



FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A FOSFOMICINA EN Escherichia coli BLEE DE UROCULTIVOS

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado Tecnólogo Médico en
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Autora:

Quispe Quispe, Patricia Rosario

Asesor:

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique
(ORCID: 0000-0001-9427-9281)

Jurado:

Lagos Castillo, Moraima Angelica
Lezama Cotrina, Irene Doraliza
Lazon Mansilla, David Felix

Lima - Perú

2022

Referencia:

Quispe, P. (2022). *Evaluación de métodos fenotípicos para detección de resistencia a fosfomicina en Escherichia coli blee de urocultivos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6281>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A FOSFOMICINA EN *Escherichia coli* BLEE DE UROCULTIVOS

Línea de investigación:

Microbiología, Parasitología e Inmunología

Tesis para optar el Título de especialista en Especialidad de Licenciado Tecnólogo Médico en

Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Autor

Quispe Quispe, Patricia Rosario

Asesor

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique
(ORCID: 0000-0001-9427-9281)

Jurados

Lagos Castillo, Moraima Angelica

Lezama Cotrina, Irene Doraliza

Lazon Mansilla, David Felix

Lima – Perú

2022

Dedicatoria

Agradecer en primer lugar a Dios por permitirme el haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, mi asesor y finalmente a mis amigos más cercanos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Descripción y formulación del problema.....	8
1.1.1 Pregunta general.....	10
1.1.2 Preguntas específicas.....	10
1.2 Antecedentes.....	10
1.2.1 Antecedentes internacionales.....	10
1.2.2 Antecedentes nacionales.....	12
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo general.....	13
1.3.2 Objetivos específicos.....	13
1.4 Justificación.....	14
II MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	15
2.1.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	15
2.1.1.1 Prueba de difusión por disco (DD).....	15
2.1.1.2 Pruebas de la CMI.....	16
2.1.1.3 <i>Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test</i>	17

2.1.2	Infecciones de tracto urinario (ITU).....	17
2.1.3	Enterobacterias	18
2.1.3.1	<i>Escherichia coli</i>	18
2.1.4	Resistencia antimicrobiana.....	19
2.1.4.1	Betalactamasas.....	20
2.1.4.2	Resistencia a Fosfomicina	21
III	MÉTODO	23
3.1	Tipo de investigación.....	23
3.2	Ámbito temporal y espacial	23
3.3	Variables	23
3.4	Población y muestra.....	25
3.4.1	Población.....	25
3.4.2	Muestra.....	25
3.5	Instrumentos.....	25
3.6	Procedimientos.....	26
3.6.1	Método de dilución en agar (DA)	26
3.6.2	Método de disco difusión (DD).....	26
3.6.3	Método <i>rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test</i>	27
3.7	Análisis de datos	28
3.8	Consideraciones éticas	28

IV	RESULTADOS	29
V	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
VI	CONCLUSIONES.....	37
VII	RECOMENDACIONES	38
VIII	REFERENCIAS	39
IX	ANEXOS.....	45

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la concordancia diagnóstica de dos métodos fenotípicos para la detección de resistencia a fosfomicina en aislados de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido procedentes de urocultivos. **Método:** Se realizó un estudio observacional, descriptivo de diseño no experimental prospectivo y de corte transversal. Se incluyeron 103 aislamientos de *Escherichia coli* identificadas por métodos convencionales como productoras de BLEE. Los métodos fenotípicos evaluados fueron: Prueba de disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*, el método de referencia con el cual se compararon los resultados obtenidos de los dos métodos fue la técnica de dilución en agar. **Resultados:** La prueba de disco difusión obtuvo una sensibilidad de 98.2% y especificidad del 95.5%, *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* obtuvo una sensibilidad de 98.5%, especificidad del 97.7%, asimismo la concordancia de kappa entre ambos métodos con respecto al método de referencia fue de 0.94 para disco difusión y 0.96 para *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*, ambos resultados son considerados como muy buena concordancia. **Conclusiones:** Los dos métodos presentaron una buena concordancia para la detección de susceptibilidad antimicrobiana a fosfomicina. Se recomienda la implementación del *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* en los laboratorios de rutina por ser este más rápido en comparación con los otros dos métodos y tener buena sensibilidad.

Palabras clave: *Escherichia coli*, betalactamasas, fosfomicina, método fenotípico, infección urinaria.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the diagnostic concordance of two phenotypic methods for the detection of resistance to fosfomicin in isolates of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases from urine cultures. **Method:** An observational, descriptive study with a non-experimental prospective and cross-sectional design was carried out. 103 *Escherichia coli* isolates identified by conventional methods as ESBL producers were included. The phenotypic methods evaluated were: disk diffusion test and rapid fosfomicin/*Escherichia coli* NP test, the reference method with which the results obtained from the two methods were compared was the agar dilution technique. **Results:** The disc diffusion test obtained a sensitivity of 98.2% and a specificity of 95.5%, the rapid fosfomicin/*Escherichia coli* NP test obtained a sensitivity of 98.5%, a specificity of 97.7%, as well as the agreement of kappa between both methods with respect to the method reference was 0.94 for disc diffusion and 0.96 for rapid fosfomicin/*Escherichia coli* NP test, both results are considered as very good agreement. **Conclusions:** The two methods presented a good concordance for the detection of antimicrobial susceptibility to fosfomicin. The implementation of the rapid fosfomicin/*Escherichia coli* NP test in routine laboratories is recommended because it is faster compared to the other two methods and has good sensitivity.

Keywords: *Escherichia coli*, beta-lactamases, fosfomicin, phenotypic method, urinary infection.

I. INTRODUCCIÓN

La infección urinaria es una de las patologías infecciosas de mayor prevalencia en el mundo ocasionadas principalmente por agentes bacterianos como *Escherichia coli*, el Perú es un país que no es ajeno a esta situación. Debido al incremento de la resistencia antimicrobiana esta problemática cada vez empeora principalmente por la presencia de enzimas como las betalactamasas de espectro extendido en aislados de *Escherichia coli* lo que la hace resistente a muchos antibióticos.

Frente a esta situación se está considerando a la fosfomicina como opción terapéutica, he ahí la importancia de conocer los perfiles de susceptibilidad de *Escherichia coli* BLEE frente a este antibiótico. Para ello cada vez más se requiere de pruebas diagnósticas que nos permitan obtener resultados en un corto tiempo para de esa manera dirigir mejor el tratamiento y evitar la resistencia antimicrobiana.

En la presente investigación, se realizará una evaluación de dos métodos fenotípicos para detección de resistencia a fosfomicina en *Escherichia coli* BLEE con el objetivo de determinar la concordancia que hay entre estos métodos, asimismo evaluar los parámetros diagnósticos de cada prueba.

1.1 Descripción y formulación del problema

Las infecciones de tracto urinario forman parte de las enfermedades infecciosas más comunes en la comunidad, así como en los hospitales (Lifonzo et al.,2018). De manera estadística se cuenta con datos de incidencia de 2 a 3 casos de infecciones urinarias por cada 100 habitantes al año a nivel mundial (Calle et al., 2017). Esto representa un serio problema de salud pública que conlleva un impacto sobre el sector económico de cada país (Pigrau, 2013).

Escherichia coli es considerado como el uropatógeno más frecuentemente encontrado en las infecciones de tracto urinario (Liu et al., 2011). Para lo cual se prescribe un tratamiento empírico hasta contar con los resultados de identificación y sensibilidad antimicrobiana, se ha evidenciado últimamente que esta bacteria presenta altos niveles de resistencia a múltiples fármacos debido a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) para lo cual se requiere de nuevos enfoques de tratamiento (Ben et al., 2009).

