

Características operativas de la nefelometría láser del sistema Uro4 HB&L™ de ALIFAX en la detección de resistencia a meropenem en Enterobacterias caracterizadas por espectrometría de masas a partir de hemocultivos



Silvia María Herrera Ochoa

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para obtener el título de:
Bacterióloga**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de ciencias
Departamento de microbiología
Carrera de bacteriología**

Bogotá D.C 2021

Características operativas de la nefelometría láser del sistema Uro4 HB&L™ de ALIFAX en la detección de resistencia a meropenem en Enterobacterias caracterizadas por espectrometría de masas a partir de hemocultivos

TRABAJO DE GRADO

**Silvia María Herrera Ochoa
Estudiante de bacteriología**

Directora

Beatriz Elena Ariza Ayala MSc.

Codirectora

Alba Alicia Trespalacios Rangel MSc. PhD

Evaluador

Luisa Fernanda Martínez BSc, MSc, Esp.

~NOTA DE ADVERTENCIA~

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

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

~ Agradecimientos ~

Agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana y la facultad de ciencias por permitirme tener la oportunidad de estudiar la carrera de bacteriología y de conocer a personas maravillosas que me han brindado conocimiento y amor por la ciencia.

A mi directora la Dra. Beatriz y codirectora la Dra. Alba Alicia quien, con su paciencia, dedicación y enseñanza, que me han permitido finalizar mi trabajo de grado, les agradezco por su compañía y confianza depositada en mi para la realización de este proyecto a pesar de las adversidades.

Al Hospital Universitario San Ignacio y al laboratorio clínico por permitirme realizar mi fase experimental en sus instalaciones.

A la Dra. Gloria del área de microbiología por su paciencia y acompañamiento durante esta fase experimental, quien me guió a realizar todos los montajes de manera correcta, también a todas las bacteriólogas la Dra. Erika, la Dra. Angela, la Dra. Dayana, la Dra. Roció, la Dra. Paola, la Dra. Xatli y Sol del área de microbiología, que me acompañaron y me brindaron su apoyo con su conocimiento en mis momentos de duda e inquietud, a Diana Salgado por sus palabras de aliento y a su interés durante este proceso.

A la empresa Vélez Lab. y a las asesoras científicas Shirley y Francly que me brindaron toda la capacitación y el acompañamiento para lograr la fase experimental de mi trabajo, por su seguimiento constante, confianza y su paciencia.

A mi familia, a mi papá José Luis y a mi mamá Siriaca por su apoyo, amor y cariño incondicional durante mi proceso, a mis hermanos María Fernanda, María José y José Francisco que siempre han creído en mí dándome palabras de ánimo.

A mis mascotas Magolita, Manolo, Charlie, Violeta y Aurora que me brindaron su compañía y lealtad durante las noches de estudio.

A mis amigas y compañeras de la carrera Heidy, Ana, Zully, Nath, Paola y María Camila que creyeron en mí y me brindaron tranquilidad y consejos importantes para la culminación de este trabajo, también a agradezco a mis compañeros de la carrera que me apoyaron con sus palabras de aliento.

A David por su apoyo, cariño incondicional y acompañamiento permanente, por darme ánimos para seguir adelante y no rendirme jamás.

A mi amigo Andrés, quien a pesar de la distancia siempre ha creído en mi en la realización de mis metas y me brindo palabras de aliento para seguir adelante con mis metas.

A Dios por darme sabiduría y paciencia para perseverar en los tiempos de tormenta.

~ Dedicatoria ~

Dedico este trabajo a todas aquellas personas a quienes pueda aportar conocimiento y respuestas.

A todos mis amigos, conocidos y profesores quienes creyeron y confiaron en mi en la culminación de este trabajo.

A aquellos estudiantes que alguna vez sientan miedo e incertidumbre porque no han podido realizar su trabajo de grado, que sientan miedo y ansiedad por no saber qué camino tomar, el miedo nos nubla la perspectiva y muchas veces pensamos lo peor, que no servimos para esto, que hay personas con mejor talento, pero en realidad las cosas no son así, nadie es mejor que nadie, cada persona tiene fortalezas que nos permite avanzar y debilidades que pueden ser manejadas y superadas, a veces solo necesitamos palabras de aliento que nos ayude con esta búsqueda para darnos cuenta que somos capaces de muchas cosas increíbles, que a pesar de las adversidades hemos podido lograr concluir una etapa en nuestras vidas para dar paso a más experiencias. No se rindan en su búsqueda, hay un mundo con un sinnúmero de posibilidades que aún están ahí para ser descubiertas.

A aquellos estudiantes como yo, que les ha costado avanzar por ser muy introvertidos, por creer que son menos que los demás, quiero decirles que no se rindan, somos capaces de ir más allá de lo que imaginamos, solo hay que tener un poco más de confianza en nosotros mismos y tendremos resultados increíbles que nos permitirán dar un paso más al gran mundo de la ciencia.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| 1. RESUMEN | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 3.1 Planteamiento del problema..... | 13 |
| 3.2 Justificación..... | 15 |
| 4. MARCO TEÓRICO..... | 17 |
| 4.1 Herramientas de identificación y comportamiento <i>in vitro</i> antibacteriano de bacilos Gram negativos | 19 |
| 4.2 Nefelometría láser en la detección de la resistencia bacteriana | 20 |
| 5. OBJETIVOS | 26 |
| 5.1 Objetivo general | 26 |
| 5.2 Objetivos específicos | 26 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 27 |
| 6.1 Coloración de Gram a hemocultivos positivos | 28 |
| 6.2 Cultivo convencional | 28 |
| 6.3 Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF | 28 |
| 6.4 Prueba de susceptibilidad por lectura de la MIC con VITEK®2 | 29 |
| 6.5 Prueba de nefelometría láser con Uro4 HB&L ALIFAX/Meropenem..... | 29 |
| 6.6 Pruebas confirmatorias fenotípicas de resistencia a carbapenémicos..... | 30 |
| 6.6.1 Test de Hodge | 30 |
| 6.6.2 Sinergismo con ácido borónico..... | 30 |
| 6.6.3 Sinergismo con EDTA | 30 |
| 6.7 Control de calidad | 30 |
| 6.8 Tabla de variables..... | 31 |
| 6.9 Análisis estadístico..... | 33 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 34 |
| 7.1 Resultados | 34 |
| 7.2. Discusión..... | 41 |
| 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 45 |

| | | |
|-----|---------------------------------|----|
| 8.1 | Conclusiones..... | 45 |
| 8.2 | Recomendaciones..... | 45 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS..... | 46 |
| | ANEXOS | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido
- CHCA:** Matriz ácido α -ciano-4- hidroxicinámico
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- HUSI:** Hospital Universitario San Ignacio
- IAAS:** Infecciones asociadas al cuidado de la salud
- INS:** Instituto Nacional de Salud
- MALDI-TOF:** Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
- MIC:** Minimum Inhibitory Concentration - Concentración mínima inhibitoria
- MLN:** Nefelometría láser en microplacas
- OMP:** Outer Membrane Protein - Porinas
- PCR:** Polymerase Chain Reaction - Reacción en cadena de la polimerasa
- PIC:** Porcentaje de Capacidad Inhibitoria
- PNA-FISH:** Hibridación *in situ* de ácidos nucleicos
- PROA:** Programa de optimización para el uso de antimicrobianos
- UCI:** Unidad de cuidados intensivos
- VME:** Very Major Error - Errores muy mayores
- VPN:** Valores predictivos negativos
- VPP:** Valores predictivos positivos

1. RESUMEN

Las bacteriemias junto con la resistencia bacteriana son problemas de salud pública que cobran millones de vidas cada año, principalmente aquellas causadas por bacilos Gram negativos del orden de los Enterobacterales, esto posiblemente debido a un diagnóstico tardío y al tratamiento empírico empleado. Hace varios años se reconoce la relación entre la mortalidad y el tiempo que transcurre antes de una terapia dirigida; saber que existe un aumento de 7,5% de probabilidad de muerte de un paciente por cada hora de retraso en la terapia adecuada, hace prioritario para los profesionales del área de microbiología buscar alternativas no convencionales para la determinación del perfil de susceptibilidad de los bacilos Gram negativos a antimicrobianos y sus altas tasas de resistencia, dentro de las alternativas no convencionales, se encuentra la nefelometría láser, prueba tamiz en la detección de resistencia a diferentes antibióticos como penicilinas, cefalosporinas, betalactámicos y carbapenémicos. En el siguiente trabajo se utilizó la nefelometría láser para la detección de la resistencia al meropenem en Enterobacterales, identificados por espectrometría de masas recuperados a partir de 100 muestras de sangre, lo cual permitió reducir el tiempo comparado con la metodología automatizada de lectura por la MIC permitiendo reducir el tiempo en 6,15 horas.

Los resultados de estos ensayos fueron comparados con la lectura de la MIC para meropenem realizada por el equipo VITEK®2; la identificación de los microorganismos se realizó a partir de cultivos en medios sólidos con un tiempo de incubación de 3 horas por espectrometría de masas (MALDI-TOF) arrojando resultados que no tarda más de 10 minutos. Los resultados obtenidos muestran un índice de concordancia del 97,8% entre la nefelometría láser y el método de lectura por la MIC con una sensibilidad del 91,30% y especificidad del 100%.

Se presentaron dos inconsistencias catalogadas como errores muy mayores en un *Enterobacter cloacae* y en una *Raoultella planticola* las cuales fueron sensibles al meropenem por nefelometría láser y resistentes con el método comparador de lectura por la MIC. No obstante, los resultados finales de este estudio son valiosos por que contribuyen a establecer las características operativas de esta metodología no

convencional en la determinación de sensibilidad o resistencia a un marcador de carbapenémicos como el meropenem, para considerar su uso para reducir el tiempo de alcance la terapia.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente entre los crecientes problemas de salud pública se encuentra la bacteriemia, causada en mayor medida por bacilos Gram negativos del orden de los Enterobacteriales, éstas son anaerobios facultativos que hacen parte de la microbiota intestinal de mamíferos o son de vida libre; también son aislados frecuentemente en el entorno hospitalario y afectan generalmente a pacientes con patologías de base o inmunosuprimidos, causando IAAS, infecciones urinarias, gastrointestinales, pulmonares o de tejidos blandos, (1–4).

El incremento de resistencia a múltiples antibióticos como carbapenémicos, limita en gran medida un diagnóstico y tratamiento adecuado para cada paciente con bacteriemia, causando una mortalidad entre el 40-60% de los casos, (5,6) donde según la Organización Mundial de la salud afecta a 30 millones de personas de las cuales 6 millones fallecen al año por esta causa. (7)

Para el diagnóstico de la bacteriemia, será solicitada una toma de muestras de sangre del paciente con signos y síntomas sugestivos de inflamación sistémica como fiebre y/o taquicardia, esa muestra de sangre será inoculada en botellas de hemocultivo, una vez se detecte crecimiento bacteriano en la botella, se realizará una identificación inicial con tinción de Gram y su resultado deberá notificarse inmediatamente al médico tratante; que iniciará con una terapia empírica. Simultáneamente a partir del hemocultivo positivo, se hace un nuevo cultivo en agares nutritivos para aislamiento de colonias, para realizar la identificación del microorganismo en género y especie, además del perfil de susceptibilidad a antibióticos; todo este proceso podría tardar entre 48 hasta 96 horas respectivamente según la estandarización y el nivel de cada laboratorio.

