de marzo 2019];69:1-17. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009&nrm=iso.

VIII. Bibliografía

89. Paterson D, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram negative bacilli. Clin Infect Dis [Internet]. 2007 [citado 17 de abril 2019];1(45):1179-81. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17918079>.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Modelo de recolección para la vigilancia nacional de pacientes infectados con bacilos Gram negativos portadores de fenotipos emergentes de resistencia.

Anexo I. Modelo de recolección de datos para pacientes infectados con bacilos Gram negativos portadores de fenotipos emergentes de resistencia

Nombre del Hospital: _____

Número de entrada de la muestra: _____ Fecha: _____

1- Nombre del paciente: _____

2- No. HC: _____

3- Edad: ____ añosmeses.

4- Sala de hospitalización : _____

5-Provincia _____ Municipio _____

6-Tipo de muestra:

Hemocultivo _____

Espuito o aspirado bronquial _____

Lavado bronquioalveolar _____

Otro tipo de muestra respiratoria _____

Herida/absceso (especificar localización) _____

Orina _____

Catéter _____

LCR _____

Otras, ESPECIFICAR _____

7. Fallecido

No ____ Si ____

8. Resultados microbiológicos:

Identificación de especie: _____

Susceptibilidad antimicrobiana: _____

Anexo 2. Aval de comisión Científica Especializada de Microbiología emitida a favor del estudio “Susceptibilidad a la colistina en bacilos Gram negativos aislados en hospitales cubanos. IPK, 2012 – 2018”.

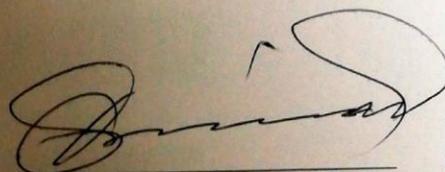
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), ha aprobado el Protocolo de Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología titulado: **Susceptibilidad a la colistina en bacilos Gram negativos aislados en hospitales cubanos. IPK, 2012-2018**, de la *Q.F. Karla Estefanía Pacheco Cárdenas* y que tiene como tutoras a la Dra. Dianelys Quiñones Pérez, DrC. y la Dra. Yenisel Carmona Cartaya, MSc.

La ejecución de esta investigación permitirá introducir en el Laboratorio Nacional de Referencia de las Infecciones Asociadas a la Asistencia Sanitaria nuevos métodos, aceptados internacionalmente, para la evaluación de la susceptibilidad a la colistina. De esta manera, se obtendrán resultados avalados científicamente para mantener la vigilancia activa de la resistencia a este antimicrobiano y recomendar el más adecuado para su futura introducción en la red de microbiología del país.

La presente propuesta forma parte del proyecto asociado a programa **Fortalecimiento de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana en patógenos gramnegativos causantes de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria**, código 283, LNR-IAAS, IPK.



Dr. Carlos M. Fernández Andreu
Secretario CCEM, IPK

La Habana, 7 de mayo de 2018



Anexo 3. Aval del Comité de Ética Institucional del IPK emitido a favor del estudio “Susceptibilidad a la colistina en bacilos Gram negativos aislados en hospitales cubanos. IPK, 2012 – 2018”.



**COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 57-18

**“Susceptibilidad a la colistina en bacilos Gram negativos aislados en
hospitales cubanos. IPK, 2012-2018”**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL
Q.F. Karla Estefanía Pacheco Cárdenas**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. APROBADO SIN MODIFICACIONES, el protocolo presentado. La presente investigación constituye una tarea del proyecto de investigación CEI-IPK 39-17, aprobado previamente por el CEI-IPK (Investigador Principal: Dra. Dianelys Quiñones)

Dado, en el IPK, La Habana, a los 29 días del mes de mayo de 2018

<p>DrCs. Eric Martínez Torres Presidente</p> <p>DrCs. Pedro Mas Bennejo Vicepresidente</p> <p>DrC. Iliana Valdés Hernández Secretaria</p>	<p>DrC. María Caridad Montalvo Villalva Miembro</p> <p>DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez Miembro</p>
---	--

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
PEDRO KOURÍ
COMITÉ DE ÉTICA DE
LA INVESTIGACIÓN
CEI - IPK



Anexo 3. Aval del Comité de Ética Institucional del IPK emitido a favor del estudio “Susceptibilidad a la colistina en bacilos Gram negativos aislados en hospitales cubanos. IPK, 2012 – 2018”.