Una investigación realizada en Latinoamérica expone que un 32% de las cepas *E. coli* recolectadas fueron potencialmente productoras de BLEE. Asimismo, un estudio de vigilancia de resistencia antimicrobiana realizada en 11 países de América Latina muestra que en Perú un 54% de las cepas de *E. coli* aisladas resultaron ser BLEE (Rocha et al., 2015). Debido a esta situación se necesita de antibióticos de baja toxicidad con mecanismos de acción única y de gran utilidad contra este tipo de bacterias, esto nos lleva a poner interés en antibióticos utilizados en el pasado como la fosfomicina (Zamudio et al., 2017).

Si bien *E. coli* es generalmente sensible a la fosfomicina, últimamente se está presentando aumento de resistencia a este antibiótico debido al incremento de su uso en la parte clínica como primera línea de tratamiento en las infecciones de tracto urinario (Nordman et al., 2019). Encontrándose un promedio de un 24.4 % de resistencia a fosfomicina en *E. coli* provenientes de muestras de orina (Lifonzo et al., 2018).

Dado esta situación se genera la necesidad de desarrollar métodos que permitan evaluar la eficacia del tratamiento de manera rápida, uno de ellos es el método *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test* el cual permite identificar en corto tiempo la resistencia a fosfomicina en aislados de *E.coli* debido a que requiere menos de dos horas en realizarse y ver los resultados (Nordman et al., 2019), a comparación de la prueba de referencia para determinar la sensibilidad a fosfomicina,

método de dilución en agar, el cual es laborioso de realizar, pero sobre todo requiere al menos de dieciocho horas de incubación para obtener los resultados de sensibilidad. Por otro lado, tenemos la prueba de disco difusión que sí bien requiere de largos tiempos de incubación, un promedio de dieciséis horas, es más accesible y de uso común en los laboratorios en comparación con el método *gold estándar* (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2018). Ambos métodos son opciones alternativas a la técnica de dilución en agar los cuales nos permiten tener resultados de manera rápida.

1.1.1 Problema general

¿Cuál es la concordancia diagnóstica de los métodos fenotípicos de disco difusión y *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test* para detección de resistencia a fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de BLEE procedentes de urocultivos?

1.1.2 Problemas específicos

¿Cuál es la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test*?

¿Cuál es la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de disco difusión?

¿Cuál es la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* BLEE a fosfomicina entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test*?

1.2 Antecedentes

1.2.1 Antecedentes internacionales

Nordmann et al. (2019), en su estudio realizado en Suiza con el objetivo de desarrollar un método rápido y efectivo que pueda ser usado a nivel mundial independientemente del nivel del laboratorio, realizaron el *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test*. A partir de 100 cepas de *E.*

coli siendo 22 de estas resistentes a fosfomicina, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 100% y del 98.7% respectivamente para este método.

Avial et al. (2013), en su investigación realizada en España con el objetivo de dar a conocer los porcentajes de *E. coli* BLEE y comparar su perfil de sensibilidad a diferentes antibióticos incluido fosfomicina entre los años 2005, 2009 y 2011. Revisaron los antibiogramas de *E. coli*, procedentes de urocultivos, seleccionaron las que resultaron ser BLEE. La prevalencia de *E. coli* BLEE y de resistencia a fosfomicina durante el año 2005 fue del 3.9% y 0% respectivamente; para el año 2009 fue de 7.3% y 9.3% y para el 2011 fue de 8.7% y 14.4%. Concluyendo que existe una alta prevalencia de *E. coli* BLEE asimismo un aumento significativo de resistencia a fosfomicina siendo uno de las posibles causas el uso indiscriminado de este antibiótico en la comunidad.

Liu et al. (2011), en su investigación realizada en China con el objetivo de evaluar la actividad de la fosfomicina y otros seis agentes antimicrobianos contra cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE procedentes de muestras de orina. A partir de 134 cepas de *Escherichia coli* BLEE, encontró que fosfomicina presenta una sensibilidad del 95.5% en *E. coli* BLEE. Concluyendo que fosfomicina actúa muy bien contra los aislados de *E. coli* BLEE.

Zamudio et al. (2017), en su estudio realizado en México con el objetivo de conocer la sensibilidad a fosfomicina tanto en enterobacterias y otros microorganismos, ambos multidrogosresistentes. Realizaron un estudio a partir de 100 cepas entre ambos grupos, principalmente enterobacterias, obtenidas de diferentes muestras clínicas (80% urocultivo). El agente patógeno mayormente encontrado en urocultivos fue *E. coli* (60%) todas BLEE, el cual presento 100% de sensibilidad a fosfomicina. Concluyendo que fosfomicina es una buena opción terapéutica frente a enterobacterias y otros microorganismos ambos multidrogosresistentes.

1.2.2 Antecedentes nacionales

Lifonzo et al. (2018), en su investigación realizada en Perú en el Hospital Nacional Hipólito Unanue con los objetivos de determinar la sensibilidad a fosfomicina en aislados de *E. coli* BLEE provenientes de urocultivos, determinar los parámetros diagnósticos de las pruebas de disco difusión y dilución en agar y evaluar la concordancia entre ambos métodos, realizaron un estudio transversal a partir de 266 cepas de *E. coli* BLEE. Encontraron que 72,2 % de las cepas fueron sensibles a fosfomicina, 3.8% presentaron sensibilidad intermedia y 24.1% fueron resistentes mediante el método de dilución en agar. Con el método de disco difusión 72.6% de las cepas fueron sensibles, 2.6% presentaron sensibilidad intermedia y 24.8% fueron resistentes a fosfomicina, con este método se obtuvieron 3 falsos negativos y 4 falsos positivos. Los parámetros diagnósticos para la prueba de disco difusión fueron del 98.4% de sensibilidad y 94.6% de especificidad, los valores predictivos positivo y negativo fueron 97.9% y 98.9% respectivamente y la concordancia entre ambos métodos medidos mediante la índice kappa fue del 0.93%, concluyendo que existe una excelente concordancia entre ambos métodos.

López (2017), en su revisión realizado en Lima-Perú con el objetivo de determinar la prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEE. Realizó un estudio descriptivo de corte transversal a partir de 357 urocultivos analizados, de los cuales 273 tuvieron un aislamiento positivo, de estos 220 (80.6%) fueron identificados como *E. coli*. Se encontró un 24% de prevalencia de *E. coli* BLEE del total de urocultivos positivos, concluyendo que en nuestro medio hay una alta prevalencia de *E. coli* BLEE.

Apaza (2017), en esta investigación realizada en Puno-Perú con los objetivos de determinar a *Escherichia coli* como agente causal de las infecciones urinarias, determinar la producción de BLEE y perfil de sensibilidad de esta bacteria a diferentes antibióticos entre ellos fosfomicina. El

autor realizó un estudio descriptivo de corte transversal a partir de 44 muestras de orina de los cuales 31 (70.45%) presentaron urocultivo positivo para *E. coli*. Asimismo, 10 de estos aislamientos (32.26%) presentaron producción de BLEE, la sensibilidad y resistencia frente a fosfomicina fue del 60% y 40% respectivamente. Concluyendo que *E. coli* es el principal agente etiológico de las ITU y presenta un marcado aumento de resistencia antimicrobiana.