Actualmente existen herramientas moleculares como la PCR que es empleada en algunos laboratorios para la identificación final de forma rápida y oportuna, pero al ser costosa la hace muy limitada, por lo que se han implementado otras técnicas rápidas y prácticas, como PNA-FISH, inmunocromatografía o espectrometría de masas, (8) está última se distingue de las anteriores, por su rapidez, practicidad y extensa biblioteca de microorganismos identificados, por lo tanto, cada vez más, se observa la migración de

los laboratorios clínicos hacia esta forma de identificación de microorganismos en sus rutinas de trabajo a partir de las colonias crecidas. Ahora bien, es imperante que la espectrometría de masas esté en conjunto con los tiempos del perfil de susceptibilidad a antibióticos, para así poder reportar un antibiograma interpretado con los posibles mecanismos de resistencia en un corto tiempo. Lo anterior se convierte en un doble reto, utilizar las ventajas de la espectrometría de masas en cuanto a la posibilidad de trabajar a partir de colonias con corto periodo de crecimiento (3 horas) o a partir de muestras biológicas (lo cual requiere de kit validados por casa comercial) y a la par, buscar pruebas rápidas de detección ya sea de resistencia a ciertos grupos de antibióticos o a mecanismos de resistencia.

Como pruebas rápidas, se puede emplear la nefelometría láser para la detección de resistencia bacteriana, este principio de lectura implementado por la empresa italiana Alifax® en 2010 un equipo con nombre comercial Uro 4 HB&L™, que analiza cultivos bacterianos y hace pruebas de susceptibilidad, contando con 27 paneles de antibióticos disponibles actualmente. Adicionalmente se pueden realizar directamente de muestras biológicas como hisopados recátales, orinas o hemocultivos. (9) Los resultados brindados por la nefelometría láser sumada a la identificación de microorganismo por espectrometría de masas pueden ser una alternativa viable en el laboratorio clínico que debe ser analizada a través de un modelo con diferentes marcadores de resistencia a antibióticos, teniendo en cuenta la frecuencia y la mortalidad por bacteriemia causada por bacilos Gram negativos del orden Enterobacterales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

La bacteriemia se presenta como una patología de gran importancia a nivel hospitalario, puesto que es una complicación grave de origen desconocido, secundario a una infección o por IAAS ligadas al uso de catéteres y sondas que resultan en la transmisión de microorganismos con ubicuidad hospitalaria, esto conlleva a que la invasión de microorganismos en el torrente sanguíneo cause una disfunción multiorgánica por una reacción inmunitaria exacerbada denominada sepsis, (10–12) adicionalmente que estos microorganismos son capaces de adquirir diversos mecanismos de resistencias empeorando el pronóstico y la condición del paciente lo cual puede llevar a daños irreversibles. (11,12)

En los últimos 30 años la incidencia mundial de sepsis ha aumentado un 13,7% por año, con una tasa de 33-66 casos por cada 100.000 habitantes en países desarrollados respectivamente, en mayor medida por el envejecimiento de la población, ya que se presenta en el 60% de los casos pacientes mayores de 65 años, con una mortalidad del 30%, (12,13) en Colombia según un estudio de López-Medita et al, (14) se presenta una tasa de incidencia de shock séptico de 15,1 casos por cada 10.000 pacientes atendidos en el hospital con prevalencia en mujeres de edad avanzada que presentaban infecciones en el tracto urinario.(14) En el recién nacido se presenta una alta mortalidad por sepsis neonatal causadas en mayor medida por los Enterobacteriales (63,2% de los casos) donde *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* presentaban mayor frecuencia. (15)

Otros datos epidemiológicos relacionados con sepsis, indican una alta mortalidad y prevalencia con un aumento del 8,7% anualmente, (16) en pacientes mayores de 65 años con comorbilidades, se presenta un porcentaje de mortalidad en UCI del 18-35% y aunque se estima que al menos 14 millones de pacientes pueden sobrevivir a una sepsis, luego presentarán una incapacidad a largo plazo por lo que es de vital importancia un diagnóstico rápido y oportuno, ya que al demorar entre 48 a 96 horas el antibiograma

con la identificación correspondiente, aumenta la posibilidad de complicaciones irreversibles o en el peor de los casos el fallecimiento del paciente. (17)

La incidencia de bacteriemia en la población de Estados Unidos se presenta con una tasa de 3 casos por cada 1000 habitantes, en América Latina aunque se desconocen las cifras exactas de incidencia, pero aproximadamente se presenta una tasa del 11,8-37,4%, donde predominan los bacilos Gram negativos en el 52-60% de los casos, (13) sumado a lo anterior las bacteriemias afectan entre un 12-34% en pacientes que se encuentran recluidos en la UCI (18–20) y su mortalidad corresponde principalmente a adultos mayores, pacientes sometidos a algún procedimiento médico invasivo e individuos inmunosuprimidos. (13,21)

Los Enterobacteriales, son de importancia clínica ya que pueden desarrollar resistencia a múltiples fármacos, el CDC, en su reporte anual sobre resistencia bacteriana (22) reporta alrededor de 13.100 casos de resistencia a carbapenémicos por parte de los bacilos Gram negativos incluyendo los Enterobacteriales, causante de 1.100 muertes por año, asimismo hay una tasa de mortalidad mayor a ocho veces de Enterobacteriales resistentes a carbapenémicos en comparación a los sensibles a carbapenémicos. (23–25) En Colombia se reporta un porcentaje de resistencia a los carbapenémicos por parte de *Klebsiella pneumoniae* en la UCI de adultos de 15,6% de resistencia, mientras que en la UCI pediátrica es del 16% y en la UCI neonatal del 4,9%.(26)

Se conocen datos del HUSI de Bogotá del año 2020, donde el microorganismo causante de bacteriemia en pacientes hospitalizados, más frecuente fue *Escherichia coli* representando el 50%, seguido de *Staphylococcus aureus* con el 24%, *Klebsiella pneumoniae* del 21%, *Pseudomonas aeruginosa* del 13% y con un 3% para *Enterococcus faecalis*.

Respecto a el perfil de resistencia obtenidos en la sala de hospitalización general del HUSI, hay una prevalencia de BLEE donde el 10% corresponde a *Escherichia coli* y un 11% a *Klebsiella* spp., por otra parte, la resistencia a carbapenémicos se presenta mayormente en *Klebsiella* spp., con un porcentaje del 6,5%. Por otra parte, en la UCI el microorganismo más frecuente en bacteriemia fue *Klebsiella pneumoniae* con 32%, seguido de *Staphylococcus aureus* con un 26%, *Staphylococcus epidermidis* y

Pseudomonas aeruginosa con un 11% y para *Escherichia coli* con BLEE del 13% y del 3% para la *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos. (27) Para la identificación en el laboratorio clínico, se emplearán botellas de hemocultivos que una vez positivas, se le realizará tinción de Gram para dar un reporte inicial para un tratamiento empírico, donde posteriormente harán un cultivo en agares para aislar el microorganismo para realizar la identificación y antibiograma correspondiente en un tiempo de 48 - 96 horas. Esta demora conlleva a que se sigan viendo afectados los índices de resistencia bacteriana y en la mortalidad.

3.2 Justificación

El tratamiento antibiótico empírico es aquel que se inicia antes de disponer de información completa o definitiva sobre la infección que se desea tratar y es, por tanto, un tratamiento de probabilidad. Por el contrario, la terapia dirigida es aquel tratamiento antibiótico direccionado o motivado por la información resultante de pruebas de actividad *in vitro* de los antibióticos hacia una bacteria, por lo tanto, se aleja de la probabilidad y se acerca a la certeza.

El tiempo que se toma para definir la terapia adecuada en un paciente con bacteriemia es fundamental, considerando que por cada hora de retraso en el informe la probabilidad de muerte del paciente aumenta en un 7.5%, (28) por lo tanto el laboratorio clínico tiene una gran responsabilidad en la detección oportuna del agente infeccioso en sangre y a su vez, en la determinación *in vitro* de la actividad antibiótica sobre la bacteria causante de la infección. Adicionalmente, se tiene la responsabilidad de realizar pruebas que detecten los posibles mecanismos de resistencia a los antibióticos, sobre todo al grupo de antibióticos betalactámicos los cuales son usados como primera línea por su amplio espectro de acción. (29) Los procesos microbiológicos de rutina en el laboratorio clínico pueden tomar entre 48 – 96 horas, dependiendo de la curva de crecimiento del microorganismo y de la carga del agente infeccioso en la sangre.

Teniendo en cuenta lo anterior, sumado al creciente problema de resistencia bacteriana en el entorno hospitalario, en los últimos años se han propuesto diversas sugerencias para que contribuyan en reducir el uso indiscriminado de antibióticos y por tanto contener

la resistencia bacteriana. Actualmente es reconocido los PROA que tiene como objetivo dar recomendaciones y estrategias para reducir el crecimiento de resistencia bacteriana, fomentar el uso responsable de antibióticos y a su vez educar a todas las partes involucradas como al personal de salud y al paciente. Los programas PROA establecen protocolos donde señalan la necesidad del uso de herramientas rápidas de identificación como PNA-FISH, inmunocromatografía, nefelometría, quimiometría, microarreglos entre otras (30), que serán de gran importancia para el inicio, ajuste o suspensión del tratamiento con antibióticos al paciente, (8,31) el compromiso de los profesionales del área de microbiología en los laboratorios clínicos es aportar a la reducción en el tiempo transcurrido entre la instauración de la terapia empírica y el cambio a la terapia dirigida, impactando de esta manera a la reducción de las tasas de mortalidad de estos pacientes.

Entre otras pruebas PROA esta la espectrometría de masas MALDI-TOF la cual permite identificar rápidamente microorganismos a partir de cultivos en medios solidos (8), sin embargo es importante también implementar pruebas que permitan determinar la resistencia a los antibióticos, por lo que la nefelometría láser Uro 4 HB&L puede ser una alternativa ya que da un resultado preliminar en un tiempo de 6 horas de un marcador de resistencia a carbapenémicos directamente de la muestra. (32)

La bacteriemia es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes, por lo que entre más rápido se preinscribe un tratamiento optimo más se reducirán las posibilidades de muerte, adicionalmente en un estudio de Buehler et al. en 2015 (33) resalta que los métodos rápidos tienen un gran impacto en la disminución de la mortalidad y a su vez en disminuir la estancia hospitalaria y el uso prologado de antibióticos, donde el laboratorio clínico tiene un papel muy importante en la identificación y montaje de estas pruebas rápidas que permitan un mejor diagnóstico, adicionalmente Pérez et al en 2014, (34) proponen que las técnicas de identificación rápidas que permitan un resultado de susceptibilidad brindan una mejora significativa en los resultados clínicos y financieros. Por consiguiente, es pertinente la búsqueda e implementación de técnicas rápidas que permitan determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos, entre las propuestas de pruebas rápidas PROA se encuentra la nefelometría láser, la cual se podría utilizar como una prueba tamiz para detectar resistencia a diferentes antibióticos de alto impacto en el tratamiento de infecciones.(11)

4. MARCO TEÓRICO

La invasión de microorganismos en el torrente sanguíneo comúnmente bacterias es conocida como bacteriemia (35) y es diagnosticada mediante hemocultivos. (36) Las botellas usadas para la realización de los hemocultivos se componen principalmente de un medio basal enriquecido que permiten el crecimiento del microorganismo, también el medio tiene un anticoagulante (polianetol sulfonato de sodio) que inhibe parcialmente el sistema del complemento y la actividad fagocítica de leucocitos. La solicitud de toma de hemocultivos se presenta inmediatamente después de que el paciente exhibe un cuadro clínico sospechoso como fiebre o cualquier síntoma de respuesta inflamatoria sistémica, la muestra deberá tomarse en lo posible sin haber iniciado un tratamiento empírico con antimicrobianos, ya que la recuperación de bacterias en una muestra de sangre para hemocultivos es escasa presentándose aproximadamente de 10 a 10^4 UFC/mL dependiendo de factores como el volumen y la cantidad de botellas que se tomen, esto con el fin de aumentar la sensibilidad para recuperación e identificación del microorganismo. (11)

