



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Tesinas de Grado

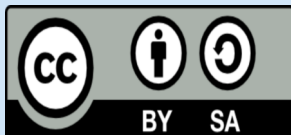
Micaela A. Starone

# Bacteriemias por bacilos Gram negativos en pacientes adultos asistidos en un hospital general de agudos : análisis de los hallazgos microbiológicos pre y post-pandemia COVID-19

2024

*Instituto de Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución – Compartir igual 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Starone, M. A. (2024). *Bacteriemias por bacilos Gram negativos en pacientes adultos asistidos en un hospital general de agudos : análisis de los hallazgos microbiológicos pre y post-pandemia COVID-19* [Trabajo Final de Grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2957>



**Instituto de Ciencias de la Salud**

***Carrera de Bioquímica***

**Trabajo final:**

**“Bacteriemias por bacilos Gram negativos en pacientes adultos asistidos en un hospital general de agudos: análisis de los hallazgos microbiológicos pre y post-pandemia COVID-19”**

**Estudiante: Micaela A. Starone**

**Directora: Ana M. Togneri**

## **AGRADECIMIENTOS**

Finalizar este trabajo de tesis significó mucho esfuerzo y dedicación, pero por otro lado, fue sumamente enriquecedor, tanto en lo académico como en mi desarrollo personal y profesional.

Son muchas las personas que de alguna manera, apoyaron y permitieron que hoy pueda estar finalizando esta etapa. A todos ellos quiero expresar mi especial y sincero agradecimiento.

Agradezco a mi directora, Ana M. Togneri, no solo por su dirección, apoyo, acompañamiento y su excelente guía durante todo el período que llevó realizar este trabajo, sino también por su calidez, por los momentos compartidos, por ser excelente persona y por permitirme la posibilidad y el enorme gusto de conocer el trabajo que enfrenta el bacteriólogo en el laboratorio.

Agradezco también a todos los bioquímicos del Laboratorio de Bacteriología del HIGA “Evita” de Lanús. A cada uno de ellos gracias por brindarme un lugar, hacerme sentir una más del laboratorio y por todo lo que me enseñaron.

A toda mi familia gracias por su apoyo incondicional y su constante aliento en este camino que elegí.

## RESUMEN

El **objetivo** de este trabajo fue realizar un estudio comparativo, retrospectivo y descriptivo, de los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos (BBGN) ocurridos durante Marzo/2017 a Diciembre/2019 (pre-COVID-19) y Marzo/2020 a Diciembre/2022 (intra/post-COVID-19), en adultos internados en un hospital del conurbano bonaerense. Se compararon sus características clínicas y demográficas, el foco de infección, el agente causal y su resistencia antimicrobiana (R).

**Resultados:** La BBGN representó el 61,6% (648) y el 63,3% (633) de las bacteriemias en los respectivos períodos. Los pacientes tuvieron similitudes en cuanto a sexo y edad. Durante la pandemia se diagnosticó un porcentaje mayor de BBGN en pacientes hipertensos ( $p<0,05$ ), y diabéticos y se redujo en pacientes de maternidad/obstetricia; el principal foco de bacteriemia fue la fiebre sin foco, con reducción de BBGN asociadas a foco renal y partes blandas ( $p<0,05$ ). También se evidenció: un aumento de la tasa de positividad de los Hemocultivos (HC), de bacteriemias polimicrobianas, y de HC contaminados ( $p<0,05$ ); un incremento de *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter* spp ( $p<0,05$ ); un aumento de la R en la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Enterobacterales* donde la producción de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido aumentó del 36 al 42% y el porcentaje de producción de carbapenemasas del 11 al 29% ( $p<0,05$ ); los antibióticos ensayados como alternativas terapéuticas presentaron resistencias superiores al 20%. *Acinetobacter* spp., presentó elevados niveles de R a la mayoría de los antimicrobianos ensayados, que se incrementaron durante la pandemia.

**Conclusión:** durante la pandemia COVID-19 hubo un aumento significativo en los porcentajes de resistencia antimicrobiana en los BGN causantes de bacteriemia. Esto impone la necesidad de establecer medidas de control para evitar su diseminación, dadas las escasas opciones terapéuticas disponibles.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. CONCEPTOS GENERALES .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Bacteriemia .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Sepsis .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Hemocultivo .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 El volumen de sangre .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Sistema automatizado de incubación y monitoreo .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.3 Toma de la muestra .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4 Especificidad del método .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.5 Criterios para la interpretación del hemocultivo .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.5.1.a El microorganismo aislado .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.5.1.b El tiempo hasta un resultado positivo .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5.1.c Número de botellas positivas .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5.1.d Tipo de huésped .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5.2.a Bacteriemia significativa .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5.2.b Hemocultivo contaminado .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Infección nosocomial .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Mecanismo de resistencia de impacto clínico.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1 <math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2 Carbapenemasas .....</b>	<b>14</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>

2.1 Impacto del COVID-19 sobre la resistencia antimicrobiana (RAM) .....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Justificación e importancia del tema seleccionado .....	17
3.2 Hipótesis .....	17
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Pregunta de investigación .....	18
4.2 Fin de la investigación .....	18
4.3 Referencias institucionales .....	18
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
5.1 Diseño del estudio .....	19
5.2 Procedimientos y herramientas para la recolección de datos .....	19
5.3 Obtención de los hemocultivos .....	19
5.4 Momentos de la extracción .....	20
5.5 Incubación y procesamiento de los hemocultivos .....	20
5.5.1 Procesamiento de los hemocultivos positivos .....	22
5.6 Identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana por métodos fenotípicos .....	23
5.6.1 Identificación bacteriana .....	23
5.6.2 Sensibilidad antimicrobiana .....	25
5.7. Confirmación de la producción de BLEE .....	26
5.7.1 Sinergia de inhibición .....	26
5.7.2 Diferencia del halo en la combinación con los inhibidores .....	27
5.8. Confirmación de la producción de carbapenemasa .....	27
5.8.1 Métodos confirmatorios .....	28

5.8.1.a Métodos colorimétrico .....	28
5.8.1.b Métodos basados en la inhibición de la enzima .....	29
5.8.1.c Métodos cromatográficos .....	31
5.9 Otros antibióticos ensayados en aislados multirresistentes .....	33
5.9.1 Predifusión .....	33
5.9.2 <i>Col-Drop Test</i> .....	34
5.10. Identificación bacteriana y detección de genes de resistencia por métodos genotípicos .....	35
5.10.1 Técnica diseñada para el diagnóstico etiológico directamente de hemocultivos positivos .....	35
5.11 Población .....	39
5.11.1 Variables .....	39
5.12 Análisis estadístico .....	39
5.13 Recursos para desarrollar el estudio .....	39
5.14 Consideraciones éticas .....	40
5.15 Beneficios potenciales .....	40
6. RESULTADOS .....	41
6.1 Hemocultivos procesados durante los períodos en estudio .....	41
6.2 Análisis de la frecuencia de los microorganismos .....	43
6.3 Análisis de los perfiles de resistencia .....	47
6.4 Características de los pacientes .....	53
6.4.1 Enfermedad de base .....	54
6.4.2 Frecuencia de los episodios de bacteriemia por BGN según los servicios de internación .....	56

6.4.3 Principales focos de bacteriemia por BGN .....	56
6.4.4 Análisis del <i>Status</i> COVID de la población en estudio .....	57
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
7.1 Hemocultivos procesados en cada período .....	59
7.2 Prevalencia de especies documentadas por cultivo .....	59
7.3 Eventos de resistencia (R) en BGN causantes de bacteriemia .....	60
7.4 Alternativas terapéuticas para aislados multirresistentes .....	60
7.4 Pacientes .....	61
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>63</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>

## INTRODUCCIÓN

### 1. CONCEPTOS GENERALES

#### **1.1 Bacteriemia:**

Se define como bacteriemia a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo. Ésta puede ocurrir a partir de la diseminación al sistema circulatorio desde un foco definido, denominada bacteriemia secundaria, mientras que una bacteriemia primaria se establece cuando no se puede identificar el foco de infección. Dentro de los criterios que se utilizan para poder dilucidar si se trata de una bacteriemia con o sin foco definido, lo primero a considerar son los datos clínicos del paciente, la información sobre su enfermedad de base, los posibles factores de riesgo asociados y el posible origen de la infección.