León (2012), en esta revisión realizado en Puno-Perú con el objetivo de determinar la resistencia a antibióticos betalactámicos y no betalactámicos en aislados de *Escherichia coli* productoras de BLEE. El autor realizó un estudio descriptivo, retrospectivo de corte transversal a partir de un total de 63 muestras de orina, la prevalencia de *E. coli* fue del 66.7% (42 cepas) y la producción de BLEE en este microorganismo fue del 61.9% (26 cepas) asimismo la resistencia a los antibióticos no betalactámicos como fosfomicina fue del 15.38%. Concluyendo que las cepas de *Escherichia coli* BLEE presentan mayor resistencia a los antibióticos betalactámicos en comparación con los no betalactámicos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la concordancia diagnóstica de los métodos fenotípicos de disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* para detección de resistencia a fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de BLEE procedentes de urocultivos

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*

Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de disco difusión

Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* BLEE a fosfomicina entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*

1.4 Justificación

Siendo el primer trabajo de evaluación de métodos fenotípicos para detección de resistencia a fosfomicina que se realiza en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, el cual busca profundizar y aportar información científica con respecto a temas como parámetros diagnósticos en pruebas de microbiología y susceptibilidad antimicrobiana a fosfomicina en nuestro país. Debido a que contamos con muy pocas investigaciones y datos estadísticos relacionados con estos temas que puedan ser comparados con otros países.

Asimismo, este estudio aportará métodos alternativos a la prueba “*gold standard*” como son los métodos de disco difusión y el *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*. Este último permite la detección rápida de resistencia a fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* en menos de dos horas (Nordman *et al.*, 2019), comparado con la prueba de referencia, dilución en gar, que requiere un mínimo de dieciocho horas de incubación.

Los resultados de este estudio pueden contribuir a dar soluciones al problema de decisión clínica de uso de fosfomicina como tratamiento de primera línea. Ya que al contar con los resultados de sensibilidad de manera rápida le permitirán al clínico prescribir un tratamiento dirigido y de esa manera evitar el uso indiscriminado de fosfomicina por ende disminuir la resistencia a este antibiótico. Por otro lado, ayudaría a contribuir y motivar en nuestro medio la vigilancia de la resistencia antibiótica y evaluación de métodos en el laboratorio de microbiología.

Asimismo, esta investigación aportaría en cuanto a temas económicos y sociales ya que al realizarse una medicación dirigida los pacientes y la población en general no tendrían que preocuparse en realizar gastos innecesarios en otros antibióticos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

En esta sección se explicará en detalle los principales métodos de susceptibilidad antimicrobiana como la prueba de disco difusión, la prueba de CMI dentro de esta se menciona el método de dilución en agar y una nueva y novedosa prueba llamada *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*.

2.1.1.1 Prueba de difusión por disco (DD). Llamado también antibiograma, es una técnica rutinaria utilizada en los laboratorios de Microbiología, requiere de concentraciones establecidas del agente antimicrobiano en estudio las cuales se encuentran adheridas en discos de papel filtro. Sobre la superficie superior de una placa que contiene 4mm de profundidad de medio Müller Hinton se inocula la suspensión de la bacteria en estudio, la cual debe de tener una concentración de turbidez igual al estándar 0.5 McFarland. De manera radial los antimicrobianos se difunden en el medio, siendo mayor la concentración cerca del disco y menor mientras más lejos de este (CLSI, 2018).

Este método requiere de una incubación a 35°C por alrededor de 16-18h, las zonas de inhibición, definido como espacios sin presencia de crecimiento bacteriano disco, son medidas en base a su diámetro para ser categorizados como sensible, intermedio o resistente (CLSI, 2018).

Los puntos de corte establecidos para fosfomicina y enterobacterias (Aplica solo para *Escherichia coli*) para el método de disco difusión son: sensible mayor o igual a 16mm, intermedio de 13-15mm y resistente menos o igual a 12mm (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2019).

2.1.1.2 Pruebas de la CMI. Estos métodos de prueba se basan en la incubación de una determinada cantidad de bacterias con diluciones establecidas seriadas de manera descendente del antibiótico, con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) entendiéndose esta como aquella concentración de antibiótico capaz de evitar el crecimiento y replicación bacteriana, se puede utilizar como medio caldo o agar Müller Hinton (Cavalieri et al., 2005). Las pruebas de microdilución son considerados como métodos de referencia estandarizados para la detención de la CMI. (CLSI, 2018).

Ya sea utilizando placas o tubos y agar o caldo se requiere de una suspensión bacteriana ajustada a la escala de 0.5 Mc Farland. La lectura se realiza evaluando el crecimiento bacteriano luego de cumplir el tiempo de incubación mínima de 16-20 horas a una temperatura de 35°C, los resultados se interpretan como sensible, intermedio o resistente en base a los puntos de corte establecidos por la CLSI. (CLSI, 2018).

A. Prueba de dilución en agar de CMI (DA). En este tipo de prueba se añade una cantidad del antibiótico en estudio al agar. Para obtener diferentes rangos de dilución del antibiótico se debe de preparar una serie de placas que tengan concentraciones distintas del antibiótico. Una vez solidificado el medio se procede a inocular la bacteria en estudio sobre la superficie del medio, el medio utilizado generalmente es el agar Mueller-Hinton no se le debe de añadir cationes, pero si puede ser suplementado con algún nutriente en función a los requerimientos del microorganismo como en el caso de *Streptococcus pneumoniae*. El medio debe de estar en un rango de pH que va de 7.2 a 7.4. (Cavalieri et al., 2005).

La lectura se realiza una vez cumplido el tiempo de incubación de 16-20 horas, los puntos de corte establecidos para fosfomicina y enterobacterias (Aplica solo para *Escherichia coli*) para

el este método son: sensible menor o igual a 64 ug/ml, intermedio 128ug/ml y resistente mayor o igual a 256 ug/ml, asimismo este método es considerado como el *gold standard* (CLSI, 2019).

2.1.1.3 Rapid fosfomicin/*Escherichia coli* NP test. Es un método de fácil manejo el cual se basa en la detección de crecimiento bacteriano o ausencia de este mediante hidrolisis de carbohidratos, en presencia de determinadas concentraciones de fosfomicina. Este método permite detectar de manera rápida la resistencia a fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* en tan solo una hora y media. (Nordman et al., 2019).

Al igual que los otros métodos de susceptibilidad antimicrobiana se requiere una suspensión bacteriana ajustada a una escala de 3.0 a 3.5 McFarland. Este test requiere de una microplaca de poliestireno en el cual se inocula la suspensión bacteria en presencia o ausencia de fosfomicina en pocillos separados (Nordman et al., 2019).

Un resultado se cuenta como positivo si hay crecimiento bacteriano en presencia de fosfomicina, esto se observa con un cambio de color de naranja a amarillo, lo cual se interpreta como un aislado resistente a este antibiótico. Asimismo, un aislamiento bacteriano es considerado negativo e interpretado como susceptible si no hay crecimiento de este, el cual se mantiene el color naranja (Nordman et al., 2019).

2.1.2 Infecciones de tracto urinario (ITU)

Es definida como un proceso inflamatorio causado por la entrada, establecimiento y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel. El cual implica un conjunto de entidades clínicas como fiebre, tenesmo, disuria, dolor suprapúbico entre otros; puede presentarse también de manera asintomática (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2022). Asimismo, es una de las infecciones más frecuentes en el ser humano presentadas a lo largo

de su desarrollo, que va desde los primeros años hasta la vejez. Su frecuencia varía según la edad en ambos sexos. (Gonzales et al., 2011).

Los bacilos gram negativos son los principales agentes etiológicos de este tipo de infección, especialmente *Escherichia coli*. (Álvarez, 2007).