Las bacteriemias se presentan en mayor medida a pacientes hospitalizados en UCI y a su vez el tratamiento empírico empleado para casos de bacilos Gram negativos del orden de los Enterobacterales fermentadores y no fermentadoras productoras de BLEE, (37,38) por lo que el tratamiento de elección son los carbapenémicos.(39) Entre las especies más frecuentes en la producción de BLEE se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. (38) y no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* (40), las cuales tienen una alta capacidad de adquirir resistencias a antibióticos como los carbapenémicos. (41)

Los carbapenémicos son antibióticos de tipo betalactámico de amplio espectro que a diferencia de las penicilinas y las cefalosporinas tienen mayor resistencia a las betalactamasas, enzimas producidas por las bacterias para contrarrestar la acción de los betalactámicos, los carbapenémicos confieren una actividad más potente en los Enterobacterales, de ahí su importancia que se empleen en casos de bacteriemia (42). El mecanismo de acción de los carbapenémicos en bacterias Gram negativas se basa en que los carbapenémicos ingresan a través de las porinas (OMP) que son proteínas

de la membrana externa, traspasan el espacio periplásmico llegando a las PBP's inhibiéndolas, no hay transpeptidación y se detiene la síntesis de la pared celular de la bacteria (43), la resistencia a este grupo de antimicrobianos se basa en la producción de enzimas como las betalactamasas denominadas carbapenemasas que hidrolizan el antimicrobiano evitando su acción, se clasifican en diferentes clases. Las especies que presentan mayor resistencia los carbapenémicos es *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (44,45) la resistencia a los carbapenémicos se da por algunos mecanismos como producción de enzimas e hidrolizan el betalactámico a través de la mutación en la expresión de porinas y PBP's o bombas eflujo.(21,40)

Clasificación de carbapenemasas

Hay tres clases de carbapenemasas (Tabla 1), A y D de tipo serina de importancia clínica en el orden de los Enterobacterales en especies como *Klebsiella pneumoniae*, el grupo A se sitúan enzimas como KPC 1-3, donde hay cepas endémicas en Colombia (KPC-2 y KPC-3) (46,47), en el grupo D la familia de enzimas OXA-48 se presentan en *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y otras especies de Enterobacterales también de importancia clínica (47), por otro lado las carbapenemasas de clase B tipo metallo-carbapenemasas donde su actividad depende de la presencia de zinc, las enzimas que se presentan en este grupo son VIM, NDM1, IMP, GIM y SMP frecuentes en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis* entre otras especies, las metallo-carbapenemasas tienen la capacidad de hidrolizar aztreonam del grupo de los monobactámicos (47). La distribución de las carbapenemasas en Colombia en Enterobacterales fueron las enzimas de tipo KPC, seguido de las NMD y VIM en *Pseudomona aeruginosa*. (26)

Estas resistencias se atribuyen a genes adquiridos como plásmidos e integrones debido a bacteriófagos que los transfieren mayormente en ambientes hospitalarios, (48) también estas resistencias fenotípicas se deben a una combinación de la actividad betalactamasa junto con cambios estructurales de la bacteria y a su vez la producción de betalactamasas que van a hidrolizar el antibiótico (49).

| | Clase | Carbapenemasa | Frecuente en | Características |
|---------------------------|-------|-----------------------------|--|--|
| Tipo serina | A | KPC | <i>K. pneumoniae</i> y otras <i>Enterobacteriaceae</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Algunas enzimas se presentan cromosómicamente como (SME o NMC) y por plásmidos (KPC) • Se inhiben con ácido borónico |
| | | SME | <i>S. marcescens</i> | |
| | | IMI, NMC, GES | <i>Enterobacteriaceae. P. aeruginosa</i> | |
| Tipo metalo-carbapenemasa | B | VIM, NMD, IMP, SMP y GIM | <i>Enterobacteriaceae</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Se dan principalmente por plásmidos • No hidroliza el aztreonam • Dependiente de zinc • Se inhibe con EDTA quelante de zinc |
| Tipo serina | D | Familia OXA-48 | <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. coli</i>) <i>A. baumannii</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Oxacilinasas • Se inhiben parcialmente en ácido clavulánico • En algunos casos portadoras de BLEE |

Tabla 1: Clasificación de carbapenemasas (47,50,51)

Fuente: Tabla adaptada de: (Villegas, M. V. et al (2019)), (Cercenado E. (2015)) y (Suarez, C. J et al (2006))

4.1 Herramientas de identificación y comportamiento *in vitro* antibacteriano de bacilos Gram negativos

Actualmente existen diferentes métodos de identificación, algunos más costosos que otros, por lo que dependiendo de la técnica se realizará una identificación y el diagnóstico en un tiempo variable, comúnmente se emplean técnicas como el estándar de oro la dilución en caldo, métodos automatizadas como la lectura de la MIC por VITEK®2 o de manera convencional, con método de Kirby Bauer, con cultivos en agares y midiendo el halo productor por la inhibición a un antibiótico mediante discos con concentraciones conocidas de antibióticos que para todos los casos es establecido por la CLSI.

Para la identificación del género y la especie de los microorganismos, se utiliza la espectrometría de masas MALDI-TOF en la mayoría de laboratorios clínicos incluyendo el HUSI, (52) MALDI-TOF se constituye de tres unidades funcionales las cuales se componen en una fuente ionizante que va a transferir iones a la muestra que está en fase gaseosa, un analizador de masas que va a separar los iones respecto a su relación

masa/carga y por último una fuente de detección para monitorizar los iones separados, esto se logra agregando a la placa la muestra y una matriz que será analizada, donde tendrá un espectro proteico que será comparado en la base de datos instaurada en el mismo equipo para dar la identificación por género y especie por porcentaje de probabilidad. (53)

En los métodos convencionales para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos se tiene el método automatizado de lectura por MIC con nombre comercial VITEK®2, su principio de lectura es colorimétrica y se basa en la medición de la absorción de luz, para esto se emplean tarjetas colorimétricas que son inoculadas con una suspensión del cultivo puro aislado de un microorganismo, en las tarjetas hay diversos sustratos que medirán la actividad metabólica de cada microorganismo, brindando todo el perfil de susceptibilidad a antibióticos, esto monitoreando el control de crecimiento en 3 concentraciones diferentes de antibióticos con otro control de crecimiento dado el resultado en MIC, dando el reporte del perfil de susceptibilidad. (54–56)

4.2 Nefelometría láser en la detección de la resistencia bacteriana

La nefelometría es una técnica empleada de rutina en el laboratorio de inmunología clínica para la medición de proteínas plasmáticas como las inmunoglobulinas como IgM o IgG, proteína c reactiva, proteínas del complemento como C3 o C4, etc., esta técnica permite la medición de la concentración a través de la turbidez de la muestra analizada, la cual se da a través de un cálculo algebraico analítico que viene incorporado en ese sistema. (57) La nefelometría convencional consiste en una luz emitida chocara con las partículas de una muestra con una turbidez, que va a depender de aspectos como las dimensiones de las partículas en tamaño y forma, ángulo de detección, índice de refracción del medio, longitud de onda, la distancia de la luz y la concentración de partículas presentes en la solución. Además de ser empleada para detectar proteínas séricas del sistema inmune, también detecta complejos antígenos-anticuerpo, y como otros usos diferentes al laboratorio clínico para medir la calidad química del agua y contaminación ambiental. (58,59)

La nefelometría láser puede ser empleada para analizar el comportamiento *in vitro* antibacteriano en el área de microbiología a partir de muestras clínicas sin depender de cultivos puros aislados lo que alargan el tiempo de reporte. Para el orden de los Enterobacterales es de vital importancia detectar marcadores de resistencia como BLEE, AmpC y carbapenemasas, ya que representan un alto índice de mortalidad en pacientes en hospitalización general o en UCI. (11) Para detectar la resistencia por la nefelometría, se mide el crecimiento bacteriano en una concentración conocida de antibiótico, para así empleando el principio de lectura de turbidez por láseres se formarán curvas de crecimiento bacteriano. (60)

Entre los estudios reportados para determinar la susceptibilidad bacteriana por nefelometría láser, en un estudio de Wiegand et al. (60) del año 2012 realizaron esta técnica de MLN para estudiar el efecto de sustancias antimicrobianas en *Staphylococcus aureus* con el fin de evaluar el mejor antiséptico para la reducción de infecciones de heridas, ya que podría conllevar a resistencias, y demostró ser una técnica valiosa para detectar la adaptación microbiana a sustancias antisépticas mediante una incubación prolongada y construcción de curvas de crecimiento *in situ*. Por otro lado, concluyeron que *Staphylococcus aureus* es capaz de adaptarse rápidamente a antisépticos con compuestos de plata y que adicionalmente representaría un problema en el futuro, estos resultados pueden ser reproducibles para evaluar la resistencia a antibióticos.

La empresa ALIFAX en Italia durante el año 2010 (61,62) introdujo el sistema Uro 4 HB&L, el cual inicialmente fue utilizado para realizar cultivos de orina y otros líquidos biológicos, con el principio de detección de positividad del crecimiento de microorganismos por lectura de turbidez con láseres en un tiempo aproximado de 4-6 horas, para luego ajustar este mismo principio, a la detección de resistencia a antibióticos en un tiempo de 5 horas, agregando al caldo la concentración corte (punto de corte del antibiótico) que se requiere para establecer sensibilidad vs. resistencia. La técnica empleada en el sistema Uro 4 HB&L se fundamenta en la dispersión de luz en ángulo recto, que se mide a través de la turbidez, similar a la turbidimetría, pero a diferencia de está, la turbidimetría requiere concentraciones mayores de partículas para que sean detectadas, la nefelometría detecta las partículas en concentraciones menores que se

medirán a partir de la turbidez generada. Por otro lado, las suspensiones bacterianas obtenidas de muestras biológicas como hemocultivos positivos, se inoculan directamente viales de enriquecimiento hasta que llegué a una escala 0,5 Mc Farland para que posteriormente sean inoculados en un vial de referencia sin antibiótico y otro vial con antibiótico para evaluar la sensibilidad o resistencia, se analizará en el equipo HB&L, allí un rayo láser con ángulos establecidos de 30° que es sensible para detectar todas las partículas y de 90° más específico que selecciona por tamaño y forma de las partículas, estos son orientados hacia el viales, en un primer momento se leera la muestra como blanco y posteriormente cada 5 minutos hará 2.000 lecturas en fracciones de segundos cada 5 minutos formando las curvas de crecimiento bacteriano que serán visibles en el monitor, estas curvas de crecimiento se forman gracias a un algoritmo matemático patentado por la empresa. (63,64)

Al iniciar el análisis, se evalúa la Sensibilidad (ausencia de crecimiento) o la Resistencia (presencia de crecimiento) a la concentración (valor crítico) del antibiótico probado mediante el sistema de dispersión de la luz, las señales de crecimiento o de inhibición se miden en tiempos breves, para evaluar el crecimiento del microorganismo en ausencia o presencia del antibiótico, (63) esas señales serán analizadas por un software que va a monitorizar la cinética de las curvas de crecimiento que será capaz de informar la concentración bacteriana. (60,65) La sensibilidad de esta prueba se encuentra en un umbral de 1 a 10^6 bacterias/mL que pueden ser detectadas por la nefelometría láser. (66) Se han realizado diferentes estudios comparado la viabilidad de esta prueba para ser adaptada al laboratorio clínico en la detección de mecanismos de resistencia y reducir el tiempo de diagnóstico y reporte, se han descrito diversos estudios para determinar la resistencia en Enterobacterales presentes en hisopados rectales, con resultados de casi el 97% de concordancia comparado con los resultados de cultivos sólidos, además de una reducción importante en los falsos positivos. (3). Estudios de Marinović et al. (67) realizados en un hospital de Croacia afirman que es útil para la detección de BLEE/AmpC en diferentes tipos de muestras de hisopados rectales, nasales, axilares, etc. tomadas a pacientes hospitalizados en UCI, donde manifiestan que los resultados deben corroborarse con pruebas de confirmación, además de presentar limitaciones con

especies de bacilos Gram negativos no fermentadores que resultaron ser resistente a la cefalosporina empleada en el kit, cabe resaltar que en este estudio se realizaron las identificaciones correspondientes en medios sólidos en su mayoría en Chromoagar. A pesar de que el método se emplea mayormente para determinar crecimiento bacteriano en muestras de orina, se ha podido adaptar para hemocultivos de pacientes hospitalizados en la UCI.