Los signos clínicos que hacen sospechar la presencia de una bacteriemia, son:

- Hipertermia ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ) o hipotermia ( $< 36^{\circ}\text{C}$ )
- Hipotensión
- Taquicardia ( $> 90$  latidos/min)
- Taquipnea ( $>20$ /min)
- Leucocitosis ( $> 12.000/\text{mm}^3$ ) o leucopenia ( $< 4.000/\text{mm}^3$ )
- Acidosis metabólica ( $\text{pCO}_2^1 < 32$  mmHg) [25].

#### **1.2 Sepsis:**

La sepsis es una disfunción orgánica potencialmente mortal causada por la respuesta desregulada del huésped a la infección. De acuerdo con el *Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock*, el *shock* séptico se define como un subconjunto de la sepsis en el que anomalías circulatorias, celulares y metabólicas particularmente profundas, se asocian con un mayor riesgo de mortalidad que la sepsis sola. Los pacientes con shock séptico pueden identificarse clínicamente por la necesidad de vasopresores para mantener una presión arterial media de 65 mm Hg o más y un nivel de lactato sérico superior a 2 mmol/L en ausencia de hipovolemia [24].

Tanto la sepsis como la bacteriemia son entidades clínicas severas, se presentan con mayor frecuencia en pacientes hospitalizados, ya que éstos poseen factores de riesgo dado su estado de inmunocompromiso, generado por la combinación de la enfermedad, los tratamientos y procedimientos instaurados, lo que contribuyen a un mayor riesgo de muerte y morbilidad, al

---

<sup>1</sup> Presión parcial de dióxido de carbono

incrementar la susceptibilidad a infecciones secundarias tales como neumonías asociadas a la ventilación mecánica (NAVM), infecciones urinarias asociadas a catéter vesical (ITU) y bacteriemias asociadas a catéteres venosos centrales (BAC). La bacteriemia puede progresar a cuadros como sepsis y/o shock séptico si la instauración del tratamiento antimicrobiano se retrasa o es inadecuado, principalmente en pacientes asistidos en unidades de cuidados intensivos (UCI), por lo que es fundamental conocer a los principales agentes etiológicos y su perfil de sensibilidad antimicrobiana.

### **1.3 Hemocultivo:**

El Hemocultivo (HC) es el cultivo microbiológico de una muestra de sangre extraída por venopunción en forma aséptica, que posteriormente se inocula en botellas conteniendo un medio de cultivo líquido enriquecido, que se incuba en las condiciones necesarias para detectar el crecimiento microbiano. En caso de que éste sea positivo, posteriormente se realizará la identificación y sensibilidad antimicrobiana.

El HC se considera una herramienta fundamental en el diagnóstico etiológico de sepsis, bacteriemia, meningitis, infecciones osteoarticulares agudas, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía grave que requiere internación, endocarditis, infecciones relacionadas a catéteres, marcapasos y prótesis vasculares, síndrome febril en pacientes inmunocomprometidos, fiebre de origen desconocido, peritonitis bacteriana espontánea, mediastinitis, absceso en órganos profundos y epiglotitis.

Dado que el HC permite el diagnóstico de muchas infecciones severas, es crítico optimizar las variables que afectan a su rendimiento [25], como la sensibilidad y la especificidad, es decir, la capacidad de detectar el agente causal de la infección y que éste sea el verdadero responsable de la misma, respectivamente.

Los parámetros relacionados a la sensibilidad del método son:

#### **1.3.1 El volumen de la muestra de sangre:**

En la botella del HC se indican los volúmenes mínimo y máximo de sangre permitido para que el método sea rentable (figura 1). La estandarización de los volúmenes se fundamenta en una relación definida entre el volumen de sangre a inocular y el volumen de caldo que contiene la botella. La muestra de sangre en el caldo se debe diluir, de manera que permita neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre y de los agentes del sistema inmune, que puedan estar presentes. A su vez, la muestra de sangre no debe diluirse más allá de lo necesario, dado que si la bacteria está presente, esto se traduce en una reducción del inóculo bacteriano, y cuanto menor es el inóculo, la positividad del HC se detectará más tardíamente. Respetar estas relaciones de volúmenes evita que se formen coágulos en el interior de la botella de HC, dado

que el caldo contiene una concentración definida de anticoagulante.

La estrategia para aumentar el volumen de sangre a cultivar, es aumentar el número de botellas de HC. Cuanto mayor es el número de botellas de HC, será mayor el volumen de sangre a estudiar y mayor la probabilidad de detectar la presencia de microorganismos. De ahí que para aumentar la sensibilidad diagnóstica del HC, se inocule más de una botella de HC, lo que se conoce como “set”. El set se obtiene cuando se realizan dos o más venopunciones diferentes y cada una de ellas se inocula en su respectiva botella de HC. **(Figura 1)**. Se denomina serie al conjunto de sets.



**Figura 1: Botellas de hemocultivo.** El par de botellas es lo que se conoce como “set” o muestra de Hemocultivo. Se observa la indicación del rango óptimo de volumen de sangre a inocular.

### 1.3.2 Utilizar un sistema automatizado de incubación y monitoreo continuo:

Los sistemas automatizados son incubadores provistos de un sensor, que mediante un *software*, indican si hay crecimiento bacteriano. Las botellas de HC, además de contener el medio de cultivo con nutrientes y anticoagulante, cuentan con un compuesto fluorescente llamado 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronida (MUG). Cuando las bacterias crecen en el medio de cultivo, producen CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> reacciona con el MUG para formar un producto fluorescente llamado 4-metilumbeliferil (MU). El sensor del instrumento BD BACTEC™ FX<sup>2</sup> (Becton Dickinson, USA), detecta la fluorescencia del MU. La cantidad de fluorescencia que se produce es proporcional a la cantidad de bacterias que crecen en el medio de cultivo. El computador asociado al equipo, relaciona las mediciones con índices y/o gráficas de crecimiento microbiano

<sup>2</sup> El equipo BD BACTEC™ FX mencionado en el ítem 1.3.2 corresponde al sistema disponible en el laboratorio donde se realizó el estudio.

que dan un aviso cuando la detección sobrepasa un punto de corte.

Entonces, utilizar sistemas automatizados aumenta la sensibilidad del método por su capacidad para detectar el crecimiento bacteriano cuando éste aún es incipiente.

### **1.3.3 Realizar la toma del HC previa al tratamiento antimicrobiano, o en su defecto en el momento previo a la nueva dosis:**

El inicio de la terapia antimicrobiana disminuye la carga bacteriana en el paciente y/o su viabilidad, lo que reduce significativamente la sensibilidad de los HC extraídos poco tiempo después de administrado el tratamiento; por lo tanto se tendrá menor posibilidad de detectar a la bacteria y no se podrá llegar al diagnóstico etiológico esperado.

### **1.3.4 Parámetro relacionado a la especificidad del método:**

El parámetro relacionado a la especificidad del método es fundamentalmente la toma de la muestra. La toma del HC se realiza mediante una venopunción para extraer sangre del torrente sanguíneo; ésta debe atravesar la piel, donde naturalmente, se encuentra la biota normal del paciente. Por eso, la preparación de la piel es un aspecto esencial si se quiere evitar la contaminación de los HC. Con una técnica aséptica correcta, el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3%. En general, se consideran contaminantes microorganismos como *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. y otros que forman parte de la microbiota de la piel, siempre que su presencia no se repita en más de una muestra por paciente [20].

Decimos que hay especificidad del HC cuando podemos garantizar que la bacteria que creció, es la bacteria que se encuentra en la circulación sanguínea y no la bacteria que ingresó como consecuencia de una inadecuada desinfección del área de venopunción y/o mal manejo de las botellas de HC luego de realizada la toma de la muestra. Por eso hay que tener presente que no siempre que un HC sea positivo significa que la bacteria es clínicamente relevante.

### **1.3.5 Criterios para la interpretación del HC.**

Cuando el microorganismo aislado corresponde a flora de la piel, es necesario diferenciar si se trata de una bacteriemia verdadera o de una contaminación; esto se logra al comparar el tipo de microorganismo que crece en cada una de las botellas del *set* de HC.

Es por esto que se establecen distintos criterios de interpretación de los resultados de un *set* de HC para decidir su relevancia clínica:

**1.3.5.1.a Relacionados al microorganismo aislado:** El microorganismo aislado no debe corresponder a la biota de la piel.