2.1.3 Enterobacterias

Esta familia está conformada por bacilos o cocobacilos gram negativos. Entre sus principales características fenotípicas cabe mencionar que son bacterias no esporuladas, pueden ser inmóviles o móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. Asimismo, estas bacterias son anaerobios facultativos, oxidasa negativa y no requieren de componentes nutricionales complejos (Koneman y Allen, 2008). Este grupo de bacterias suelen colonizar las diferentes mucosas, en especial las del tracto urinario y gastrointestinal, por lo que las infecciones surgen en estos puntos de localización bacteriana (López, 2017).

2.1.3.1 *Escherichia coli*. Es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia de los *Enterobacteriaceae*, mide entre 0.5-1 mm es anaerobio facultativo no formador de esporas, su arquitectura bacteriana está constituida principalmente por capsula, pared bacteriana, membrana externa, fibrinas y flagelos peritricos (Murray et al., 2009).

La capsula se encuentra por encima de la pared celular bacteriana, está conformada por polisacáridos y posee actividad antigénica por lo que origina una gran variedad de antígenos capsulares K (Murray et al., 2009).

La membrana externa está formada por una bicapa lipídica que contiene lipopolisacáridos que originan el antígeno somático O esta membrana cumple la función de protección contra los ácidos biliares y fermentos derivados de la digestión (Quinn et al., 2011).

Mientras que la membrana citoplasmática la cual está conformada por una bicapa fosfolipídica que tiene como función principal regular el transporte de nutrientes, metabolitos y macromoléculas al interior de la célula (Puerta y Mateos, 2010).

Las fimbrias llamadas también pilis, son estructuras celulares filamentosas que ayudan a la adherencia celular, a la vez existen pilis sexuales que cumplen una función reproductora mediante el intercambio de material genético. Asimismo, estas estructuras expresan antígenos fimbriales F. Por otro lado, hay cepas que son inmóviles por ausencia de flagelos mientras las que poseen movimiento poseen antígenos proteicos flagelares H (Murray et al., 2009).

Estas bacterias presentan elementos genéticos constituidos por secuencias de ADN circular corto, que ayudan a mantener una replicación independiente, asimismo poseen factores de resistencia antimicrobiana y liberan toxinas, estos elementos son los plásmidos y episomas. (Koneman y Allen, 2008).

2.1.4 Resistencia antimicrobiana

Se define como aquel medio de defensa que poseen algunos microorganismos para hacer frente a los diferentes mecanismos de acción de los antimicrobianos, condición que existía incluso antes de la aparición de estos últimos. Y se ha visto incrementado debido al uso indiscriminado de los antibióticos lo que genera en las bacterias el fenómeno de presión selectiva. Esta situación contribuye a la manifestación y diseminación de la resistencia antimicrobiana (Rodríguez et al., 2014).

Existen muchas formas por las cuales las bacterias pueden adquirir algún mecanismo de resistencia antimicrobiana. Ya sea por genes, mutaciones, cambios metabólicos contra los antimicrobianos o de manera intrínseca a uno o diferentes antibióticos (Becerra et al., 2009).

2.1.4.1 Betalactamasas. La resistencia a los betalactámicos se puede presentar por muchos mecanismos y estos pueden llegar a asociarse entre sí (Poole, 2001) uno de los principales es la producción de enzimas como las betalactamasas, las cuales se presentan principalmente en las bacterias gram negativas. Son definidas como enzimas catalíticas de origen proteico y su producción esta mediada por un gen ya sea de tipo cromosómico o de transferencia plasmídica (Bush et al., 1995).

Existen dos clasificaciones principales de estas enzimas las cuales son la de Ambler quien las ordena en cuatro grupos en base a su estructura molecular (A, B, C y D) (Ambler, 1980) y la clasificación de Bush ordenándolas en tres grupos en base a sus características funcionales de acuerdo al sustrato y los perfiles de inhibición (1,2 y3) (Bush y Jacoby, 2010).

Su mecanismo de acción se basa en la hidrólisis del anillo betalactámico y de esta manera impide que se una el antibiótico a las proteínas de unión a penicilina o PBP. Estas enzimas pueden producirse de manera inducible o constitutiva (López, 2017).

A. *Betalactamasas de espectro extendido (BLEE).* Son enzimas de amplio espectro que hidrolizan la cadena oximino de los betalactámicos de tercera generación como ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y monobactamicos como aztreonam. No confiere resistencia a las cefamicinas y carbapenémicos, pero el ácido clavulánico las inhibe (Patterson, 2003).

La primera BLEE fue aislada en Alemania en el año 1983, son producidas principalmente por enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y son mediados por genes plasmídicos (López, 2017).

El origen de estas enzimas son las betalactamasas de espectro ampliado de las cuales las predominantes son las TEM-1, TEM-2, SHV-1 pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush. Estas enzimas sufrieron mutaciones puntuales en su centro activo y como consecuencia de

esto dieron origen a las betalactamasas de espectro extendido, las cuales tienen una actividad hidrolítica más extensa que las enzimas originales y son ordenadas según Bush en el grupo 2be clase molecular A. Sin embargo, no todas se encuentran en este grupo como es el caso de las oxacilinasas que se clasifican en el grupo 2d clase molecular D (Patterson, 2003).

No es hasta el año 1989 donde se descubre de la existencia de las CTX-M o cefotaximasas, las cuales son un tipo de BLEE que se originan a partir de betalactamasas cromosómicas. Se clasifican en el grupo molecular A y confieren resistencia a cefotaxima (López, 2017).

2.1.4.2 Resistencia a Fosfomicina

En esta sección se explica a mayor detalle el antibiótico en estudio el cual es la fosfomicina, su mecanismo de acción y la resistencia asociada a este antimicrobiano.

A) Fosfomicina. Fosfomicina es un antibiótico antiguo descubierto en el año 1969, es producido de manera natural por bacterias del género *Streptomyces* (Hendlin et al., 1969) así como también se puede obtener de manera sintética. Pertenece a la clase de antibióticos fosfóricos, en sus inicios se administraba por vía parenteral en pacientes con infecciones graves incluso en casos de meningitis (Baylan, 2010).

Es de efecto bactericida rápido y posee un amplio espectro de actividad incluyendo bacterias gram positivo y un gran número de bacterias gram negativas (Falagas et al., 2010).

B) Mecanismo de acción. Interfiere en la formación del precursor de peptidoglucano, ácido N-acetilmurámico, este es el paso inicial para la formación de la pared celular bacteriana (Borisova et al., 2014). Fosfomicina forma puentes covalentes en el sitio de acción del MurA (N-acetil glucosamina enolpiruvín transferasa), el cual es una enzima involucrada en el proceso de formación de peptidoglucano que cataliza la transferencia de fosfoenilpiruvato y N-

acetilglucosamina esenciales para la formación de N-acetilmurámico, de esta manera inhibe la síntesis de la pared celular (Kahan et al., 1974).

C) Resistencia. Se puede producir principalmente por baja permeabilidad del antibiótico, por mutaciones en el centro activo de la enzima MurA y la producción de enzimas que inactivan a la fosfomicina mediados por genes (*Gen fos*) (Castañeda et al., 2013).