Respecto a los estudios realizados por otros autores Fontana et al en 2012. (68) realizaron con la nefelometría láser en pacientes con sospecha de bacteriemia asociadas a catéter, en comparación con el estándar de oro el método cuantitativo de Maki la cual tiene diversas limitaciones como el tiempo, ya que requiere mínimo 2 días para la obtención de resultados, adicionalmente dificultad en la recuperación de bacterias al interior del catéter, escasa viabilidad y producción de biopelículas, por ende, el uso de la tecnología de la dispersión de luz de la nefelometría láser brindo detección del crecimiento bacteriano en 6 horas a comparación de las 48 horas del método de Maki, lo que otorgo resultados confiables para determinar presencia de una infección en el torrente sanguíneo en estos pacientes.

Para la detección de mecanismos de resistencia en Enterobacterales, los estudios realizados para hemocultivos resaltan la importancia de detectar a tiempo enzimas como las carbapenemasas que involucran un aumento de mortalidad importante por tratamiento inadecuado. Al realizar las comparaciones de los métodos convencionales respecto al de Uro 4 HB&L encontraron que se puede tener resultados casi en tiempo real, brindando información de la presencia y tipo de resistencia que presente el microorganismo problema, con sensibilidad que ronda el 85% y especificidad del 95% aproximadamente, pero hay limitaciones en la detección de microorganismos como *Proteus mirabilis* productora de BLEE, pero a pesar de esto en el estudio de Athamna & Freimann en 2019 (32) demostró que es una técnica muy efectiva en la detección de marcadores de resistencia en *Escherichia coli* con una sensibilidad del 96,4% y *Klebsiella pneumoniae* del 100% respectivamente, lo cual es de importancia ya que estas dos especies están mayormente involucradas en los casos reportados de bacteriemia. (32,66,69)

La empresa italiana Alifax tiene disponible otros equipos con el mismo principio de nefelometría láser, para determinar la susceptibilidad y resistencia a antibióticos en microorganismos aislados en muestras clínicas, el equipo Alfred60^{AST}, por lo que un estudio de Van den Poel et al. en 2020 (70) realizaron una comparación las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y el método de lectura por la MIC de VITEK®2 en hemocultivos positivos. Se estudio el rendimiento de la prueba con Alfred60^{AST} y se obtuvo resultados en menos de 6,5 horas, además de tener un impacto en el 37% de los casos mayormente en bacteriemias por Gram negativos, por otra parte, no mostró resultados significativos en la identificación de fenotipos resistentes de bacilos Gram negativos no fermentadores, por lo que una de sus conclusiones es que se debe mejorar el rendimiento con antibióticos como meropenem para *Pseudomonas* spp., estos resultados similares al estudio realizado por Barnini et al. en 2016, donde empleando la misma metodología con la nefelometría láser obtuvieron discordancias por meropenem para *Pseudomonas* spp y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. (71) Ante estos resultados y discrepancias la empresa Alifax ha incluido a finales de 2019 en su panel de antibióticos, el meropenem para no fermentadores (Ref. 826-MEM *Pseudomona*/CL) para cubrir esta necesidad, que es diferente al que se venía manejando anteriormente (Ref. 825-MEM *Enterobacteriaceae*/CL), que daba resultados discordantes. (72)

Cabe mencionar que de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana brindadas por nefelometría láser es de tamiz, pero a su vez brinda información valiosa para la toma de decisiones por parte del médico tratante respecto al tratamiento antibiótico suministrado al paciente, que puede impactar en los índices de reducción de la resistencia, adicionalmente los autores anteriormente mencionados como Van den Poel et al. (70) resaltan la importancia de emplear herramientas de identificación previas como el MALDI-TOF para obtener mejores resultados en el perfil de susceptibilidad.

Por consiguiente, ambos equipos pueden brindar resultados en menor tiempo, pero el sistema Uro4 HB&L a diferencia del equipo Alfred60^{AST} es un equipo menos robusto para analizar muestras biológicas por lo que su uso es más versátil y cómodo, pero ambos brindan resultados de perfil de susceptibilidad y actividad antimicrobiana residual, empleando el principio de lectura por nefelometría láser, por lo que en laboratorios más

grandes ambos equipos se conectan entre sí para optimizar un mayor flujo de muestras ya que utilizan los mismos kits y reactivos, todo lo anterior mencionado en conjunto con una herramienta de identificación como MALDI-TOF brinda información valiosa para el diagnóstico y tratamiento final. (63,73)

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar las características operativas de la nefelometría láser de Alifax en la detección de resistencia a meropenem en bacilos Gram negativos del orden Enterobacterales identificados a partir de espectrometría de masas recuperados a partir de hemocultivos.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la nefelometría láser de Alifax con respecto al método de lectura por MIC de VITEK® 2 para la detección de resistencia a meropenem en bacilos Gram negativos del orden Enterobacterales.
- Determinar la concordancia de la nefelometría láser de Alifax con respecto al método de lectura por MIC de VITEK® 2 para la detección de resistencia a meropenem en bacilos Gram negativos del orden Enterobacterales.

6. METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Observacional analítico de cohorte prospectivo

❖ **Criterios de inclusión:**

Un hemocultivo positivo para bacilos Gram negativos provenientes de pacientes del Hospital Universitario San Ignacio durante el periodo comprendido entre marzo y mayo del 2021.

❖ **Criterios de exclusión:**

- Muestras diferentes a hemocultivos
- Muestras clínicas provenientes de periodos diferentes a marzo, abril y mayo de 2021
- Hemocultivos positivos polimicrobianos, con Gram positivos o el caso de presentarse más de una especie compuestas por solo Gram negativos

❖ **Tamaño de la muestra:** 100 hemocultivos.

Muestreo por conveniencia, basado en el promedio mensual de hemocultivos positivos para bacilos Gram negativos al mes en el Hospital Universitario San Ignacio de 55,75.

El cálculo del tamaño de muestra se obtuvo con un error del 5%, el tamaño de muestra sería de 131 hemocultivos. Este cálculo se realizó teniendo en cuenta una frecuencia de muestras de hemocultivos positivos resistentes a meropenem del 11,6% en una muestra de 669 hemocultivos positivos para Bacilos Gram negativos procesados en un periodo de 1 año (2020), según estadísticas del laboratorio del Hospital Universitario San Ignacio.

Diagrama de metodología dividido en método convencional y no convencional en anexos.

6.1 Coloración de Gram a hemocultivos positivos

Una vez se obtuvo positividad de la botella de hemocultivo detectada por el equipo BactAlert, se realizó una coloración de Gram, la cual se realiza extrayendo un inóculo de la muestra con una jeringa y se extiende en una lámina, se deja secar y se fija con calor. Posteriormente se le agrega el primer colorante, cristal violeta por 1 minuto para después retirar el exceso con agua, se agrega la solución mordiente lugol por 1 minuto y se retira el exceso con agua, posteriormente se agrega alcohol acetona por 30 segundos y se retira el exceso, finalmente se agrega la coloración de contraste con fucsina o safranina. Se deja seca la lámina y se observa al microscopio para registrar el resultado.

6.2 Cultivo convencional

Una vez se positivizó la botella de hemocultivo, se realizó siembra por agotamiento en los agares (sangre y MacConkey de bioMérieux). Se colocaron en incubación por 18-24 horas a 35°C para la identificación convencional, y para la identificación no convencional solo se incubó por 3 horas.

6.3 Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF

Después de una incubación de 3 horas se tomó una colonia aislada con un asa estéril y se extendió en el pozo de la placa metálica, posteriormente se agregó una gota de matriz CHCA (ácido α -ciano-4- hidroxicinámico, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) y se dejó secar a temperatura ambiente. Se colocó en el MALDI-TOF de bioMérieux VITEK® MS. Se hizo la identificación del género y especie. Es importante que se utilice al máximo de los pozos disponibles en la placa ya que es de un solo uso, además de emplear un pozo central con una cepa de ATCC *Escherichia coli* Ref. 25922 como calibrador para que sea validada la identificación en el equipo.

6.4 Prueba de susceptibilidad por lectura de la MIC con VITEK®2

Para la identificación convencional la incubación fue de 12 horas. Se tomaron las colonias aisladas y se realizó una suspensión 0,5 McFarland con 3 mL de solución salina al 0,45% en un tubo estéril, se agitó hasta disolver completamente, y se verificó la densidad óptica en el DensiCheck. Posteriormente se colocó el tubo con una tarjeta (AST 93 REF 414985) para Gram negativos en el cassette, que va directamente al equipo de VITEK®2. El equipo realiza la dilución y el llenado de las tarjetas para su incubación y posterior lectura a través de la MIC.

6.5 Prueba de nefelometría láser con Uro4 HB&L ALIFAX/Meropenem

Primera fase enriquecimiento: Se utilizó el kit de enriquecimiento “HB&L Culture Kit”, se agrega 10 µL de sangre del hemocultivo positivo en el vial y se ingresó en el equipo HBL&L con el protocolo “Enriquecimiento-Subculture” por 45-90 minutos donde al finalizar la incubación sonará una alarma cuando la muestra este a una escala 0,5 Mc Farland, posteriormente se sacó el vial del equipo y se registró el resultado de las UFC/mL.

Segunda fase de exposición al antibiótico: Se empleo otro kit llamado “AST-meropenem *Enterobacteriaceae*/CL (Ref. 825-MEM)”

En dos viales “Uro-quick” con caldo de enriquecimiento se inocularon 100 µL de la suspensión enriquecida HB&L que está a 0,5 McFarland, posteriormente en solo uno de los viales, se agregó con 200 µL del antibiótico a evaluar (meropenem 4 µg.). Un vial será de control o referencia y el otro determinará la ausencia o crecimiento del microorganismo.

Tercera fase de incubación y lectura: Se introdujeron ambos viales en el equipo HB&L a una temperatura de incubación de 37°C durante 5 horas. Para la interpretación de la prueba se tuvo en cuenta el Porcentaje de Capacidad Inhibitoria (PIC) establecida en el inserto AST-meropenem *Enterobacteriaceae*/CL (Ref. 825-MEM) donde será sensible con un porcentaje de 0-35%, intermedio de 35-50% y resistente de 50-100%, el cual establece con respecto al vial de referencia o control que no tenía antibiótico dando el porcentaje en que puede inhibir el antibiótico.

IMPORTANTE: El antibiótico viene liofilizado por lo que se debió reconstituir con 2 mL de solución reconstituyente que viene directamente del kit AST-meropenem *Enterobacteriaceae*/CL que se dejó reposar 10 minutos, este antibiótico una vez reconstituido tiene una viabilidad de 72 horas.

6.6 Pruebas confirmatorias fenotípicas de resistencia a carbapenémicos

De acuerdo con los resultados de susceptibilidad, se realizaron pruebas confirmatorias de resistencia a los aislamientos que exhibieron resistencia a carbapenémicos.