**1.3.5.1.b Relacionados al tiempo hasta un resultado positivo:** Las botellas que resultan positivas por contaminación, suelen contener un inóculo bacteriano bajo, y por lo general, el crecimiento bacteriano, se detecta luego de 24-48h de incubación. En estos casos, solo el 20% de las bacteriemias suelen ser verdaderas. En cambio, las botellas verdaderamente positivas suelen mostrar un inóculo elevado, lo que permite obtener una señal del crecimiento bacteriano en menos de 24h; situación que ocurre en el 70% de las bacteriemias verdaderas. Por lo tanto, un resultado positivo en menos de 24h indica un alto inóculo bacteriano inicial y una menor probabilidad de contaminación. Sin embargo, esta variable debe interpretarse en conjunto con otros factores, como el estado clínico del paciente, su enfermedad de base, etc, para determinar si se trata o no de una contaminación.

**1.3.5.1.c Relacionados con el número de botellas positivas:** Se considera bacteriemia verdadera cuando se aísla el mismo microorganismo en todas las botellas del *set*, o que al menos en una de ellas desarrolle un microorganismo indiscutible (ej: *Neisseria meningitidis*); en tales casos se puede decir que el microorganismo es clínicamente relevante.

**1.3.5.1.d Relacionados con el tipo de huésped:** Dar relevancia a los microorganismos identificados va a depender del contexto que presente el paciente. Un ejemplo muy común es el caso de pacientes inmunosuprimidos, o que se encuentran en tratamiento con corticoides, trasplantados, etc., ya que presentan un estado de debilidad inmunológica que permite que microorganismos poco o no virulentos, puedan tener un rol patógeno, y donde cualquier bacteria que llega a circulación sistémica puede ser clínicamente relevante.

Teniendo en cuenta los factores mencionados, podríamos considerar las siguientes definiciones:

#### **1.3.5.2.a Bacteriemia significativa:**

Aislamiento en el HC de gérmenes que siempre son considerados patógenos en pacientes con clínica compatible.

Aislamientos polimicrobianos de potenciales patógenos. Es el aislamiento de más de un germen, que se repiten en todas las botellas del *set*, en un mismo episodio de bacteriemia. Sin embargo, en la gran mayoría de las situaciones clínicas, la bacteriemia es ocasionada por un microorganismo único.

### 1.3.5.2.b HC contaminado:

-Una única botella del *set* de HC es positiva con un germen usualmente considerado contaminante y sin un foco relacionado o, con un potencial foco, pero sin clínica compatible.

-Una única botella del *set* positiva (dentro de las 48 h) con un germen usualmente considerado contaminante y sucesivos hemocultivos negativos [24].

## 1.4 La infección nosocomial

La infección nosocomial, es aquella infección adquirida durante la estancia en el hospital u otro centro sanitario, y que no estaba presente o en fase de incubación, en el momento del ingreso del paciente; suele manifestarse luego de las 48h de la hospitalización. También se incluyen aquellas que aparezcan después del alta y que estén relacionadas con la internación, así como las infecciones ocupacionales contraídas por el personal sanitario [18].

La infección nosocomial está relacionada a la problemática de la resistencia antimicrobiana, cuando se usan tratamientos antibióticos empíricos inapropiados, que resultan en un incremento de las infecciones por patógenos multirresistentes [13]. Los bacilos gram negativos son la principal causa de bacteriemia en pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs). Estos microorganismos pueden albergar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, lo que reduce las opciones terapéuticas disponibles. Un trabajo presentado en el “Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI)” por el Servicio Antimicrobianos y el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos-Red WHONET-Argentina, en 2022, señaló que los bacilos Gram negativos (BGN) más frecuentes causantes de bacteriemias son *Klebsiella pneumoniae* (KPN), *E.coli* (ECO) y *Pseudomonas aeruginosa* (PAE); de ellos KPN presentó un elevado porcentaje de aislados no sensibles (%NS) a las drogas de primera línea y fue la especie que tuvo el mayor porcentaje de fenotipo difícil de tratar (DTR), es decir, aislados resistentes a diferentes familias de antimicrobianos, y que por lo tanto, se asocian a infecciones para las que son muy escasas las opciones de tratamiento. En la epidemiología Nacional el 15% de los BGN aislados de bacteriemias presentaron un fenotipo DTR, lo que representa un gran desafío al momento de instaurar un tratamiento. El conocimiento de la epidemiología de las bacteriemias y las resistencias asociadas a los patógenos prevalentes, es fundamental para dimensionar el problema de la Resistencia Antimicrobiana (RAM) y para reforzar la necesidad de contar con estadísticas locales que guíen la elección del tratamiento empírico adecuado [21].

## 1.5 Mecanismos de resistencia de impacto clínico

El uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, ha contribuido a la aparición de mecanismos de resistencia [8]. Con los años las consecuencias del problema no han desaparecido. Por el contrario, se ha convertido en un problema a nivel mundial, favorecido por la propiedad de conjugación entre bacterias, mediante la cual los determinantes genéticos de la resistencia antibiótica puede ser traspasada de una bacteria hacia otra por medio de plásmidos, transposones o integrones, conocido como transferencia horizontal.

Los antibióticos beta-lactámicos ( $\beta$ -lactámicos) constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos, y son los más utilizados y prescritos a nivel clínico. Su actividad se centra en el anillo  $\beta$ -lactámico de su estructura química que, a lo largo de los años, fue sufriendo modificaciones con el fin de mejorar su espectro y acción terapéutica. Las bacterias, tanto las gram positivas como las gram negativas, cuentan en su pared celular con un componente estructural denominado peptidoglicano, que se sintetiza por la transpeptidación de cadenas de disacáridos repetidos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico formadas mediante un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 por medio de una reacción de transglicosilación. Ambas reacciones se llevan a cabo por proteínas de unión a penicilina (PBP). Es durante la reacción de transpeptidación que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos realizan su acción bactericida al funcionar como análogos de las cadenas sobre las que actúan las proteínas de unión a penicilina inhibiendo así la biosíntesis de la pared celular. También actúan activando autolisinas bacterianas endógenas que destruyen el peptidoglicano. La acción bactericida de estos antibióticos depende de que la bacteria se halle en fase de crecimiento celular, ya que este es el momento en que se sintetiza la pared bacteriana.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos abarcan a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Tienen un espectro de actividad antimicrobiana que comprende cocos gram positivos, *Enterobacterales*, entre otros microorganismos. Son los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de las infecciones producidas por BGN debido a su efectividad terapéutica, ya que cuentan con una buena biodisponibilidad, farmacocinética, son ecológicos, es decir que tienen menor presión de selección para facilitar la aparición de cepas resistentes, y además tienen menor costo. Esto propició su uso indiscriminado, y favoreció la emergencia de nuevas resistencias, sobre todo cuando se utilizaron tratamientos interrumpidos o a dosis inadecuadas.

La aparición de enzimas con capacidad de clivar el sitio activo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (por hidrólisis del enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico), llamadas “ $\beta$ -lactamasas”, principalmente codificadas en plásmidos [12], ha propiciado la diseminación de la resistencia a estos antibióticos.

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican en base a dos esquemas generales: la clasificación molecular de Ambler y el sistema de clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros [2].

El esquema de Ambler divide las  $\beta$ -lactamasas en cuatro clases principales (A a D). La base de este esquema de clasificación es la homología de las proteínas (aminoácidos), y no características fenotípicas. Las  $\beta$ -lactamasas de clases A, C y D son serino- $\beta$ -lactamasas, por presentar este aminoácido en su sitio activo; las enzimas de clase B se denominan metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), por tener dos átomos de  $Zn^{++}$  en su sitio activo.

La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros de grupos  $\beta$ -lactamasas se fundamenta en similitudes funcionales (sustrato y perfil de inhibidor); propone cuatro principales grupos y múltiples subgrupos.

### **1.5.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE):**

Son una familia de enzimas plasmídicas producidas por bacilos gramnegativos, que en su mayoría derivan de las  $\beta$ -lactamasas clásicas TEM<sup>3</sup> y SHV<sup>4</sup>, a partir de una serie de mutaciones puntuales que afectan a su centro activo [10]. Tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y cuarta generación (cefepima), y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenemes (imipenem, meropenem). Son sensibles a la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam y avibactam.

### **1.5.2 Carbapenemasas:**

Son  $\beta$ -lactamasas con un mayor espectro hidrolítico, que abarca a todos los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem). Los genes que las codifican están localizados en cromosomas y elementos genéticos móviles como los plásmidos o transposones, lo que favorece su rápida propagación y la frecuente transferencia de múltiples genes de resistencia a los antibióticos. El desarrollo de resistencias a los carbapenemes constituye uno de los escenarios más preocupantes dentro de las resistencias a antimicrobianos, al perderse la actividad de uno de los grupos con mayor espectro, sobre todo en infecciones severas causadas por bacilos productores de BLEE.