Las metaloenzimas del tipo FosA son las causantes de la resistencia adquirida a fosfomicina en cepas de *E. coli* las cuales catalizan la conjugación de glutatión a fosfomicina, de esta manera inactivan a este antibiótico (Falagas et al., 2016), se han reportado varios subtipos de enzimas FosA de esta la más comúnmente identificada es la del tipo FosA3 la cual se encuentra como un mecanismo adquirido de resistencia a la fosfomicina en *E. coli* (Wachino et al., 2010)

Asimismo, el gen del tipo fosA3 se encuentra comúnmente en plásmidos conjugativos que portan genes que codifican betalactamasas de espectro extendido tipo CTX-M, por lo tanto, los aislados de *E. coli* que adquieren estos plásmidos presentan resistencia a fosfomicina y cefalosporinas de amplio espectro (Benzerara et al., 2017)

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

Estudio observacional, descriptivo, diseño no experimental prospectivo y de corte transversal

3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente estudio de investigación se desarrolló en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante el periodo del año 2021

3.3 Variables (Operacionalización)

- *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)
- Resistencia a fosfomicina por método de disco difusión.
- Resistencia a fosfomicina por *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*.

Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Indicador	Categoría o escala	Instrumento de recolección
<i>Escherichia coli</i> productor de betalactamas de espectro extendido	Bacterias Gramnegativas pertenecientes al grupo Enterobacteriecea, que producen enzimas que inhiben los betalactámicos.	De laboratorio	Presencia de betalactamasas por pruebas fenotípicas	Presente ausente	Ficha de datos
Resistencia a fosfomicina por método de disco difusión	Capacidad que tiene una bacteria de soportar los efectos biocidas de fosfomicina destinados a eliminarlas o controlarlas.	De laboratorio	Resistencia a fosfomicina detectado por método de disco difusión	Sensible ($\geq 16\text{mm}$) Intermedio (13-15mm) Resistente ($\leq 12\text{mm}$)	Ficha de datos
Resistencia a fosfomicina por método <i>rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test</i>	Capacidad que tiene una bacteria de soportar los efectos biocidas de fosfomicina destinados a eliminarlas o controlarlas.	De laboratorio	Resistencia a fosfomicina detectado por método <i>rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test</i>	Sensible (Amarillo) Resistente (Naranja)	Ficha de datos

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

Conformado por aislamientos de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido de urocultivos, demostrado por métodos fenotípicos. Procedentes de pacientes atendidos en los servicios de consulta externa y hospitalización del Hospital Nacional Hipólito Unanue.

3.4.2 Muestra

Se incluyeron 103 aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE procedentes de urocultivos que cuenten con registro de antibiograma para fosfomicina y que fueron aislados entre enero y diciembre del año 2020, las cepas cumplieron con los criterios de exclusión e inclusión

- **Criterios de inclusión**

- *E. coli* aislados de urocultivos
- Aislamientos de *E. coli* productor de BLEE.
- Aislamientos de *E. coli* BLEE con registro de antibiograma para fosfomicina

- **Criterios de exclusión**

- Urocultivos con aislamientos distintos a *E. coli*
- *E. coli* procedente de urocultivo con ausencia de BLEE.
- *E. coli* procedente de otras muestras clínicas distintas a orina.
- Aislamientos repetidos por paciente
- Aislamientos que no presenten datos para su registro.

3.5 Instrumentos

Se elaboró una ficha de recolección de datos (Anexo A), donde se registró los datos de cada muestra.

3.6 Procedimientos

Todas las cepas recolectadas fueron conservadas en viales con caldo tripticasa de soya (TSB) glicerol al 20% y almacenadas a -20°C hasta su uso. Para el procesamiento de las muestras se replicaron dos veces los aislamientos en agar tripticasa soya (TSA) a 35°C por 16-18 horas.

3.6.1 Método de dilución en agar (DA) gold standard

Mediante este método recomendado por la CLSI se determinó la concentración mínima inhibitoria. Para este procedimiento se utilizó agar Mueller-Hinton suplementado con 25ug/ml de glucosa-6-fosfato y fosfomicina disódica, se evaluaron los aislamientos en cuatro placas con concentraciones diferentes de fosfomicina: 32ug/ml, 64ug/ml, 128ug/ml y 256ug/ml. Se realizó una suspensión de 0.5 escala de McFarland para cada muestra y solo de 1 a 2 µl de esta suspensión fue inoculada por cada placa. Asimismo, se colocaron placas de agar MH sin antibiótico como entrada y salida a modo de control, de esta manera poder confirmar que no hubo contaminación o un exceso de antibiótico durante el procedimiento. Finalmente, se llevó a incubar a 35 °C ± 2°C por 16 a 20 horas (CLSI,2018)

Interpretación de los resultados:

La CIM se registrará como el valor de la dilución menor que inhibe completamente el desarrollo bacteriano, no se debe considerar el desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo. Los aislamientos obtenidos con MIC ≤ 32 y 64 ug/ml son considerados sensibles, iguales a 128 ug/ml intermedios y ≥ 256 ug/ml resistentes (CLSI,2019)

3.6.2 Método de disco difusión (DD)

Para este método se realizó el procedimiento estándar de un antibiograma, en una placa de agar Mueller-Hinton se inoculo una suspensión de muestra ajustado previamente al patrón de turbidez 0.5 escala de McFarland. En cada placa con inóculo de muestra se colocó un disco

de fosfomicina de 200 ug que contiene 50 ug de glucosa 6-fosfato, se llevó a incubar a 35 °C \pm 2°C por 16 a 20 horas (CLSI,2019)

Interpretación de resultados:

Pasado el tiempo de incubación se procede a medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición, según los puntos de corte establecidos para discos de fosfomicina por la CLSI. Se considera un resultado sensible si la medida del halo es \geq 16mm, intermedio de 13-15 mm y \leq 12 mm resistente (CLSI,2019)

3.6.3 Método NP fosfomicina/E.coli rapid test (RT)

Para este procedimiento se preparó una solución llamada *Rapid fosfomicin NP solution*, el cual contiene 2.5% agar Mueller-Hinton ajustado en cationes, 0.005% indicador rojo de fenol y 1% D (+) glucosa, dicha solución se ajustó a un pH de 7.5. Antes de realizar la prueba se suplemento la solución anteriormente preparada con fosfomicina a la concentración de 40 ug/ml y 25 ug/ml de glucosa-6fosfato, para de esta manera obtener *Rapid fosfomicin NP solution* con antibiótico (Nordman et al., 2019).

Se realizó una suspensión de cada muestra en 5ml de solución de NaCl al 0.9% para tener una concentración de 3.0-3.5 escala de McFarland. En un pocillo de una microplaca de poliestireno de base cóncava con alícuotas de 150 ul de *Rapid fosfomicin NP solution* sin fosfomicina y en otro pocillo con alícuota de 150 ul de *Rapid fosfomicin NP solution* con fosfomicina, a cada uno de estos pocillos se añadió 50 ul de suspensión de muestra. Se realizó el mismo procedimiento con 50 ul de solución de NaCl al 0.9% como control de placa y como control positivo y negativo se utilizó una cepa *E. coli* resistente y sensible respectivamente a fosfomicina. Incubar la placa a 35 °C \pm 2°C, cada 30 min se observó el cambio de color para finalmente leer los resultados después de 1h 30 min (Nordman et al., 2019).

Interpretación de resultados:

Un resultado será considerado positivo, resistente a fosfomicina, si se observa crecimiento bacteriano en presencia de antibiótico, esto se evidenciará con un cambio de color de naranja a amarillo. Asimismo, un resultado será considerado negativo, sensible a fosfomicina, si no se observa crecimiento bacteriano en presencia de antibiótico se mantiene el color naranja (Nordman et al., 2019).

3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos de los ensayos se almacenaron en una base de Microsoft Excel, a los cuales se les realizó el análisis descriptivo y estadístico estos incluyen los parámetros diagnósticos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y coeficiente Kappa de Cohen.