6.6.1 Test de Hodge: Se sembró masivamente en agar Mueller Hinton una cepa ATCC *Escherichia coli* Ref. 25922 sensible a carbapenémicos, con un disco de meropenem, posteriormente se hicieron estrías de el microorganismo aislado de la muestra y se incubó 18-24 horas a 35 °C.

6.6.2 Sinergismo con ácido borónico: Se estandarizó el microorganismo de la muestra problema a una escala 0,5 de McFarland y realiza siembra de la muestra problema aislada en agar Mueller Hinton, se ubicaron dos sensidiscos de imipenem y ácido borónico con una distancia de aproximada de 15 mm a 24 mm y se incubó 18-24 horas a 35 °C.

6.6.3 Sinergismo con EDTA: Se estandarizó el microorganismo de la muestra problema a una escala 0,5 de McFarland y realizó siembra de la muestra problema aislada en agar Mueller Hinton, se ubicaron dos sensidiscos de meropenem y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) con una distancia aproximada de 15 mm a 24 mm y se incubó 18-24 horas a 35 °C. (74)

6.7 Control de calidad

Se usaron dos cepas control de calidad: ATCC *Escherichia coli* Ref. 25922 sensible a meropenem y ATCC *Klebsiella pneumoniae* Ref. BAA1705 resistente a meropenem.

6.8 Tabla de variables

| Variable | Definición | Tipo de variable | Nivel operativo | Medida de resumen | Fuente de variable |
|---|---|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Coloración de Gram | Es una tinción diferencial para la visualización de bacterias, empleada para realizar una aproximación a la diferenciación morfológica bacteriana, así las que se tiñen de morado se denominan Gram positivas y las que se tiñen de rosado se consideran Gram negativos | Cualitativa nominal politómica | Gram positivo Bacilos, Cocos | Gram positivo | Reporte de estudio |
| | | | Gramnegativo, Bacilos, Cocos | Gram negativo | |
| Identificación de microorganismo o por espectrometría de masas (MALDI-TOF) | Es una técnica de identificación microbiana que emplea la desorción/ionización láser mediante el análisis proteico del microorganismo | Cualitativa | Género y especie | Frecuencias absolutas | Reporte de estudio |
| MIC a meropenem (Concentración mínima inhibitoria) | Se basa en la concentración mínima a meropenem para inhibir el crecimiento del microorganismo | Cuantitativa | Valor en µg/mL | Frecuencias absolutas y relativas | Reporte de estudio |

| | | | | | |
|---|---|---------------------|---|--|---------------------------|
| <p>Prueba confirmatoria Test Hodge</p> | <p>Prueba que permite inferir la producción de carbapenemasas en Enterobacterias mediante la reducción en el diámetro de un indicador carbapenémico que puede ser meropenem o ertapenem</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Positivo</p> <hr/> <p>Negativo</p> | <p>Frecuencia absoluta y relativa</p> | <p>Reporte de estudio</p> |
| <p>Sinergismo con ácido borónico</p> | <p>Es una prueba para determinar carbapenemasas de clase A y D de tipo serina, se emplean sensidiscos de ácido borónico y imipenem</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Positivo para carbapenemasas de tipo serina</p> <hr/> <p>Negativo para carbapenemasas de tipo serina</p> | <p>Frecuencia absoluta y relativa</p> | <p>Reporte de estudio</p> |
| <p>Sinergismo con EDTA</p> | <p>Es una prueba para determinar carbapenemasas de clase B de tipo metallo-carbapenemasa, se emplean sensidiscos de EDTA y meropenem</p> | <p>Cualitativa</p> | <p>Positivo para carbapenemasas de tipo metallo-carbapenemasa</p> <hr/> <p>Negativo para carbapenemasas de tipo metallo-carbapenemasa</p> | <p>Frecuencia absoluta y relativa</p> | <p>Reporte de estudio</p> |
| <p>Resultado de resistencia por método ALIFAX/meropenem en PIC (Porcentaje de capacidad inhibitoria)</p> | <p>Prueba basada en la nefelometría láser para la determinación de resistencia a carbapenémicos. Carbapenémico de uso en estudio: Meropenem</p> | <p>Cuantitativa</p> | <p>Resistente (50-100%)</p> <hr/> <p>Intermedio (35-50%)</p> <hr/> <p>Sensible (0-35%)</p> | <p>Frecuencias absolutas y relativas</p> | <p>Reporte de estudio</p> |

Tabla 2. Variables

6.9 Análisis estadístico

Para la evaluación de la concordancia entre la nefelometría láser (PIC) y el método de lectura de la MIC, se utilizó el índice de concordancia Kappa y se determinaron las características operativas entre ambas metodologías en bacilos Gram negativos del orden de los Enterobacteriales identificados por MALDI-TOF; para el análisis de las características operativas se obtuvo mediante EPIDAT versión 3.1 con un intervalo de confianza del 95% para determinar la diferencia de tiempo en el procesamiento de las técnicas.

Para la comparación de métodos se calculó un coeficiente Kappa de Cohen nominal y su intervalo de confianza al 95%. De acuerdo con los criterios propuestos por Landis y Koch en 1971 (37) se asumirá concordancia entre las metodologías de acuerdo con la interpretación de los valores de la tabla 3.

| Valor de kappa | Fuerza de concordancia |
|----------------|------------------------|
| Menor de 0 | Pobre |
| 0-0.20 | Leve |
| 0.21-0.40 | Baja |
| 0.41-0.60 | Moderada |
| 0.61-0.80 | Buena |
| 0.81-1 | Casi perfecta |

Tabla 3. Interpretación de valores de Kappa. Landis y Koch en 1971 (Landis J., 1977) (75)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados

Se procesaron un total de 100 hemocultivos positivos para bacilos Gram negativos durante el periodo comprendido entre de marzo y mayo del año 2021. Los microorganismos aislados de los hemocultivos fueron identificados por MALDI-TOF (VITEK®MS de bioMérieux) a las 3 horas de incubación a 35 °C a partir de agar sangre. Posteriormente fue confirmada tanto la identificación como su perfil de susceptibilidad utilizando el equipo VITEK®2 a las 3 horas de incubación a 35 °C.

En la tabla 4 se presenta el número de microorganismos identificados a partir de los hemocultivos por género y especie.

| No. de aislamientos | Microorganismo identificado |
|---------------------|------------------------------|
| 28 | <i>Escherichia coli</i> |
| 23 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| 12 | <i>Serratia marcescens</i> |
| 10 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| 7 | <i>Klebsiella aerogenes</i> |
| 7 | <i>Proteus mirabilis</i> |
| 5 | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| 3 | <i>Morganella morganii</i> |
| 3 | <i>Citrobacter freundii</i> |
| 1 | <i>Raoultella planticola</i> |
| 1 | <i>Hafnia paralvei</i> |

Tabla 4. Número de aislamientos obtenidos

Respecto a los perfiles de susceptibilidad de los 100 aislamientos de Enterobacterales, se encontraron por el método comparador de lectura por MIC 77 casos sensibles a meropenem y 23 casos resistentes a meropenem. Sin embargo, como se observa en la figura 1, por la nefelometría láser se encontraron 79 casos sensibles y 21 casos resistentes.

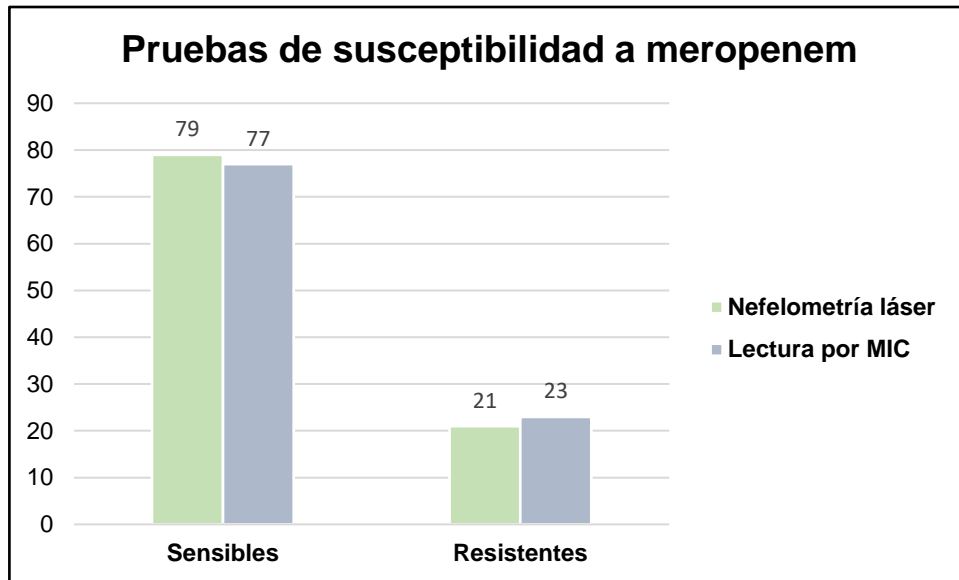


Fig. 1: Resultados de perfil de susceptibilidad a meropenem con nefelometría láser y el método de lectura por MIC

En la figura 2 se encuentran dos gráficas obtenidas con nefelometría láser con HB&L con diferentes lecturas de curvas de crecimiento bacteriano. Para la interpretación de estas gráficas en la figura A se observa la curva de crecimiento cuando la bacteria se encuentra en fase de crecimiento en caldo de enriquecimiento medido a escala Mc Farland, que corresponde a la primera fase mencionada en la metodología. En la figura B, C y D corresponde a la fase 3 de lectura después de la incubación, en la figura B se observa la curva de crecimiento de referencia o control con conteo de UFC/mL, la cual indica que realmente hubo crecimiento del microorganismo el cual tiene un valor límite de 750.000 UFC/mL para ser validado por el equipo, de ser inferior a límite el equipo no brinda un resultado concluyente. Ahora bien, la foto C y D corresponden a los posibles resultados que el equipo puede brindar, en la figura C se observa la lectura de crecimiento por un microorganismo sensible al meropenem (PIC= 0-35%) y en la figura D se observa la curva por un microorganismo resistente al meropenem (PIC= 50-100%).

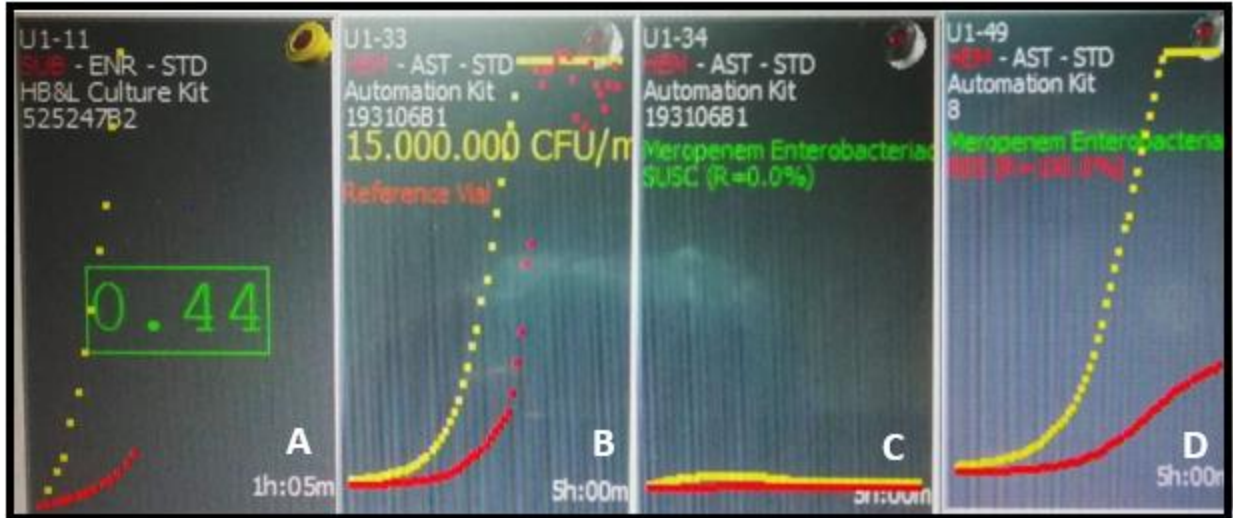


Fig. 2: A: Crecimiento con lectura Mc Farland, B: Crecimiento de referencia con conteo en UFC/mL, C: Resultado de curva por microorganismo sensible, D: Resultado de curva por microorganismo resistente.