En muchas ocasiones las bacterias productoras de carbapenemasas, son también resistentes a múltiples antimicrobianos de otras familias como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y el cotrimoxazol, lo que reduce las opciones terapéuticas.

Las carbapenemasas de mayor prevalencia en clínica humana se agrupan en tres clases [2]:

---

<sup>3</sup> TEM en referencia a Temoniera nombre de la paciente en cuyo hemocultivo se aisló por primera vez una cepa *E. coli* productora de esta enzima.

<sup>4</sup> SHV en referencia a «*sulphydril variable*» que describe las propiedades bioquímicas de la enzima.

- ❖ **Clase A o serino enzimas:** principalmente enzimas del tipo KPC<sup>5</sup> (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Se inhiben con avibactam y ácido fenilborónico.
- ❖ **Clase B, o metalo-beta-lactamasas (MBL):** principalmente enzimas del tipo VIM<sup>5</sup> (*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*), IMP<sup>5</sup> (*imipenemase*) y NDM<sup>5</sup> (*New Delhi metallo-β-lactamase*). Se inhiben por quelantes del zinc, EDTA y ácido dipicolínico.
- ❖ **Clase D, oxacilinasas:** principalmente OXA-48<sup>5</sup> y derivadas (*oxacillinase-48 like variants*). Poseen serina en su sitio activo. Hasta el momento no se han encontrado inhibidores que en el antibiograma puedan señalar su presencia.

Por lo expuesto, una infección causada por BGN productores de BLEE y/o carbapenemasa suele convertirse en una urgencia infectológica, ya que con frecuencia se acompañan de resistencias a antimicrobianos no β-lactámicos, dejando escasas opciones terapéuticas. Dado que las bacterias contienen enzimas plasmídicas que pueden diseminarse y ser vehiculizadas hacia otros pacientes, finalizando en brotes hospitalarios, motivan la generación de estrategias para su vigilancia y contención a nivel nosocomial. Es por eso que esta resistencia se considera de gran impacto clínico y epidemiológico.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Impacto del COVID-19 sobre la Resistencia Antimicrobiana (RAM)**

El virus del SARS-CoV-2, se identificó por primera vez en diciembre del 2019 en Wuhan, China. El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS), declaró al brote del nuevo coronavirus como una pandemia, luego de que el número de personas infectadas por COVID-19 a nivel global, sumó 118.554 casos, y el número de muertes a 4.281, afectando hasta ese momento a 110 países. El 19 de marzo de 2020, se constató la propagación de casos del coronavirus COVID-19 a nivel global llegando a un total de 213.254 personas infectadas, 8.843 fallecidas y afectando a más de 158 países de diferentes continentes, habiendo llegando a nuestra región y a nuestro país en el mes de marzo del año 2020. Como consecuencia de la velocidad en el agravamiento de la situación epidemiológica a escala internacional, fue necesaria la adopción de medidas inmediatas para hacer frente a esta emergencia.

En Argentina, con el objetivo de proteger la salud pública, y en conformidad con el Decreto de Necesidad y Urgencia (DNU) N° 297/2020 se estableció como medida sanitaria el “aislamiento

---

<sup>5</sup> La nomenclatura empleada y sus siglas, hace referencia a la zona geográfica o al perfil de resistencia encontrado en el primer caso descrito de cada nueva enzima detectada.

social, preventivo y obligatorio” (ASPO), que tuvo un rol de vital importancia para mitigar el impacto sanitario del COVID-19, ya que no existía tratamiento antiviral efectivo que prevengiera el virus. Esta medida, que se prorrogó en el tiempo y se consideró necesaria en atención a la situación epidemiológica, dispuso que todas las personas permanecieran en sus residencias habituales y se abstuvieran de concurrir a sus lugares de trabajo, salvo el grupo de personas consideradas esenciales como los integrantes del sistema de salud. También se estableció la prohibición de circular por rutas, vías y espacios públicos, a fin de prevenir la diseminación y el contagio del virus COVID-19, según expresa el Boletín oficial de la República Argentina [30]. No obstante, la pandemia se extendió por aproximadamente tres años.

Durante la pandemia se documentó una creciente incidencia de las co-infecciones bacterianas en los pacientes con COVID-19 que ingresaron en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y mayores tasas de infección por bacterias nosocomiales multirresistentes [1,23], por lo que la OMS manifestó su preocupación por el agravamiento de la RAM en el contexto de la pandemia por COVID-19 [3]. Esto fue consecuencia de que en el inicio de la pandemia por COVID-19, se usaron esquemas empíricos de antibióticos de amplio espectro ante la sospecha de co-infecciones bacterianas. Sin embargo, muchos de estos esquemas carecían de validez, ya que al tratarse de una infección viral, el uso de antibióticos era innecesario, salvo en aquellos pacientes que presentaron una co-infección viral y bacteriana debidamente documentada. Al mismo tiempo en gran parte de la población se emplearon diferentes métodos para evitar contraer la infección del virus, usando desde antibióticos hasta antiparasitarios [6]. Las co-infecciones bacterianas asociadas a pacientes hospitalizados por infecciones virales respiratorias, están bien descritas en la literatura y se conoce que causan mayor morbilidad y mortalidad [7]. Entre los pacientes infectados con el virus de la gripe las bacteriemias se han asociado a una mortalidad cercana al 50%, en comparación con el 1,4% en pacientes con gripe sin bacteriemia [7]. Después de más de dos años del COVID-19, la amenaza de la resistencia a los antimicrobianos sigue presente y se convirtió en una amenaza aún más prominente, ya que los microorganismos continúan propagándose y desarrollando nuevos tipos de resistencia.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS**

#### **3.1 Justificación e importancia del tema seleccionado:**

Este trabajo pretende realizar un estudio observacional y retrospectivo del impacto de la pandemia por SARS-COV-2 (COVID-19) en relación a los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos en pacientes adultos internados en un hospital general de agudos. Se obtendrá información que ayudará a la eventual toma de decisiones a nivel clínico en la institución, y al conocimiento de la epidemiología local. Por eso, el análisis de los resultados beneficiará a los pacientes, al personal de salud y a la población local, permitiendo un abordaje terapéutico oportuno para los casos de bacteriemias.

#### **3.2 Hipótesis:**

La situación de emergencia sanitaria consecuente a la Pandemia COVID-19, favoreció el aumento de los porcentajes de resistencia bacteriana en los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos.

## **4. OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo es realizar un estudio comparativo de los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos documentados durante Marzo de 2017 a Diciembre de 2019 (Pre-pandemia) y Marzo 2020 a Diciembre 2022 (intra/Post-pandemia), en pacientes adultos, asistidos en un hospital general de agudos del conurbano bonaerense. En cada período se analizaron, las características clínicas y demográficas de los pacientes, el número de episodios de bacteriemia, los principales focos de infección, la prevalencia de especies documentadas por cultivo, su sensibilidad antimicrobiana y los eventos de resistencia en bacilos gram negativos causantes de bacteriemias.

### **4.1 Pregunta de investigación:**

A través de esta propuesta se pretende responder el siguiente interrogante:

¿Ha ocurrido un cambio en la epidemiología de las bacteriemias en cuanto a etiología y perfil de resistencia antimicrobiana luego de la pandemia COVID-19, en los pacientes adultos hospitalizados en el HIGA “Evita” de Lanús?

### **4.2 Fin de la Investigación:**

Como ya se expuso previamente este relevamiento permitirá poner en evidencia el impacto de la pandemia por SARS-COV-2 (COVID-19) en lo que respecta a los cambios en la prevalencia y en los perfiles de resistencia en los casos de bacteriemias por bacilos Gram negativos; permitirá aportar información que ayudará a la eventual toma de decisiones a nivel clínico y epidemiológico.

### **4.3 Referencias institucionales**

- (1) Universidad Nacional Arturo Jauretche. Instituto de Ciencias de la Salud (ICS)- Bioquímica
- (2) HIGA Evita de Lanús - Servicio de Laboratorio. Unidad de Microbiología.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y observacional de los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos en pacientes adultos internados en un hospital de agudos del conurbano bonaerense.

### **5.2 Procedimientos y herramientas para la recolección de datos**

Los datos de los pacientes se obtuvieron del sistema informático del laboratorio (HexaLIS-V4), y se completaron con la información disponible de los formularios de solicitud del Hemocultivo (HC), que diariamente se ingresan al sistema informático de Bacteriología (EpiCenter V7.00A/V6.91A, Becton Dickinson, USA). Los resultados de los HC se obtuvieron de los registros bacteriológicos; los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se extrajeron del Programa Whonet (V5.6; 2019, OPS, Washington. USA). La información obtenida se volcó en hojas de cálculo de Excel. Se diseñaron dos bases de datos: una que incluyó los episodios de bacteriemias durante marzo 2017 a diciembre 2019 (período pre-pandemia) y otra que incluyó el período comprendido desde marzo 2020 a diciembre 2022 (período intra y post-pandemia).