3.8 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos de este estudio se llevaron a cabo en aislamientos bacterianos, asimismo los datos demográficos de los pacientes pertenecientes a las cepas no se mencionan en el trabajo, manteniendo de esta forma la confidencialidad de la información de acuerdo con las buenas prácticas clínicas y éticas de investigación en salud. Asimismo, este trabajo presentó una declaración jurada en la cual se detalla que todos los datos utilizados fueron recolectados del Hospital Nacional Hipólito Unanue (Anexo B) de igual de manera el trabajo se presentará ante el comité de ética del hospital.

IV. RESULTADOS

Un total de 103 (100%) aislamientos de *Escherichia coli* productores de BLEE procedentes de urocultivos fueron incluidos en el estudio. Mediante el método de referencia de dilución en agar (DA), 44 (42.7%) cepas resultaron ser sensibles ($\text{CMI} \leq 64 \text{ ug/ml}$), 57 (55.4%) resistentes ($\text{CMI} \geq 256 \text{ ug/ml}$) y 2 (1.9%) con sensibilidad intermedia a fosfomicina ($\text{CMI} 128 \text{ ug/ml}$), según se puede observar en la tabla 1.

Tabla 2

Frecuencia de resistencia a fosfomicina en Escherichia coli BLEE por método dilución en agar.

Categoría de interpretación	Número de cepas	%
Sensible	44	42.7%
Sensibilidad intermedia	2	1.9%
Resistente	57	55.4%
Total	103	100%

Uno de los métodos a evaluar fue el de disco difusión (DD), con el cual se obtuvieron que 43 (41.7%) cepas sensibles, 58 (56.3%) resistentes y 2 (1.9%) presentaron sensibilidad intermedia a fosfomicina, estos datos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 3

Frecuencia de resistencia a fosfomicina en Escherichia coli BLEE por método disco difusión.

Categoría de interpretación	Número de cepas	%
Sensible	43	41.7%
Sensibilidad intermedia	2	1.9%
Resistente	58	56.4%
Total	103	100%

Asimismo, con este método se obtuvieron dos resultados falsos positivos y un falso negativo frente a la prueba de referencia (DA). Por otro lado, se realizó el cálculo de los parámetros diagnósticos para la prueba de disco difusión usando como patrón de referencia a la prueba de dilución en agar. Se obtuvo una sensibilidad de 98.2%, especificidad del 95.5%, exactitud diagnóstica del 97.0% y valores predictivos positivo y negativo: VPP:96.6% y VPN: 97.7%, estos datos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 4

Parámetros diagnósticos de la prueba de disco difusión.

Método	VP	FN	S (IC 95%)	VN	FP	E (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
Disco Difusión (DD)	56	1	98.2	42	2	95.5	96.6	97.7

Nota. VP: Verdaderos positivos; FN: Falsos positivos; S: Sensibilidad; VN: Verdaderos positivos; FP: Falsos positivos; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor predictivo negativo; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

Con el otro método, denominado como el *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* (RT), dio se obtuvieron 45 (43.6%) cepas sensibles y 58 (56.3%) resistentes, estos datos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 5

Frecuencia de resistencia a fosfomicina en Escherichia coli BLEE por método rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test (RT).

Categoría de interpretación	Número de cepas	%
Sensible	45	43.6%
Resistente	58	56.4%
Total	103	100%

Mediante este último método se obtuvo un resultado falso positivo y un falso negativo, frente a la prueba de referencia (DA). Por otro lado, se realizó el cálculo de los parámetros diagnósticos para la prueba *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* (RT) usando como patrón de referencia a la prueba de dilución en agar. Se obtuvo una sensibilidad de 98.5%, especificidad del 97.7%, exactitud diagnóstica del 98.0% y valores predictivos positivos y negativos: VPP:98.2% y VPN: 97.7%, estos datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 6

Parámetros diagnósticos de la prueba rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test.

Métodos	VP	FN	S (IC95%)	VN	FP	E (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
<i>Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test (RT)</i>	56	1	98.5	43	1	97.7	98.2	97.7

Nota. VP: Verdaderos positivos; FN: Falsos positivos; S: Sensibilidad; VN: Verdaderos positivos; FP: Falsos positivos; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor predictivo negativo; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

Se utilizó el coeficiente Kappa de Cohen (k) para valorar el grado de concordancia diagnóstica de cada prueba en evaluación frente al método de referencia (DA). Esta se calcula mediante la diferencia entre la proporción observada y la proporción esperada y se clasifica según la escala de valoración numérica de k como muy buena, buena, moderada, débil, muy débil y no concordancia propuesta por Landis y Koch. (Anexo C)

Al calcular el índice de Kappa para determinar la concordancia diagnóstica entre el método de disco difusión y el método de referencia, se obtuvo un coeficiente de Kappa de 0.94, considerado como de muy buena concordancia. Para el método *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* (RT) frente al método de referencia, se encontró un coeficiente de Kappa de 0.96 considerado también como de muy buena concordancia, como podemos observar en la tabla 6.

Tabla 7

Índice de Kappa obtenido para cada método fenotípico evaluado.

Método evaluado	Índice Kappa
Disco Difusión (DD)	0.94
<i>Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test</i> (RT)	0.96

Asimismo, la susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Escherichia coli* BLEE a fosfomicina promedio entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* fueron los siguientes: sensibilidad 42.6 % y resistencia 55.9% a fosfomicina, estos datos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 8

Frecuencia de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de Escherichia coli BLEE a fosfomicina por los tres métodos.

Método	Frecuencia de sensibilidad a fosfomicina	Frecuencia de resistencia a fosfomicina
Dilución en agar	42.7%	55.4%
Disco difusión	41.7%	56.3%
<i>Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test</i>	43.6%	56.3%
Promedio	42.6%	55.9%

Finalmente, a manera se resumen se presentan los datos obtenidos de concordancia y parámetros diagnósticos por cada prueba evaluada, estos datos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 9

Resumen de parámetros diagnósticos obtenidos por los dos métodos fenotípicos evaluados.

Métodos	S (IC95%)	E (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	Índice Kappa
Disco Difusión (DD)	98.2	95.5	96.6	97.7	0.94
<i>Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test (RT)</i>	98.5	97.7	98.2	97.7	0.96

Nota. VP: Verdaderos positivos; FN: Falsos positivos; S: Sensibilidad; VN: Verdaderos positivos; FP: Falsos positivos; E: Especificidad; VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor predictivo negativo; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las infecciones del tracto urinario vienen a ser una de las patologías que más se diagnostican en el ámbito hospitalario con un porcentaje que va desde el 75% al 80% esto de acuerdo a una investigación realizada por Jiménez et al. (2017), lo que representa un problema de salud pública.

Un estudio realizado por Rocha et al. (2015), a nivel de toda Latinoamérica, muestra un porcentaje del 32% de cepas *E. coli* BLEE, cuyos resultados concuerdan con los encontrados por López (2017) en Lima-Perú, quien obtuvo un 24% de prevalencia de *E. coli* BLEE en urocultivos positivos. Nuestro estudio fue realizado en base a cultivos de *E. coli* BLEE obtenidos de urocultivos, siendo este el principal agente causal de las infecciones urinarias y que cada vez se va haciendo más resistente a los antimicrobianos de alta eficacia como fosfomicina.