Recordemos que el Porcentaje de Capacidad Inhibitoria (PIC) establecida en el inserto AST-meropenem *Enterobacteriaceae*/CL (Ref. 825-MEM) presenta los resultados numéricos por rango que se interpretan como sensible o resistente. Será sensible un PIC de 0-35%, intermedio de 35-50% y resistente de 50-100%, esto basado en el resultado del crecimiento de referencia o control obtenido en UFC/mL.

En la tabla 5 se resumen las 2 discrepancias halladas entre ambas metodología, se determinó que podrían tratarse de un falso sensible.

| Fecha | UFC/mL | Microorganism o identificado | Resultado ALIFAX HB&L | PIC(%) | Resultado VITEK®2 | MEROPENEM (CIM) |
|------------|------------|------------------------------|-----------------------|--------|-------------------|-----------------|
| 07/05/2021 | 15.000.000 | <i>Raoultella planticola</i> | Sensible | 0,0 | Resistente | >= 8 |
| 07/06/2021 | 12.000.000 | <i>Enterobacter cloacae</i> | Sensible | 0,0 | Resistente | >=16 |

Tabla 5. Inconsistencias entre nefelometría láser y lectura por MIC

En todas los aislamientos resistentes obtenidos en el HUSI se realizan pruebas confirmatorias fenotípicas, por lo que en la tabla 6 se observan todos los 23 aislamientos resistentes obtenidos en el estudio.

| Microorganismo ESPECTOMETRIA | UFC/mL | PIC(%) | Interpretación PIC | MEROPENEM (MIC) | INTERPRETACIÓN VITEK®2 | Test de Hodge | Acido boronico | EDTA |
|---------------------------------|------------|--------|--------------------|-----------------|---------------------------|------------------|-------------------|------|
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 5.000.000 | 97,9 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Raoultella planticola</i> | 15.000.000 | 0,0 | Sensible | >= 8 | Resistente | POS | NEG | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20.000.000 | 98,3 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20.000.000 | 62,1 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20.000.000 | 57,6 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20.000.000 | 53,1 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Morganella morganii</i> | 20.000.000 | 62,8 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | NEG | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 15.000.000 | 99,1 | Resistente | >=2 | Resistente | POS | NEG | POS |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7.000.000 | 100,0 | Resistente | >=8 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 20.000.000 | 94,9 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Morganella morganii</i> | 12.000.000 | 95,4 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Serratia marcescens</i> | 7.000.000 | 100,0 | Resistente | >=8 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 15.000.000 | 96,9 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | NEG | POS |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 12.000.000 | 100,0 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Escherichia coli</i> | 12.000.000 | 98,3 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | 10.000.000 | 100,0 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | NEG | NEG |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> | 7.000.000 | 97,9 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Serratia marcescens</i> | 12.000.000 | 50,0 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Serratia marcescens</i> | 10.000.000 | 97,6 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | NEG | POS |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 12.000.000 | 0,0 | Sensible | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 10.000.000 | 98,1 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 5.000.000 | 95,8 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | NEG | POS |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 7.000.000 | 100,0 | Resistente | >=16 | Resistente | POS | POS | NEG |

Tabla 6: Resultados de aislamientos resistentes.

En las primeras cuatro columnas se encuentran los resultados obtenidos por el método no convencional de la nefelometría láser, con su respectiva identificación, como mencionábamos antes de la segunda columna todas las UFC/mL obtenidas estuvieron por encima del límite de lectura del equipo (750.000 UFC/mL), todos los PIC obtenidos son superiores al 50% a excepción de los dos casos encerrados en el recuadro rojo, en las siguientes 5 columnas después de la interpretación por PIC, corresponde al método convencional de lectura por MIC donde para el caso de *Raoultella planticola*, dio una MIC superior a 8 µg/mL que según CLSI se interpreta como resistente, adicionalmente confirmándose con test de Hodge positivo para presencia de carbapenemasas, lo mismo para el segundo caso de *Enterobacter cloacae* con una MIC superior a 16 µg/mL interpretado como resistente y con test de Hodge positivo, estos falsos sensibles se denominan errores muy mayores (VME: Very major error).

Retomando los dos aislamientos falsos sensibles al meropenem obtenidos en la nefelometría, se analizaron las curvas de crecimiento obtenidas después de la tercera fase de incubación y lectura. En la figura 3 se muestran las gráficas obtenidas para *Enterobacter cloacae*, en la figura 3A corresponde a la curva control o de referencia que

será comparada con la curva de exposición del microorganismo con antibiótico de la figura 3B.

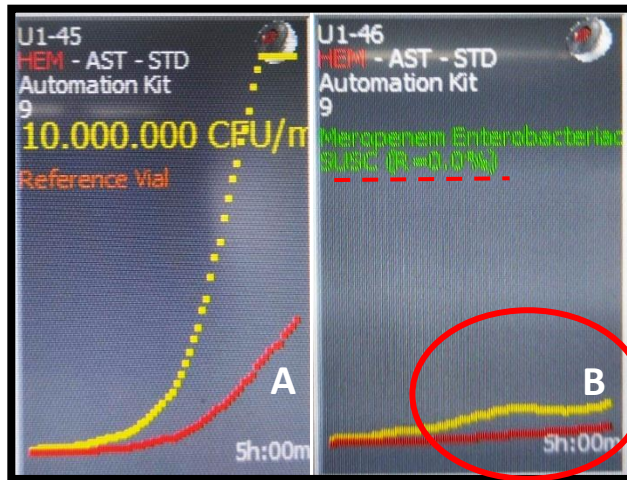


Fig. 3: Curvas de crecimiento de *Enterobacter cloacae* de equipo HB&L (A: referencia; B: Antibiótico)

Se obtuvo en la figura 3A un crecimiento significativo en *Enterobacter cloacae* en el vial de control o referencia (10.000.000 UFC/mL) pero con una falsa sensibilidad, obteniéndose una deformación en la curva.

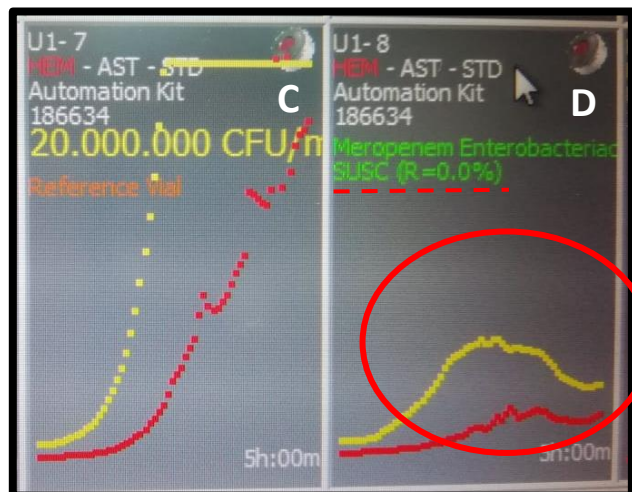


Fig. 4: Curvas de crecimiento de *Raoultella planticola* de equipo ALIFAX Uro4 HB&L (C: referencia; D: Antibiótico)

En la figura 4 se muestran las gráficas obtenidas para *Raoultella planticola*, en la figura 4C al igual que el anterior corresponde a la curva control o de referencia que será

comparada con la curva de exposición del microorganismo con antibiótico de la figura 4D.

Se obtuvo en la figura 4C un crecimiento significativo en el caso de *Raoultella planticola* (20.000.000 UFC/mL) con una deformación más marcada en la curva, que al final de incubación marco sensible.

Con respecto a las características operativas de la nefelometría láser, basado en lo obtenido con las pruebas confirmatorias fenotípicas resumidas en la tabla 6 encontramos a los verdaderos positivos (21), falsos positivos (0), falsos negativos (2) y los verdaderos negativos (77) con los cuales se calcularon la sensibilidad, especificidad los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos resumidos en la tabla 8.

Para la comparación entre ambas metodologías se resumen en la tabla 7 la nefelometría láser con el método de lectura por MIC a través de una tabla de contingencia.

| | | Lectura por MIC | | |
|--------------------|------------|-----------------|----------|-------|
| | | VITEK®2 | | |
| Nefelometría láser | | RESISTENTE | SENSIBLE | Total |
| ALIFAX HB&L | RESISTENTE | 21 | 0 | 21 |
| | SENSIBLE | 2 | 77 | 79 |
| Total | | 23 | 77 | 100 |

Tabla 7. Tabla de contingencia 2x2

Con los datos obtenidos en la tabla de contingencia, se calculan las características operativas de la nefelometría láser obtenidas en la tabla 8.

| | |
|----------------------|--------|
| Sensibilidad | 91,30% |
| Especificidad | 100% |
| VPP | 100% |
| VPN | 97,46% |

Tabla 8. Características de las variables ALIFAX HB&L

Índice de concordancia (Kappa)

Se realiza el cálculo del índice de concordancia para la nefelometría láser y el método comparador de lectura por MIC dando como resultado una concordancia casi perfecta. A continuación, se muestra la formulación para obtener un resultado de 0.967 en índice Kappa.

$$PA = \frac{21 + 77}{100} = 0,97 \quad PE = \frac{\left(\frac{21}{100}\right) * \left(\frac{23}{100}\right)}{\left(\frac{79}{200}\right) * \left(\frac{77}{100}\right)} = 0,079 \quad K = \frac{0,98 - 0,079}{1 - 0,079}$$

$$K = 0,978 \text{ (Casi perfecta)}$$

El tiempo promedio de detección de resistencia a meropenem que nos brinda la nefelometría láser de 6,10 horas en el equipo con un promedio de 5,8 minutos del proceso manual a comparación del método de lectura por MIC, con tiempo promedios de procesamiento 48 a 96 horas.

Para el control de calidad en a tabla 9 se emplearon 4 cepas control con susceptibilidad conocida, estos controles fueron realizados al inicio del estudio 1 de marzo de 2021 y a mediados del estudio el 3 de mayo de 2021, fueron analizadas en el equipo HB&L Uro 4 y su resultado fue concordante con el perfil de susceptibilidad en todos los casos.

| Fecha | No. Identificacion | UFC/mL | Resultado ALIFAX | PIC(%) |
|-----------|--------------------|-------------|------------------|--------|
| 1/03/2021 | ATCC Ref. 25922 | 40.000.000 | Sensible | 0,0 |
| 1/03/2021 | BAA Ref 1705 | 7.000.000 | Resistente | 100,0 |
| 3/05/2021 | ATCC Ref. 25922 | 100.000.000 | Sensible | 0,0 |
| 3/05/2021 | BAA Ref 1705 | 100.000.000 | Resistente | 100,0 |

Tabla 9: Controles de calidad resistentes y sensibles a meropenem

7.2. Discusión

La identificación oportuna de un perfil de susceptibilidad en microorganismos como los Enterobacteriales conlleva a una reducción de la mortalidad en pacientes con bacteriemia, (33) por lo que los primeros estudios realizados en hemocultivos con nefelometría láser con HB&L™ por Kroumova et al. en 2010 (76) se determinó un perfil de susceptibilidad con diferentes antibióticos con diversos grupos bacterianos asociados a bacteriemia, donde mencionar que esta metodología puede ayudar a orientar al médico a un tratamiento rápido en el paciente crítico, se lograron comparar 66 casos de Gram Negativos con el método estándar de ese estudio la epsilometría E-Test con piperacilina/tazobactam, amikacina y levofloxacina que obtuvo una excelente concordancia del 93,3% con E-test y redujo considerablemente el tiempo de análisis a 6 horas. En nuestro estudio se tuvo la oportunidad de emplear mayor número de muestras de Enterobacteriales (n=100), obteniendo un índice de concordancia igual de superior del 90% pero con el método de lectura por MIC, el cual en su metodología de estudio no compararon la nefelometría láser con la lectura por MIC, su método comparador fue epsilometría. Para Gram negativos obtuvieron 2 VME con piperacilina/tazobactam y levofloxacina, comparado a nuestro estudio la frecuencia de errores fue la misma, pero con diferentes antibióticos.