Los resultados del hisopado nasofaríngeo de los pacientes que tuvieron sospecha de Covid en los años 2020, 2021 y 2022 se obtuvieron del LIS del laboratorio. Esta información se volcó en una hoja de cálculo de Excel, y se la comparó con la base de datos que incluyó el período intra y post-pandemia a través del programa Python (versión 3.10.12. Biblioteca usadas: Pandas versión 1.5.3 y Numpy versión 1.23.5). De esta manera se localizaron los pacientes que coincidían en ambas bases de datos y se transcribieron los resultados como: Se detecta/ No se detecta genoma viral.

### **5.3 Obtención de los hemocultivos**

La obtención de hemocultivos (HC) se realizó por indicación médica, en pacientes con manifestaciones y signos clínicos que hicieran sospechar en bacteriemia, sepsis/ shock séptico, y fiebre de origen desconocido [25].

También ante la presencia de:

1. Infecciones focales (neumonía, meningitis, osteomielitis)
2. Pacientes añosos con deterioro (confusión mental, caídas frecuentes).

3. Insuficiencia renal y leucocitosis o alteración mental.
4. Inmunocomprometidos con insuficiencia respiratoria, renal o hepática.

#### 5.4 Momento de la extracción

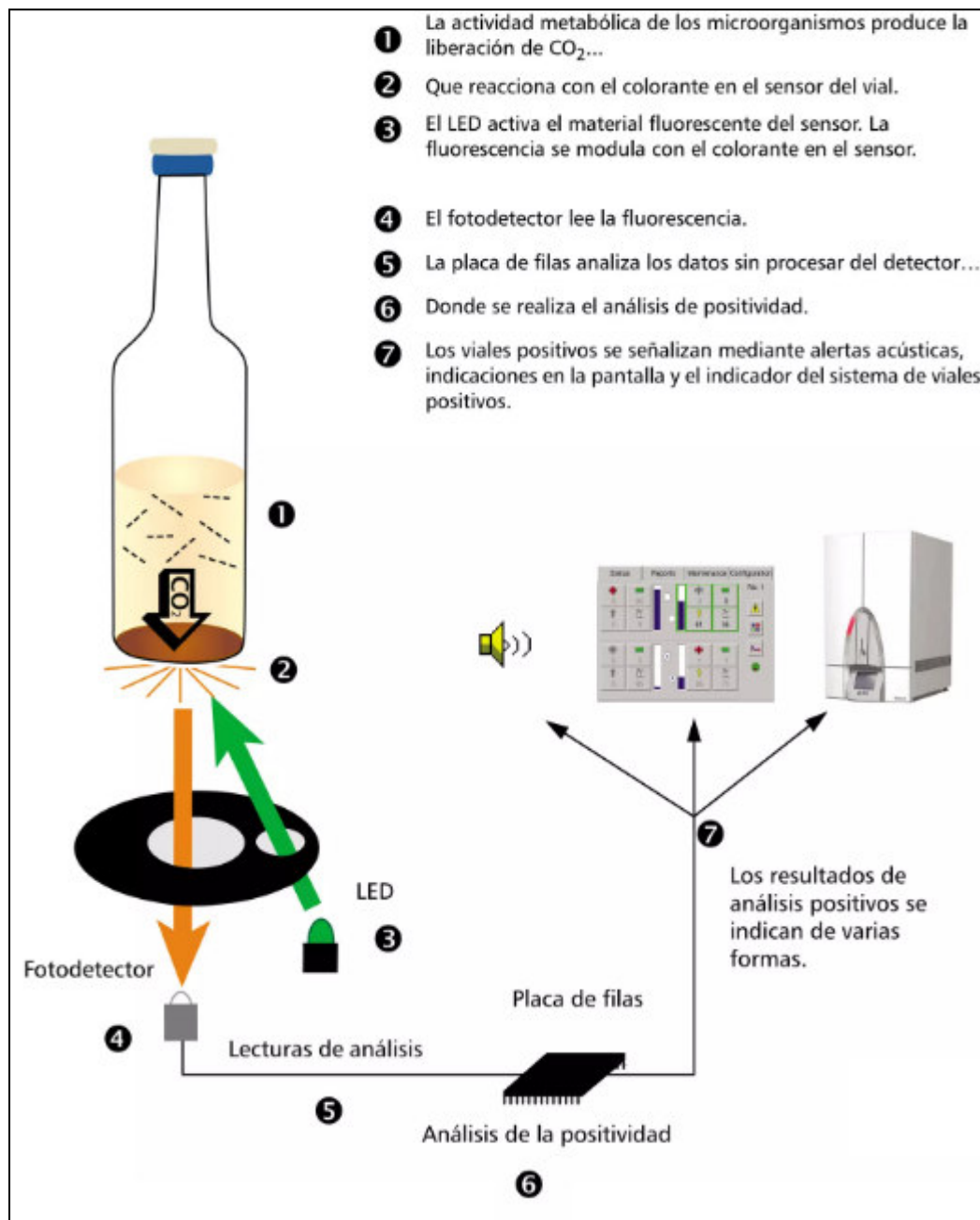
Se indicó realizar los HC lo más rápido posible en el curso de un episodio febril, previo a la administración del tratamiento antibiótico. En el caso de pacientes medicados, se recomendó realizar la toma de la muestra en el momento previo a la administración de la nueva dosis, donde la concentración en sangre es menor (valle del antimicrobiano).

#### 5.5 Incubación y procesamiento de los hemocultivos

La incubación de los frascos se realizó utilizando el sistema automatizado BD BACTEC™ FX (Ser. No. FT 3160) con tecnología de detección por fluorescencia. **(Figuras 2 y 3).**



**Figura 2:** Equipo automatizado BD BACTEC™ FX. La luz roja indica que hay botellas de HC positivas, mientras que la luz verde indica que hay botellas de HC negativas.



**Figura 3:** Principio de funcionamiento del sistema de hemocultivo automatizado BD BACTEC™ FX.

### 5.5.1 Procesamiento de los hemocultivos positivos

Las botellas de HC que dieron señal positiva, indicador del crecimiento microbiano, se retiraron del equipo, y se procesaron según el siguiente algoritmo de trabajo.