Según Liu et al. (2011), en su investigación realizada en China encontró una sensibilidad del 95.5% de fosfomicina frente a *E. coli* BLEE, estos resultados son similares a los obtenidos por Zamudio (2017) en México, quien menciona a *E. coli* BLEE (60%), como el principal agente patógeno, reportándose el 100% de sensibilidad a fosfomicina. Estos resultados difieren con los estudios de Avial (2013) realizado en España, quien señala el aumento de la prevalencia de *E. coli* BLEE y de resistencia a fosfomicina en los años 2005 (3.9% y 0%); 2009 (7.3% y 9.3%) y 2011 (8.7% y 14.4%) respectivamente, observándose un incremento significativo de resistencia a lo largo del tiempo. Datos muy similares fueron obtenidos por León (2012), en Puno –Perú, determinando que la prevalencia de *E. coli* BLEE fue del 61.9% y la resistencia a fosfomicina del 15.38%. Apaza (2017) en Puno-Perú, encontró en su estudio una prevalencia del 32.26% de *E. coli* BLEE con una sensibilidad y resistencia a fosfomicina del 60% y 40%, respectivamente, en comparación con nuestros resultados de

susceptibilidad a fosfomicina hallados en este estudio, cuya sensibilidad promedio fue menor (42.6%) y la resistencia fue mayor (55.9%).

Este contraste en los datos de susceptibilidad antimicrobiana a fosfomicina entre los diferentes estudios nos permite señalar el aumento de la resistencia a este antibiótico, debido a su uso indiscriminado en el tratamiento. He ahí la importancia de un adecuado manejo y temprana evaluación de este antibiótico con métodos más rápidos y sensibles.

En la presente investigación hemos evaluado la concordancia diagnóstica de dos métodos fenotípicos para la detección de resistencia a fosfomicina: Disco difusión y *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test*, usando como patrón de referencia al método de dilución en agar. Analizando los resultados para la prueba de disco difusión se pudo observar una alta sensibilidad y especificidad de la prueba, 98.2% y 95.5%, respectivamente y una excelente concordancia (0.94) con la técnica de referencia. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lifonzo et al (2018) en Lima-Perú, quienes evaluaron esta misma prueba y obtuvieron una sensibilidad de 98.4% y especificidad de 94.6% y una concordancia de 0.93.

El segundo método desarrollado, *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test* (RT), mostró una sensibilidad y especificidad del 98.5% y 97.7% respectivamente y una concordancia de 0.96 considerado como excelente con la prueba de referencia. Estos datos obtenidos en nuestro estudio se pueden comparar con la investigación realizada por Nordmann et al (2019) en Suiza, en el cual se observa una sensibilidad mayor 100% y valores muy similares de especificidad con un 98.7% para la misma prueba, resaltando que su mayor ventaja radica en el tiempo de lectura el cual no excede de dos horas. Una desventaja con este método vendría a ser la preparación de la solución madre, específicamente por el ajuste a pH 7.5 lo que conlleva la necesidad de contar con un potenciómetro.

Ambas pruebas mostraron un excelente desempeño, asimismo resaltar que este es el primer estudio de evaluación de métodos fenotípicos para detección de resistencia a

fosfomicina realizado en el Perú, el cual sirve de antecedente para próximos estudios a realizarse.

VI. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos para los dos métodos fenotípicos evaluados, disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* ambos presentaron una buena concordancia diagnóstica de 0.94 y 0.96 respectivamente frente al método de dilución en agar, el cual es el método de referencia.
- El método de disco difusión se obtuvo una sensibilidad de 98.2%, especificidad 95.5%, valor predictivo positivo 96.6% y valor predictivo negativo 97.7% lo que la hace una prueba con un buen desempeño según los parámetros diagnósticos evaluados.
- *Rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* obtuvo una sensibilidad de 98.5%, especificidad 97.7%, valor predictivo positivo 98.2% y valor predictivo negativo 97.7% lo que la hace una prueba con un buen desempeño según los parámetros diagnósticos evaluados. Adicionalmente es el método más rápido con respecto a los otros, los resultados se obtienen a las dos horas e incluso desde los 30 minutos ya se puede visualizar la reacción.
- La susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* BLEE a fosfomicina entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test* fue de sensibilidad 42.6 % y resistencia 55.9% a fosfomicina.

VII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere la implementación de nuevos métodos fenotípicos como el *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test* para la detección de susceptibilidad antimicrobiana a fosfomicina en *Escherichia Coli* BLEE en los laboratorios de rutina, por ser este un método rápido de buena concordancia y desempeño, de fácil lectura e interpretación.
- Se recomienda considerar el costo-beneficio en la implementación del método *rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test* de acuerdo a las condiciones logísticas del laboratorio, principalmente por la necesidad de contar con un potenciómetro para el ajuste de pH de la solución madre.
- Asimismo, la capacitación constante del personal en temas de susceptibilidad antimicrobiana y nuevas técnicas de detección, además de la implementación de los recursos que sean necesarios para garantizar un adecuado desarrollo de los procedimientos en el laboratorio y análisis de los resultados.
- Considerar realizar estudios similares en los laboratorios para de esa manera poder obtener más evidencia científica en cuanto a nuevas técnicas de detección y susceptibilidad antimicrobiana.

VIII. REFERENCIAS

- Álvarez Barranco, L.C. (2007). *Infecciones de vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte*.
Revista Salud Uninorte 23 (1), 9-18.
<https://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/view/4050>
- Ambler, RP. (1980). *The Structure of Beta-Lactamases*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 289 (1036), 321-31.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Apaza Humpiri, A.C. (2017). *Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes con infección del tracto urinario que acuden al Hospital Regional "Manuel Núñez butrón"- Puno*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano].
Repositorio institucional UNAP. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/6553>
- Avial, C. R., Infante, I. R. A., Hernández, E., & de la Garza, J. J. P. (2013). *Aumento significativo de la resistencia a fosfomicina en cepas de Escherichia coli productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos (2005-2009-2011)*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(1), 43-46. <http://www.seq.es/seq/0214-3429/26/1/avial.pdf>
- Baylan, O. (2010). *Fosfomicin: past, present and future*. *Mikrobiyoloji bulteni*, 44(2), 311-321.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20549968/>
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). *Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29 (2), 70-76. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2009/ei092e.pdf>
- Ben-Ami R, Rodríguez-Bano J, Arslan H, Pitout J, Quentin C, Calbo E, *et al.* (2009). *A Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum β Lactamase-Producing*

Enterobacteriaceae in Non hospitalized Patients. Clin Infect Dis;49(5):682-690.

<https://doi.org/10.1086/604713>

Benzerara, Y., Gallah, S., Hommeril, B., Genel, N., Decré, D., Rottman, M., & Arlet, G. (2017).

Emergence of plasmid-mediated fosfomicin-resistance genes among Escherichia coli isolates, France. Emerging infectious diseases, 23(9), 1564

<https://doi.org/10.3201/eid2309.170560>

Borisova, M., Gisin, J., Mayer, C. (2014). *Blocking peptidoglycan recycling in Pseudomonas*

aeruginosa attenuates intrinsic resistance to fosfomicin. Microb Drug Resist, 20,231–237.

<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2014.0036>

Bush, K. y Jacoby, GA. (2010). *Updated Functional Classification of β -Lactamases.* Antimicrobial

Agents and Chemotherapy, 54 (3),969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

Bush, K. Jacoby, G. y Medeiros, A. (1995). *A functional classifications scheme for-lactamases and*

its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother.39: pp 1211-33.