Retomando lo resultados de Kroumova et al. los autores explican las posibles causas de los VME, en un caso de un microorganismo falso sensible para amikacina, se observó un ascenso en la curva de crecimiento durante la incubación con el antibiótico, pero posteriormente la curva descendió dando un PIC menor al 35%, esto fue similar en nuestro estudio durante la incubación de ambas cepas con meropenem, se observó un ascenso de la curva durante las primeras horas de incubación que posteriormente descendió hasta dar sensible por el equipo, esto puede deberse a los algoritmos propios del instrumento que interpretó esa deformación de la curva como sensible (76) estos errores no han sido profundizados en la literatura, por lo que pueden haber otras causas en interpretación de la nefelometría, en el caso de *Enterobacter cloacae* la curva de exposición con el antibiótico no se deformó tanto como la curva de *Raoultella planticola*, además hay que tener en cuenta que el PIC se calcula comparando el crecimiento

obtenido la curva control o de referencia con la curva de exposición al antibiótico, la cual determina el porcentaje de capacidad en la inhibición al meropenem.

En otro estudio de Van den Poel et al. en 2020 un aislamiento de *Enterobacter cloacae* dio falso sensible a Piperacilina/Tazobactam, pero no se presentaron discrepancias con meropenem y solo recomiendan mejorar los paneles de antibióticos para evitar falsos sensibles y resistentes teniendo en cuenta que los resultados son de tamiz, por lo que es necesario no dejar de recurrir a pruebas confirmatorias de resistencia. (70) En el estudio de Barnini et al. en 2016 emplearon la nefelometría láser y lo compararon con el método de lectura por la MIC. Contrario a nuestro estudio, se observaron discrepancias de aislamientos con falsa resistencia al meropenem (Errores mayores o ME: Major Error) resultados que no pueden ser comparables con nuestro estudio, porque no se tuvo esta clase de errores (VE) respecto a lo anterior es importante mencionar que se presenta con frecuencia errores con *Enterobacter cloacae* con falsos resistentes y por falsos sensibles. Esta especie se caracteriza por poseer AmpC cromosómicas y tener una alta capacidad de adquirir BLEE, pero a pesar de esto el tratamiento de primera línea son carbapenémicos. (77)

Adicionalmente, para nuestro estudio se empleó en conjunto con la identificación previa por MALDI-TOF que nos brinda mayor inclusión de las especies requeridas para el estudio, ya que el meropenem empleando para la nefelometría láser es muy específico para los Enterobacterales y no presentando buenos resultados con otras especies no fermentadoras, lo que contribuye aún más en la disminución de errores en la interpretación de un resultado obtenido por nefelometría.

El segundo caso de falsa sensibilidad fue *Raoultella planticola* la cual según la literatura es una enterobacteria de baja virulencia y normalmente muestra excelente resultados con carbapenémicos, (78,79) pero esta especie puede adquirir genes de resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae*, y se confirmó presencia de carbapenemasas con el test de Hodge, por otra parte, no se han reportado en otros estudios donde haya sido aislada en hemocultivos y haya obtenido un perfil de susceptibilidad con nefelometría láser por su baja incidencia, al igual que otra especie poco común aislada *Hafnia paralvei*, que a diferencia de la anterior dio una verdadera sensible a meropenem en ambos métodos.

En los demás aislamientos resistentes obtenidos hubo una mayor frecuencia de *Klebsiella pneumoniae* con un 7% respecto a las 100 muestras procesadas, donde sigue siendo un porcentaje importante que requiere una oportuna identificación de resistencia, estos resultados, aunque preocupantes concuerda con los informes del resistencia bacteriana por carbapenémicos del INS en Colombia. (26)

De todos los aislamientos se obtuvieron un grupo heterogéneo de Enterobacterales donde predominaron *Escherichia coli* (28%) y *Klebsiella pneumoniae* (23%) acorde al estudio de Sánchez-Carrillo et al. del 2019 (80) donde fueron las especies más aisladas en hemocultivos, además de obtener una concordancia con la nefelometría láser comparada con el método de lectura por MIC del 97,3%, adicionalmente fue acorde a lo reportado en los informes del INS como las dos especies de Enterobacterales más frecuentes en los pacientes hospitalizados, (26) y por último según estadísticas presentada en el HUSI donde las bacteriemias más frecuentes son causadas por estas dos especies, con mayor resistencia por parte de *Klebsiella pneumoniae*. (27)

Respecto a los resultados de sensibilidad se obtuvo un valor superior al 90% y de especificidad del 100%, similares a los obtenidos por Athamna & Freimann en 2019, donde emplearon nefelometría láser en 103 hemocultivos con Enterobacterales productoras de BLEE/AmpC y obtuvieron un 91,3% de concordancia con el método de lectura por MIC, con una sensibilidad del 85% y especificidad del 91,1% con VPP del 91,1% y VPN del 90,9%, sin embargo, en estudio no evaluaron resistencia a carbapenémicos, pero los datos obtenidos concluyen de forma igual que en nuestros resultados, hay mayor posibilidad de encontrar cepas verdaderamente sensibles a antibióticos por la alta especificidad obtenida.

Para cada muestra de hemocultivos identificadas inicialmente con MALDI-TOF para incluir solo los Enterobacterales, se obtuvo un tiempo de trabajo con la nefelometría láser con promedio de 6,15 horas acorde con el tiempo establecido por Alifax (81) esto nos brinda información preliminar para el médico tratante el mismo día, mientras se realiza el método convencional con pruebas confirmatorias de rutina de lectura por MIC de VITEK®2 y determinación de presencia y tipo de carbapenemasas.

Asimismo, cabe resaltar que la cantidad de errores fueron disminuidos gracias a la identificación previa por MALDI TOF ya que el antibiótico suministrado en el kit AST-meropenem *Enterobacteriaceae*/CL (Ref. 825-MEM) está limitado para especies de Gram negativos no fermentadores que pueden alterar el resultado del estudio. Además, es necesario resaltar que el tiempo de optimización entre ambas metodologías fue de 26,52 horas dada por el laboratorio clínico, esta información puede contribuir enormemente a la disminución de los índices de mortalidad por bacteriemia al brindar información oportuna al médico para tomar decisiones respecto al tratamiento empírico del paciente el mismo día en que el hemocultivo salió positivo. La nefelometría láser puede ser usada como método rápido PROA, ya que al ser empleada en el laboratorio clínico puede haber una reducción tanto de la resistencia bacteriana como la morbimortalidad, no solo beneficiando al paciente sino también a las disminuciones de los costos por hospitalización, fallos terapéuticos y secuelas a largo plazo.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

- La nefelometría láser para la detección de resistencia al meropenem presentó una sensibilidad por encima del 90%, especificidad del 100% y una concordancia casi perfecta con respecto al método de lectura de concentración mínima inhibitoria, con 26, 52 horas de optimización en los resultados.
- El estudio mostro dos resultados de falsos sensibles, uno de ellos *Enterobacter cloacae*, el segundo *Raoultella planticola*, microorganismo poco frecuente.

8.2 Recomendaciones

- Emplear mayor número de hemocultivos con un panel más amplio de antibióticos, ya que se puede optimizar para otros grupos bacterianos como los bacilos Gram negativos no fermentadores y Gram positivos.
- Generar nuevos estudios con especies menos incidentes de Enterobacterales, pero de gran importancia clínica por su alta posibilidad de adquirir resistencias.
- A partir de la implementación del método no convencional de nefelometría láser, realizar estudios de costo efectividad, en donde se estudien variables como tiempo para terapia dirigida, disminución de la mortalidad asociada al recurso, tiempo de estancia y costo hospitalarios asociado al recurso.

9. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

1. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Bacilos gramnegativos entéricos (enterobacterias). In: Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiología Médica, 28e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2020. Available from: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1175107408>
2. Bush LM, Vazquez-Pertejo M. Infecciones por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 18]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-y>
3. Pérez-Palacios P, López-Cerero L, Lupión C, Pascual A. Assessment of a semi-automated enrichment system (Uroquattro HB&L) for detection of faecal carriers of ESBL-/AmpC-producing Enterobacterales. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin* (English ed) [Internet]. 2020;38(8):367–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2019.11.006>
4. Ignacio J, Díaz S, Carlos J, Vicente DC, Antón JG. Protocolo de diagnóstico y tratamiento del shock séptico y de la sepsis asociada a disfunción orgánica. *Soc Española Cuid Intensivos Pediátricos* [Internet]. 2020;1–29. Available from: <https://secip.com/wp-content/uploads/2020/07/Sepsis.pdf>
5. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Hsueh PR, et al. A Predictive Model of Mortality in Patients With Bloodstream Infections due to Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(10):1362–71.
6. Villegas MV, Pallares CJ, Escandón-Vargas K, Hernández-Gómez C, Correa A, Álvarez C, et al. Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae in seven Latin American countries. *PLoS One*. 2016;11(4):1–13.

7. Organización Mundial de la Salud. Sepsis - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2021 Apr 16]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/sepsis>
8. Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos técnicos para la implementación de programa de optimización de antimicrobianos en el escenario hospitalario y ambulatorio [Internet]. Bogotá; 2019. p. 59. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamientos-optimizacion-uso-antimicrobianos.pdf>
9. ALIFAX Italy. RAPID AST PHENOTYPIC METHOD Clinically Useful Results [Internet]. [cited 2021 Feb 10]. Available from: www.alifax.com
10. Singh A, Museedi AS, Grossman SA. Bacteremia. 2020. p. 1–4.
11. Juan Carlos Rodríguez Díaz, María del Remedio Guna Serrano, Nieves Larrosa Escartín, Mercedes Marín Arriaza. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares [Internet]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. 2017. 1–66 p. Available from: www.seimc.org
12. Rangel-Vera JA, Laguado-Niego MA, Amaris-Vergara AA, Vargas-Ordoñez JE, García-león SJ, Centeno-Hurtado KT. Actualización en sepsis y choque séptico en adultos. *MedUNAB*. 2019;22(2):213–27.
13. De La Rosa G, León AL, Jaimes F. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. *Rev Chil Infectol*. 2016;33(2):141–9.
14. López-Medina DC, Henao-Perez M, Arenas-Andrade J, Hinestroza-Marín ED, Jaimes-Barragán FA, Quirós-Gómez OI. Epidemiology of septic shock in prehospital medical services in five Colombian cities. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2020;32(1):28–36.
15. Pérez RO, Lona JC, Quiles M, Verdugo MÁ, Ascencio EP, Benítez EA. Sepsis neonatal temprana, incidencia y factores de riesgo asociados en un hospital público