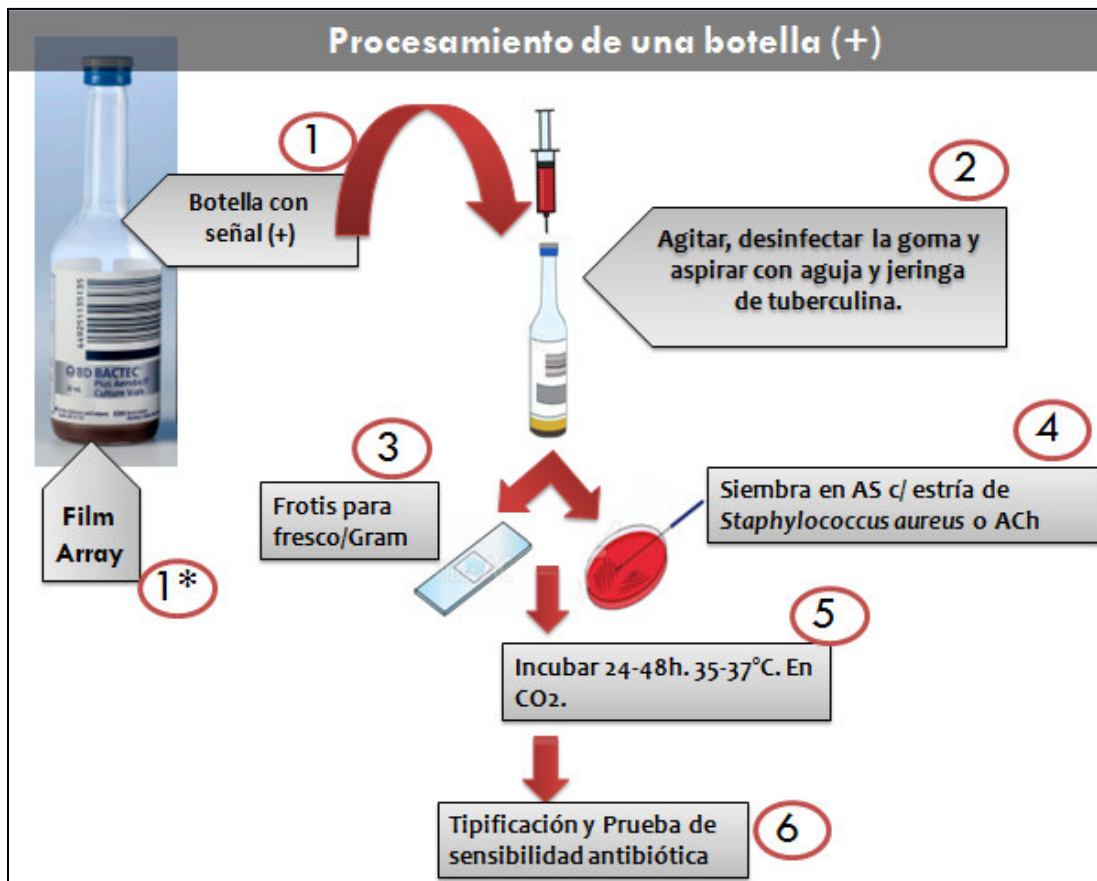
1. Se verificó la identidad de la botella positiva.
2. Se homogeneizó, desinfectó la goma, y se realizó la aspiración con aguja y jeringa de tuberculina.
3. Se colocó una gota del HC en un portaobjetos para realizar el examen en fresco/tinción con la técnica de Gram.
4. Se depositó una gota del HC sobre la superficie de una placa de Agar Sangre (Laboratorio Argentino, Argentina).
5. Con un ansa estéril se realizó la siembra por agotamiento en estrías.
6. Luego el origen de la siembra se enriqueció en sentido transversal con un estría de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que aporta NAD (Factor V).
7. Las placas de petri se incubaron durante 24-48h a 35-37°C en atmósfera 5-10% CO<sub>2</sub>.
8. Acorde a lo observado mediante la microscopía en fresco y/o la tinción de Gram, cada botella de HC fue además sub-cultivada en agar CLDE (Laboratorio Argentino, Argentina); Agar chocolate (BioMerieux, Brasil) o Agar CPS-ID3 (BioMerieux, Brasil), según se detalla:
  - a) Si se observaron bacilos gram negativos: Se sub-cultivó en Agar cromogénico, con incubación en aerobiosis a 35-37°C, durante 24h.
  - b) Si se observaron cocos gram positivos:
 

Para Cocos gram-positivos en acúmulos: se realizó la prueba de la coagulasa, se ensayó un disco de cefoxitina (Fox 30 µg; Laboratorio Britania, Argentina) por el método de difusión en agar Mueller Hinton (Laboratorio Argentino, Argentina) y se sub cultivó en agar CLDE, con incubación en aerobiosis a 35-37°C, durante 24-48hs.

Para Cocos gram-positivos en cadenas: se realizó la prueba de la Bilis esculina y se sub cultivó en agar CLDE, con incubación en aerobiosis a 35-37°C, hasta 24-48h.

Estas técnicas ayudan a orientar los procedimientos a seguir y realizar un informe preliminar, muy útil en la práctica clínica, ya que dicha información aporta una primera aproximación sobre la etiología de la infección [22].

El procedimiento se resume en la **figura 4**.



**Figura 4:** Procesamiento de una botella de HC positiva.

## 5.6 Identificación bacteriana y sensibilidad antimicrobiana por métodos fenotípicos

### 5.6.1 Identificación bacteriana:

La identificación bacteriana a nivel de género y especie de los aislados se realizó con el sistema automatizado Phoenix® (Phoenix® 2.20.0./V6,91A, Becton Dickinson, USA). (**Figura 5**).



**Figura 5: Equipo automatizado Phoenix®.**

Inicialmente se preparó un inóculo bacteriano con una turbidez de 0,5 de Mc Farland (MF), a partir del desarrollo de colonias puras en las placas de subcultivo o de la pátina de crecimiento (crecimiento bacteriano observado a partir de las 3h del subcultivo). Con este inóculo se realizó el procedimiento según las instrucciones del fabricante.

En el caso de ser necesario, se incorporaron las siguientes pruebas manuales de identificación para *Enterobacterales*:

**Triple Sugar Iron (T.S.I.):** empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa) y a la producción de ácido sulfhídrico.

**Citrato de Simmons:** utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

**Sulfuro de Hidrógeno - Indol - Movilidad (SIM):** destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno.

**Lisina Iron (LIA):** utilizado para diferenciar microorganismos, basado en la descarboxilación y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

**Motilidad – Indol – Ornitina (MIO):** utilizado en la identificación de miembros de la familia *Enterobacterales* en base a la movilidad, producción de indol y capacidad de descarboxilar ornitina.

**DNAsa:** utilizado para la detección de la enzima desoxirribonucleasa. Es útil para la diferenciación de *Serratia* spp. de especies de *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp.

### 5.6.2 Sensibilidad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CIM) de los aislados se realizó con el sistema automatizado Phoenix®, que ofrece paneles “combos” NMIC/ID (siglas de gram Negativo [N], CIM [MIC], e Identificación [ID]) para realizar en simultáneo la identificación bacteriana y la CIM verdadera de cada aislado frente a una gran variedad de antimicrobianos. (Figura 6).



**Figura 6:** Paneles “combo” de identificación y sensibilidad BD Phoenix®.

Los paneles empleados fueron: NMIC/ID-406, NMIC/ID-504 y NMIC/ID-501, según disponibilidad en el laboratorio. A continuación se mencionan los antimicrobianos ensayados y sus siglas [31]:

**Aminoglucósidos:** Amicacina (AN); Gentamicina (GM)

**Antagonista de folato:** Trimetoprima-sulfametoxazol (SXT)

**Beta-lactámicos:** Amoxicilina (AM); Amoxicilina-Ác. clavulánico (AMC); Ampicilina-Sulbactam (SAM); Aztreonam (ATM); Cefpiroma (CPO); Ceftazidima (CAZ); Ceftazidima-Avibactam (CZA); Ceftriaxona (CRO); Cefuroxima (CXM); Cefepime (FEP); Cefazolina (CZ); Cefoxitina (FOX); Ceftolozano-Tazobactam (CT), Ertapenem (ETP); Imipenem (IMI); Meropenem (MEM); Piperacilina-Tazobactam (TZP)

**Fosfomicina (FF)**

**Gliciliclina:** Tigeciclina (TGC)

**Nitrofurano:** Nitrofurantoína (FM)

**Péptido cíclico:** Colistín (CL)

**Quinolonas:** Ciprofloxacina (CIP); Levofloxacina (LVX); Norfloxacina (NOR)

**Tetraciclinas:** Tetraciclina (TE); Minociclina (MI)

Los antimicrobianos no incluidos en los paneles Phoenix® de acuerdo al diseño de los mismos, (fosfomicina, nitrofurantoína, ceftazidima/aztreonam, ceftolozano/tazobactam, aztreonam, tigeciclina, o minociclina), se ensayaron por el método de Kirby-Bauer, que evalúa la difusión en agar Mueller Hinton (MH) de discos de papel impregnados con el antimicrobiano en estudio. La sensibilidad a colistín se realizó por el método “col-Drop”<sup>11</sup>. La interpretación de las pruebas de sensibilidad se realizó de acuerdo a recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) vigente en el momento del ensayo [5] y con los criterios de la FDA y/o del Instituto Nacional de Referencia Instituto Malbrán (LNR) para el caso de Tigeciclina, Fosfomicina y CZA.

El sistema Phoenix contiene un software con reglas de expertos diseñadas de modo que permite determinar la producción de BLEE y/o carbapenemasas del aislado en estudio. Cuando este resultado no estuvo disponible o cuando fue sospechado de acuerdo al punto de corte (PC) o al perfil de Sensibilidad/Resistencia (S/R), se usaron pruebas adicionales para su confirmación.

## 5.7 Confirmación de la producción de BLEE

### 5.7.1 Sinergia de inhibición

Para detectar aislamientos productores de BLEE se utilizó el método de difusión en agar MH (Laboratorio Argentino, Argentina), basado en la sinergia que se produce por la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa por ácido clavulánico [9].