<https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aac.39.6.1211>

Calle Núñez A, Colqui Campos KA, Rivera Estrella DA, Cieza Zevallos JA. (2017). Factores

asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Med Hered.*28 (3),142-9. <http://doi.org/10.20453/rmh.v28i3.3180>

[10.20453/rmh.v28i3.3180](http://doi.org/10.20453/rmh.v28i3.3180)

Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. (2013). Molecular mechanisms and clinical

impact of acquired and intrinsic fosfomicin resistance. *Antibiotics (Basel)* 2:217–236.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>

Cavaliere, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., ... & Spiegel,

C. A. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. *Seattle: University of*

Washington. [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad_antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf)

Centers of Disease Control and Prevention (5 de Julio 2022). *Enfermedades comunes* <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/uti.html>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard 11th Edition (M07-A10). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*; 29th informational supplement. CLSI document M100-S29. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf

Colque Ccarita, J.C. (2017) *Resistencia antimicrobiana en infecciones asintomáticas del tracto urinario en gestantes del hospital “Carlos Monge Medrano” – Juliaca* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio institucional UNAP. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/5996>

Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. (2010). *Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review*. *Lancet Infect Dis* (10), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70325-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70325-1)

Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. (2016). *Fosfomycin*. *Clin Microbiol Rev* 29:321–347. <https://doi.org/10.1128/CMR.00068-15>

- Gonzales-Chamorro, R. Palacios, J. Alcover, J. Campos, F. Borregoy D. Dámaso. (2011). *La infección urinaria y su prevención*. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2011.05.002>
- Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, Miller TW, Chaiet L, Kahan FM, Foltz EL, Woodruff HB, Mata JM, Hernández S, Mochales S. (1969). *Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces*. *Science* 166:122–123. <http://dx.doi.org/10.1126/science.166.3901.122>.
- Jiménez Bermúdez, J. P., Carballo Solís, K. D., & Chacón Jiménez, N. K. (2017). *Manejo de infecciones del tracto urinario*. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 26(1), 1-10. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292017000100001&script=sci_arttext
- Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. (1974). *The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin)*. *Ann N Y Acad Sci* 235:364–386. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb43277.x>.
- Koneman, E. y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. médica panamericana.
- León Rodríguez, L.J. (2012) *Multirresistencia antimicrobiana de cepas Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aislados en urocultivo del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón” Puno* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio institucional UNAP <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2803>
- Lifonzo-Mucha SJ, Tamariz-Zamudio PE, Champi-Merino RG. (2018). *Sensibilidad a fosfomicina en Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido*. *Rev Perú Med ExpSaludPublica*.35(1), 68-71. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3566>.

- Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ. (2011). *Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan*. J Microbiol Immunol Infect 44:364–368. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.08.012>.
- López, P. (2017). *Escherichia coli productora de BLEE en urocultivos – clínica privada de Lima 2017*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/2384>
- Murray, P. Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Enterobacteriaceae, Microbiología médica 6a ed.*, pp. 300 – 315. Madrid: Elsevier.
- Nordmann P, Poirel L, Mueller L. (2019). *Rapid detection of Fosfomycin resistance in Escherichia coli*. J Clin Microbiol 57: e01531-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01531-18>.
- Patterson, J. E. (2003). *Extended-spectrum beta-lactamases*. Semin Respir Crit Care Med 24(1): pp 79-88. <http://doi.org/10.1055/s-2003-37919>
- Pigrau C. (2013). *Infección del tracto urinario nosocomiales*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 31(9), 614-624. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>
- Poole, K. (2001). *Multidrug resistance in gram-negative bacteria*. Current opinion in microbiology, 4(5), 500-508. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00242-3)
- Puerta, A., & Mateos, F. (2010). *Enterobacterias*. *Medicine*, 10(51), 3426–31. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease second edition*. <https://www.wiley.com/enus/Veterinary+Microbiology+and+Microbial+Disease+%2C+2nd+Edition-p-9781405158237>

- Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). *Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 139-145. https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v32n1/a20v32n1.pdf
- Rodríguez C. H., Nastro M., Dabos L., Vay C., & Famiglietti A. (2014). *Frecuencia de aislamiento y resistencia a los antimicrobianos de Acinetobacter spp. recuperadas de pacientes atendidos en un hospital universitario de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina*. *Revista argentina de microbiología*, 46(4), 320-324. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70090-2](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70090-2)
- Wachino, J. I., Yamane, K., Suzuki, S., Kimura, K., & Arakawa, Y. (2010). *Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing Escherichia coli clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 3061-3064. <https://doi.org/10.1128/AAC.01834-09>
- Zamudio-Chávez, O., Méndez-Tovar, S., Apodaca-Tomas, K., & Cruz-Hernández, M. (2017). *Estudio de sensibilidad de fosfomicina en enterobacterias y microorganismos multidrogosresistentes de muestras de pacientes del Hospital General «Dr. Gaudencio González Garza» del CMN «La Raza»*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 64(3), 114-119. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2017/pt173c.pdf>

IX. ANEXOS

Anexo A:

Ficha de datos

1. CÓDIGO:
2. FECHA DE MUESTRA: .../.../...
3. SEXO: () Masculino () Femenino
4. TIPO DE MUESTRA:
5. PROCEDENCIA:
6. AISLAMIENTO BACTERIANO:
7. PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS: () Presente () Ausente
8. RESISTENCIA A FOSFOMICINA:
 - Por método de dilución en agar
 - Por método de disco difusión
 - Por método *rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test*

Anexo B:**Escala de valoración del índice Kappa (k). (Landis y Koch)**

Kappa (k)	Grado de acuerdo
<0.00	No concordancia
0.00 – 0.20	Concordancia muy débil
0.21 – 0.40	Concordancia débil
0.41 – 0.60	Concordancia moderada
0.61 – 0.80	Concordancia buena
0.81 – 1.00	Concordancia muy buena

Anexo C: Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	METOLOGIA
Evaluacion de métodos fenotípicos para detección de resistencia a fosfomicina en <i>Escherichia coli</i> BLEE de urocultivos	<p>PROBLEMA GENERAL</p> <p>¿Cuál es la concordancia diagnóstica de los métodos fenotípicos de disco difusión y <i>rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test</i> para detección de resistencia a fosfomicina en <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE procedentes de urocultivos?</p> <p>PROBLEMAS ESPECIFICOS</p> <p>¿Cuál es la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del <i>rapid</i></p>	<p>OBJETIVO GENERAL</p> <p>Determinar la concordancia diagnóstica de los métodos fenotípicos de disco difusión y <i>rapid fosfomycin/Escherichia coli NP test</i> para detección de resistencia a fosfomicina en <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE procedentes de urocultivos.</p> <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS</p> <p>Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del <i>rapid</i></p>	<p><i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).</p> <p>Resistencia a fosfomicina por método disco difusión.</p> <p>Resistencia a fosfomicina por método <i>rapid</i></p>	<p>TIPO DE INVESTIGACION</p> <p>Estudio observacional, descriptivo, diseño no experimental prospectivo y de corte transversal</p> <p>POBLACION</p> <p>Conformado por aislamientos de <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido de urocultivos, demostrado por métodos fenotípicos. Procedentes de</p>

	<p><i>fosfomicin/Escherichia coli NP test?</i></p> <p>¿Cuál es la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de disco difusión?</p> <p>¿Cuál es la susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> BLEE a fosfomicina entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y <i>rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test?</i></p>	<p><i>fosfomicin/Escherichia coli NP test</i></p> <p>Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de disco difusión</p> <p>Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de fosfomicina entre los métodos de dilución en agar, disco difusión y <i>rapid fosfomicin/Escherichia coli NP test.</i></p>	<p><i>fosfomicin/Escherichia coli NP test.</i></p>	<p>pacientes atendidos en los servicios de consulta externa y hospitalización del Hospital Nacional Hipólito Unanue.</p> <p>MUESTRA</p> <p>Conformado por 103 aislamientos de <i>Escherichia coli</i> productores de BLEE procedentes de urocultivos que cuenten con registro de antibiograma para fosfomicina y que fueron aislados entre enero y diciembre del año 2020.</p>
--	---	--	--	--