- del occidente de México. *Rev Chil Infectol.* 2015;32(4):387–92.
16. García MA, Iglesias JCF, Rotaeché AA, Sánchez MS. Bacteriemia, sepsis y shock séptico. *Med.* 2018;12(52):3066–75.
 17. González Escudero EA, Sánchez Díaz Jesús Salvador, Solórzano Guerra A, Peniche Moguel KG, Villegas Domínguez JE, Calyeca Sánchez MV. Factores asociados con la mortalidad en el adulto mayor con choque séptico. *Med Crítica.* 2020;34(2):125–32.
 18. Yolima Pertuz-Meza, Celenny Perez-Quintero YP-V. Epidemiological aspects of sepsis in intensive care units Santa Marta, Colombia. *Duazary* [Internet]. 2016;13(2):126–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.21676/2389783X.1718>
 19. Azevedo LCP, Cavalcanti AB, Lisboa T, Pizzol FD, Machado FR. Sepsis is an important healthcare burden in Latin America: A call to action! *Rev Bras Ter Intensiva.* 2018;30(4):402–4.
 20. Ruiz GO, Castell CD. Epidemiology of severe infections in Latin American intensive care units. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2016;28(3):261–3.
 21. Restrepo M, Dueñas C, González M, Ortiz G, Álvarez C, Granados M, et al. Primer Consenso Colombiano en Sepsis. *Rev Colomb Cirugía* [Internet]. 2006;21(2011–7582):155–79. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=355534473005>
 22. U.S. Department of Health and Human Services. Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019. p. 1–113. Available from: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html
 23. Gelen, Cruz Blanco M, Hernández Fernández Y. Bacteriemias en la unidad de cuidados intensivos. *Rev Cuba Med Mil* [Internet]. 2018;47(4):0–0. Available from: http://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/242%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572018000400011
 24. Castro Leal AL. Panorama de la Resistencia Bacteriana en Colombia. *La Epidemiol y la salud urbana VI jornadas epidemiológicas Distritales.* 2009;34.

25. Li S, Liu J, Chen F, Cai K, Tan J, Xie W, et al. A risk score based on pediatric sequential organ failure assessment predicts 90-day mortality in children with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1–12.
26. Instituto Nacional de Salud (INS). Informe De Resultados De La Vigilancia Por Laboratorio De Resistencia Antimicrobiana En Infecciones Asociadas a La Atención En Salud (laas) 2018 Dirección [Internet]. Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. 2019. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf)
27. Hospital Universitario San Ignacio. Software de vigilancia epidemiologica Whonet. 2021.
28. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009;136(5):1237–48.
29. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V. Principales Grupos Antibióticos. *Inst Hig* [Internet]. 2015;1. Available from: [http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales grupos de antibi%F3ticos.pdf](http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3ticos.pdf)
30. Centers for Disease Control and Prevention. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs | Antibiotic Use | CDC [Internet]. 2019. Available from: https://www.cdc.gov/antibiotic-use/core-elements/hospital.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fanti-biotic-use%2Fhealthcare%2Fimplementation%2Fcore-elements.html
31. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, Asensio Á, Calbo E, Cercenado E, et al. Programas de optimización de uso de antimicrobianos (PROA) en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH y SEMPSPH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(1).
32. Athamna A, Freimann S. A new rapid method for detecting extended-spectrum beta-lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* directly from positive blood

- cultures using the Uro4 HB&L™ system. *Brazilian J Microbiol.* 2019;50(4):927–33.
33. Buehler SS, Madison B, Snyder SR, Derzon JH, Cornish NE, Saubolle MA, et al. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;29(1):59–103.
 34. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, et al. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect [Internet].* 2014;69(3):216–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.005>
 35. Maggio PM. Bacteriemia - Infecciones - Manual MSD versión para público general [Internet]. [cited 2021 Apr 16]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/infecciones/bacteriemia-septicemia-y-choque-séptico/bacteriemia>
 36. Ruiz-Giardin JM, Noguero Asensio A. Bacteriemias. *An Med Interna.* 2005;22(3):105–7.
 37. Miguel Cisneros-Herreros J, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(2):111–30.
 38. Iqbal-Mirza SZ, Estévez-González R, de Ávila VSR, González E de R, Heredero-Gálvez E, Julián-Jiménez A. Predictive factors of bacteraemia in the patients seen in emergency departments due to infections. *Rev Esp Quimioter.* 2020;33(1):32–43.
 39. Morales I R. Terapia de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil Infectol.* 2003;20(SUPPL. 1):24–7.
 40. Sanchez B. Curso sepsis grave: capítulo 6. *Rev Electrónica Med Intensiva [Internet].* 2004;4(1578–7710):1–13. Available from: <https://remi.uninet.edu/2004/08/REMIC06.htm>

41. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genomics*. 2018;4(7).
42. Moreno-Monge KM. Carbapenémicos: Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Rev Médica Costa Rica y Centroamérica LXX* [Internet]. 2013;608(608):599–605. Available from: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/608/art8.pdf>
43. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943–60.
44. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):413–31.
45. Morejón García M. Carbapenemasas, una amenaza actual. *Rev Cuba Med Intensiva y Emergencias*. 2012;11(4):2613–8.
46. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of kpn carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(9):785–96.
47. Villegas MV, Jiménez A, Esparza G, Appel TM. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. *Infectio*. 2019;23(4):388–98.
48. Aslam B, Rasool M, Muzammil S, Baker Siddique A, Nawaz Z, Shafique M, et al. Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace. *Pathog Bact*. 2020;1–10.
49. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: The impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 1):S28–36.
50. Cercenado E. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev la SEQ - Soc Española Quimioter* [Internet]. 2015;28:8–11. Available from: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_sup1_cercenado.pdf

51. Suarez CJ, Kattán JN, Guzmán AM, Villegas M V. Mecanismos de resistencia *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*. 2006;10(2):85–93.
52. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380–407.
53. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22(1):35–45.
54. Sanders AM. Standard Operating Procedure / Vitek 2 Compact – Identification and Susceptibility Testing [Internet]. Gundersen Health System. 2019. Available from: <https://www.gundersenhealth.org/app/files/public/4608fc82-436a-481a-b59f-da2bc1fdb31c/Lab-Policies-Vitek-2-Compact---Identification-and-Susceptibility-Testing-Lab-1512.pdf>
55. Biomérieux Colombia. VITEK® 2 Compact | bioMérieux Colombia [Internet]. [cited 2021 Apr 19]. Available from: <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/vitekr-2-compact>
56. BioMérieux. AES: Sistema experto avanzado VITEK® 2™ [Internet]. 2018. Available from: <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/aes-sistema-experto-avanzado-vitekr-2tm>
57. Bastías C, Sidgman F, Rodríguez C. Laboratorio De Inmunología En La Práctica Clínica. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2015;26(6):764–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.005>
58. Muhye A. Nefelometría: en qué consiste y aplicaciones [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 18]. Available from: <https://www.lifeder.com/nefelometria/>
59. Hernández-García D, Acebo-González A. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Rev CENIC* [Internet]. 2013;44(1):1–18. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>
60. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC. Analysis of the adaptation capacity of staphylococcus aureus to commonly used antiseptics by microplate laser

- nephelometry. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012;25(6):288–97.
61. ALIFAX SpA Italy. RAPID AST PHENOTYPIC METHOD [Internet]. Vol. 41, Ymen. 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jen.2014.07.010>
 62. Zboromyrska Y, Bosch J, Alejo I, Fasanella A, Morales FJ, Almela M, et al. The evaluation of Uro4 HB&L™ for rapid susceptibility testing of Gram-negative bacteria isolated in a blood culture. *Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;(Cli):5. Available from: <https://www.morressier.com/article/evaluation-uro4-hbl-rapid-susceptibility-testing-gramnegative-bacteria-isolated-blood-culture/56d5ba29d462b80296c962f9>
 63. ALIFAX. HB&L® [Internet]. 2017. Available from: <https://www.alifax.com/products/bacteriology-line/show/hb-and-l>
 64. ALIFAX Italy. Presents Advanced Sterility tests [Internet]. BIOTRON. Available from: <https://slidetodoc.com/presents-advanced-sterility-tests-by-alifax-italy-the/>
 65. March Rosselló GA, Bratos Pérez MÁ. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2016 Jan;34(1):61–8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X14003966>
 66. Barocci S, Giacomini M, Renzi A, Palma M, Latini L, Quagliarini L, et al. HB&L System: rapid determination of antibiotic sensitivity of bacteria isolated from blood cultures. *Microbiol Medica*. 2010;25(1):60–3.
 67. Marinović J, Novak A, Rubić Ž, Goić-Barišić I, Radić M, Barišić M, et al. Comparison of the novel uroquattro hb&I™ system and classical phenotypic method for rapid screening of multidrug-resistant organism colonization at the university hospital centre split, croatia. *Infektoloski Glas*. 2020;40(1):15–9.
 68. Fontana C, Favaro M, Bossa MC, Minelli S, Altieri A, Pelliccioni M, et al. Improved diagnosis of central venous catheter-related bloodstream infections using the HB&L UROQUATTRO™ system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(11):3139–44.
 69. Josa D, Bustos-Moya G, Yusef S, Crevoisier S, Silva E, Lopez N, et al. Rapid

- Phenotypic Detection of Gram-Negative Bacilli-Resistant to Oximinocephalosporins and Carbapenems in Positive Blood Cultures Using a Novel Protocol. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2019;6(Supplement_2):S718–S718. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-18429/v1>
70. Van den Poel B, Meersseman P, Debaveye Y, Klak A, Verhaegen J, Desmet S. Performance and potential clinical impact of Alfred60AST (Alifax®) for direct antimicrobial susceptibility testing on positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(1):53–63.
 71. Barnini S, Brucculeri V, Morici P, Ghelardi E, Florio W, Lupetti A. A new rapid method for direct antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood cultures. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0805-5>
 72. ALIFAX. Antimicrobial Susceptibility Test [Internet]. Italy; 2019. Available from: <https://www.alifax.com/assets/Uploads/Mic-Bro007-AST-05-11-19-EN.pdf>
 73. ALIFAX Italy. ALFRED 60AST [Internet]. p. 2. Available from: <https://www.alifax.com/products/bacteriology-line/show/alfred-60>
 74. Miranda Prat MS. Recomendaciones para detección carbapenemasas en Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. Inst Salud Pública Chile. 2018;
 75. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977 Mar;33(1):159.
 76. Kroumova V, Gobbato E, Macaluso P, Tamburelli S, Marini F, Perone M, et al. Preliminary indications for antibiotic susceptibility tests in less than six hour in positive blood cultures. *Microbiol Medica*. 2010;25(1):24–6.
 77. Moreno-Rovira LY, Tamayo-Quintero MT, Amariles-Tamayo N, Garrido-Zea EF. Infecciones por *Enterobacter* y *Enterococcus* resistentes asociadas a la atención en salud en Hispanoamérica 2002-2017. *Med y Lab*. 2020;24(3):221–32.
 78. Gonzales Zamora J, Corzo-Pedroza M, Romero Alvarez M, Martinez O. Carbapenemase-Producing *Raoultella Planticola*: A Rare Cause of Pneumonia and

Bacteremia. Diseases. 2018;6(4):94.

79. Naganathan G, Amin NK. *Raoultella Planticola* associated necrotizing appendicitis: A novel case report. Int J Surg Case Rep [Internet]. 2018;44:38–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2018.01.021>
80. Sánchez-Carrillo C, Pescador P, Ricote R, Fuentes J, Losada C, Candela A, et al. Evaluation of the Alfred AST® system for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(9):1665–70.
81. ALIFAX. HB&L Uroquattro [Internet]. 2019. Available from: <https://www.alifax.com/assets/Uploads/Mic-Bro003-HBL-28-03-19-EN.pdf>

ANEXOS

Anexo 1: Diagrama resumen de metodología