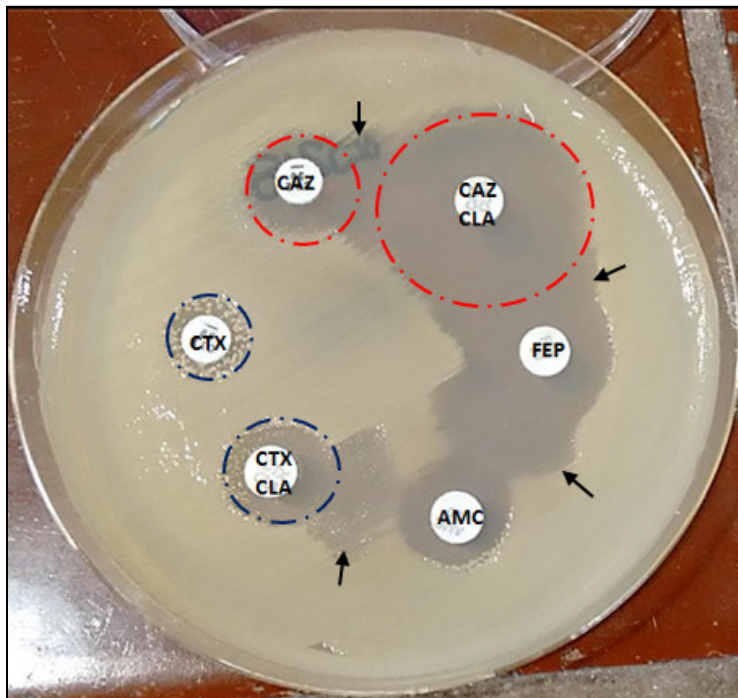
Las placas de agar MH fueron inoculadas con las cepas sospechosas, con una turbidez 0,5 MF.

Se colocó un disco de amoxicilina/ácido clavulánico ([AMC] 30  $\mu$ g) entre un disco de cefotaxima ([CTX];30  $\mu$ g) y ceftazidima ([CAZ];30  $\mu$ g); y entre cefepime ([FEP];(30  $\mu$ g) y aztreonam ([ATM]; 30  $\mu$ g) a una distancia de 25 a 30 mm entre los centros de los discos.

La observación de la distorsión de los halos de inhibición sobre los halos de ceftazidima, cefotaxima, aztreonam y cefepime, por acción del ácido clavulánico (inhibidor de la enzima), es indicativo de la presencia de BLEE. (**Figura 7**)

### 5.7.2 Diferencia del halo en la combinación con inhibidores

Otro método para confirmar la producción de BLEE es medir la diferencia de la medida en mm, de los halos de difusión entre CAZ y ceftazidima con ácido clavulánico (CAZ/CLA 30/10  $\mu\text{g}$ ) y entre CTX y cefotaxima con ácido clavulánico (CTX/CLA 30/10  $\mu\text{g}$ ). Una diferencia del halo de inhibición  $\geq 5$  mm, es indicativo de la presencia de BLEE [19]. (**Figura 7**).



Referencias: CAZ: Ceftazidima, CAZ/CLA: ceftazidima con ácido clavulánico, FEP: cefepima, CTX:cefotaxima, CTX/CLA: cefotaxima con ácido clavulánico, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico.

**Figura 7: Expresión del fenotipo BLEE positivo.** Se observa la aparición de zonas de inhibición agrandadas o distorsionadas (flechas), producto del efecto sinérgico inhibitorio de la  $\beta$ -lactamasa por acción del ácido clavulánico. Con el método del disco combinado (círculos rojo y azul), se evidencia una diferencia en el tamaño del halo de inhibición  $\geq 5$ mm, a favor del disco de la cefalosporina con el ácido clavulánico, que se consideran confirmatorios para la producción de BLEE.

### 5.8 Confirmación de la producción de Carbapenemasa

Los criterios de sospecha de un aislado productor de carbapenemasas en *Enterobacterales* (EB) son: un aumento en la CIM a los carbapenémicos o una disminución en el diámetro de la zona de

inhibición. Se tuvieron las pautas de alarmas recomendadas por el LNR, de acuerdo a la metodología disponible en el laboratorio local.

#### **Sistema Phoenix:**

- CIM a IMI  $\geq 2$  g/l;
- *Proteus* spp. MER  $\geq 2$  g/l.

#### **Metodología de difusión en disco:**

- IMI  $\leq 22$  mm o  $\geq 2$  g/l; para las enterobacterias en general
- *Salmonella* spp. IMI  $\leq 24$  mm;
- *Proteus* spp. MER  $\leq 22$  mm o  $\geq 2$  g/l, debido a que las cepas salvajes tienen sensibilidad disminuida a IMI.

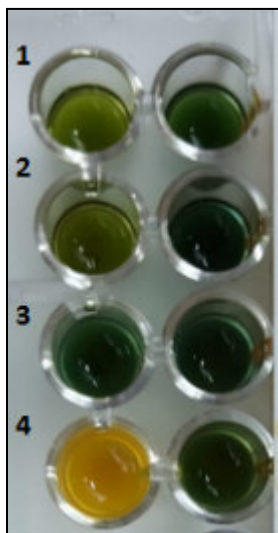
Frente a estos resultados, se realizó la confirmación de producción de carbapenemasas [11].

### **5.8.1 Métodos confirmatorios:**

#### **5.8.1.a Método colorimétrico**

Inicialmente se realizó un *test* colorimétrico rápido (2 horas), denominado *Blue Carba test* (BCt). Se basa en preparar dos suspensiones de la bacteria en estudio en una solución de azul de bromotimol (0,04%) con el agregado de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  (0,1 mmol/l) a pH 7 (color inicial azul). A una de ellas se le agrega IMI (punta de espátula), mientras que la otra sirve como control del ensayo.

Una vez realizadas las suspensiones, se incuban a 37°C. Si la cepa en estudio es portadora de una carbapenemasa, romperá el IMI dando un derivado ácido que causará un descenso de pH, y la suspensión bacteriana virará al verde claro/amarillo, mientras que el tubo control no cambiará de color. (**Figura 8**). (El BCt puede realizarse en policubetas o en tubos Eppendorf).



**Figura 8: Resultados de la prueba BCt obtenidos de 4 aislados en estudio (hilera izquierda):** 1,2,3: negativos; 4: positivo. Se puede observar la diferencia de colores respecto de cada pocillo control (hilera derecha).

Este test tiene una buena especificidad y sensibilidad, aunque puede dar un resultado negativo en carbapenemasa de bajo nivel de expresión (enzimas OXA-48 y derivadas) [15,19].

Su principal fortaleza es que da un resultado entre los 10 a 120 minutos desde su realización. Como desventajas, no diferencia el tipo de enzima presente, no discrimina si hay más de un tipo de carbapenemasa, y requiere un estricto control del pH de la solución de trabajo.

Un BCt (+) indica la presencia de Carbapenemasa, pero un resultado negativo puede obligar a emplear otras estrategias para confirmar la presunción.

#### **5.8.1.b Métodos basados en la inhibición de la enzima**

Para la diferenciación del tipo de carbapenemasa, se utilizó el método de difusión en agar MH, basado en la sinergia que se genera por la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa por ácido fenilborónico y/o el EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) [4].

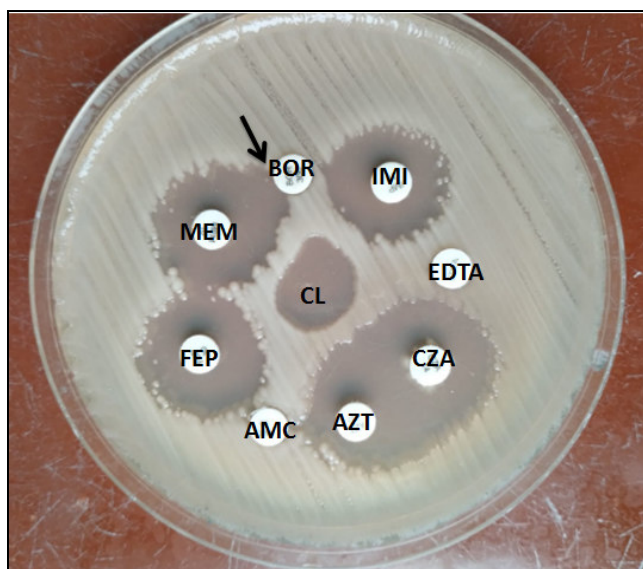
Las placas de agar MH se inocularon con un inóculo 0,5 MF de la cepa en estudio. Se colocó un disco de ácido borónico (BOR 300  $\mu$ g, Laboratorio Britania, Argentina) inhibidor de las serinoenzimas, entre los discos de IMI (10 $\mu$ g) y MEM (10 $\mu$ g). (**Figura 9**). También se colocó un disco de EDTA/SMA (372 $\mu$ g de EDTA, más 900 $\mu$ g de Mercaptoacetato de sodio; Laboratorio Britania, Argentina) inhibidor de las MBL, entre ambos carbapenemes. La prueba se considera

positiva al demostrar la deformación del halo de inhibición en relación a los respectivos inhibidores. (**Figura 10**).

Debido a la reciente circulación de EB doble productores de carbapenemasas [26] se propone como método de detección el ensayo de un disco de BOR enfrentado a un disco de AZT (30 µg) a una distancia de 10 mm entre los centros de cada disco, y en simultáneo un disco de EDTA separado 15 mm del centro de un disco de CZA (10/4 µg) entre los que se evaluará la aparición de un efecto sinérgico, indicativo de KPC y/o MBL, respectivamente (Recomendación del LNR).

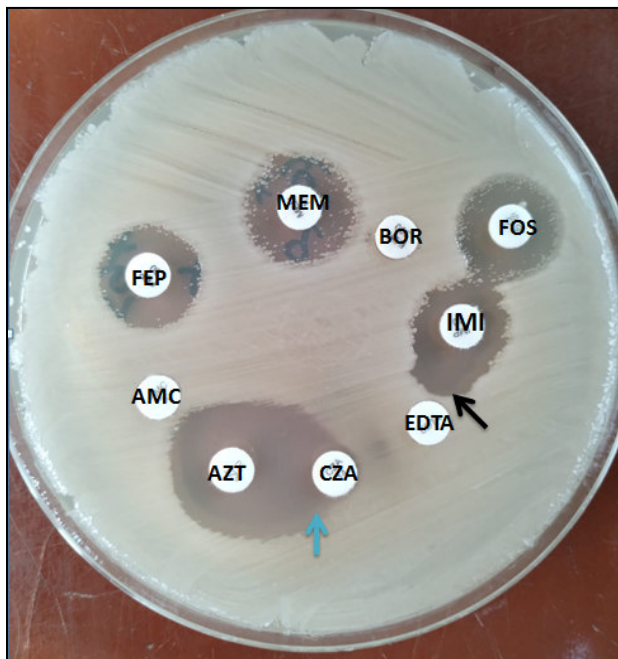
Estos métodos tienen como ventaja que permite diferenciar el tipo de carbapenemasa involucrada, y aprovecha el inóculo de trabajo inicial del aislado, por lo que se puede realizar en simultáneo al estudio de la identificación y la sensibilidad antimicrobiana, y es de bajo costo.

Tiene como desventaja que el resultado está disponible luego de 18-24h de incubación; no permite detectar carbapenemasas de la familia OXA-48 y derivadas, dado que aún no se conocen inhibidores eficaces para ello [26].



**Referencias:** EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, CZA: ceftazidima-avibactam, AZT: aztreonam, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, FEP: cefepima, MEM: meropenem, BOR: ácido borónico, IMI: imipenem, gota de la solución con colistina (CL) en el centro.

**Figura 9: Expresión del fenotipo serin-carbapenemasa positivo.** Se observa el efecto sinérgico de inhibición de la enzima por acción del ácido fenilborónico (flecha negra).



**Figura 10: Expresión del fenotipo metalo- $\beta$ -lactamasa positivo.** Se observa el efecto sinérgico por inhibición de la MBL por acción del EDTA (flecha negra). CZA resistente hace sospechar su presencia (flecha celeste).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* dado que según los datos de la red de vigilancia nacional coordinada por el LNR, la producción de carbapenemasas es muy baja, se estableció el criterio de sospecha en función de los resultados de CZA y CT con BCt (+), en aislados resistentes a IMI. Los que deberán ser posteriormente confirmados.

En el caso de *Acinetobacter* spp, la señal de alarma es un resultado positivo de BCt en los 60 minutos de realizado. Los que deberán ser posteriormente confirmados. En *Acinetobacter* spp., debido a la gran cantidad de aislamientos extremadamente resistentes, es muy difícil diferenciar la resistencia a carbapenemes causada por la hiper-producción de carbapenemasas del tipo OXA (mecanismo más frecuente) de la resistencia debido a metalocarbapenemasas del tipo NDM. Este último mecanismo, por su gran capacidad de diseminación inter e intraespecies, debe ser detectado e informado oportunamente para evitar su diseminación. De ahí la importancia del BCt.

### 5.8.1.c Métodos cromatográficos

Otra metodología disponible para diferenciar el tipo de carbapenemasa, son las pruebas inmunocromatográficas.

Consisten en un inmunoensayo cualitativo de flujo lateral a través de una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos monoclonales para la detección y diferenciación de las cinco familias de carbapenemasas más prevalentes (NDM, IMP, VIM, OXA-48 y KPC) y sus variantes clínicamente más relevantes. (**Figura 11**).

Partiendo del desarrollo bacteriano puro o desde la pátina o del subcultivo en agar, se realizó una suspensión del aislado en la solución *buffer* provista por el equipo (NG-Test® CARBA-5; Ng Biotech, Francia); luego de 10-15 min se dispensa en el punto de siembra del *cassette*.

La zona del conjugado, está formada por anticuerpos monoclonales contra epitopes del antígeno a detectar conjugado a un reactivo de detección que contiene oro coloidal en nanoesferas. Aquí se iniciarán interacciones específicas que continuarán durante el proceso inmunocromatográfico. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune antígeno-anticuerpo y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

La zona de captura (K-O-V-I-N) está formada por anticuerpos monoclonales inmovilizados anti-KPC, anti-OXA-48, anti-VIM, anti-IMP, anti-NDM. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y el anticuerpo conjugado con partículas de oro coloidal quedarán retenidos y las líneas (de acuerdo a la/las enzimas presentes) se tornarán color rojo, lo cual evidencia un resultado reactivo de la prueba. La intensidad del color en la línea de prueba corresponde a la cantidad de antígeno objetivo y se inspecciona visualmente. Independientemente de la presencia del antígeno en la muestra, se deberá formar una línea roja en la línea del control (C), lo que da validez a la prueba, esto se debe a que en esta zona se encuentran inmovilizados anticuerpos monoclonales anti-anticuerpo conjugado al reactivo de detección.

Este método tiene como ventaja su alta sensibilidad y especificidad que se compara con la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), detecta en un sólo ensayo las 5 enzimas más frecuentes en clínica, ofrece resultados en 15 minutos (en promedio) y puede detectar aislados productores de más de un tipo de carbapenemasa.

Como desventaja es su alto costo, por eso se lo usa como un método confirmatorio y principalmente para detectar las enzimas de tipo OXA, ya que a la fecha no se conocen inhibidores de la misma. No aplica para especies de *Acinetobacter* spp. El test puede dar falso negativo en aislados portadores de variantes alélicas no presentes en el diseño de la prueba.



a)

b)

**Figura 11: Inmunoensayo NG-Test® CARBA-5.** Se observan resultados positivos para a) KPC (línea K); b) KPC y NDM (líneas K y N). La C corresponde al control interno del ensayo.

## 5.9 Otros metodologías ensayadas en aislados multirresistentes

### 5.9.1 Predifusión

En los casos de aislados multirresistentes se testaron otros antimicrobianos para indagar las posibles opciones terapéuticas. Es sabido que en los aislados productores de BLEE y MBL el uso “*in-vivo*” del tratamiento combinado de ceftazidima/avibactam (CZA) y aztreonam (AZT) es la alternativa recomendada. A la fecha no hay discos que contengan esa combinación de drogas para su ensayo “*in-vitro*”, por lo que una prueba sugerida y validada por el LNR es el ensayo de predifusión [16,27].

El ensayo se realizó sobre una placa de agar MH previamente hisopada con una suspensión 0,5 MF de la cepa en estudio. Se colocó un disco de CZA (10/4 µg) quedando en contacto durante 15 minutos, a temperatura ambiente, tiempo durante el cual la droga presente en el disco de papel “pre-difunde” e interactúa con la cepa en estudio. El CAZ/AVI incluye la combinación de

ceftazidima más avibactam, éste último como inhibidor de las serinoenzimas, pero sin actividad frente a las MBL. Luego se retiró el disco de CAZ/AVI y en el mismo lugar se colocó un disco de AZT(30 µg), completando la incubación durante 18 a 24h a 37°C. El AZT es un monobactam que es afectado por las BLEE y carbapenemasas tipo KPC, pero no por las MBL. Entonces un aislado productor de BLEE y MBL aplica a ser tratado por esta combinación. Esto ocurre porque el AVI de la combinación CAZ/AVI inhibe la BLEE del aislado, protegiendo al AZT, que actuaría contra la MBL ya que no es sustrato de la enzima.

Interpretación:

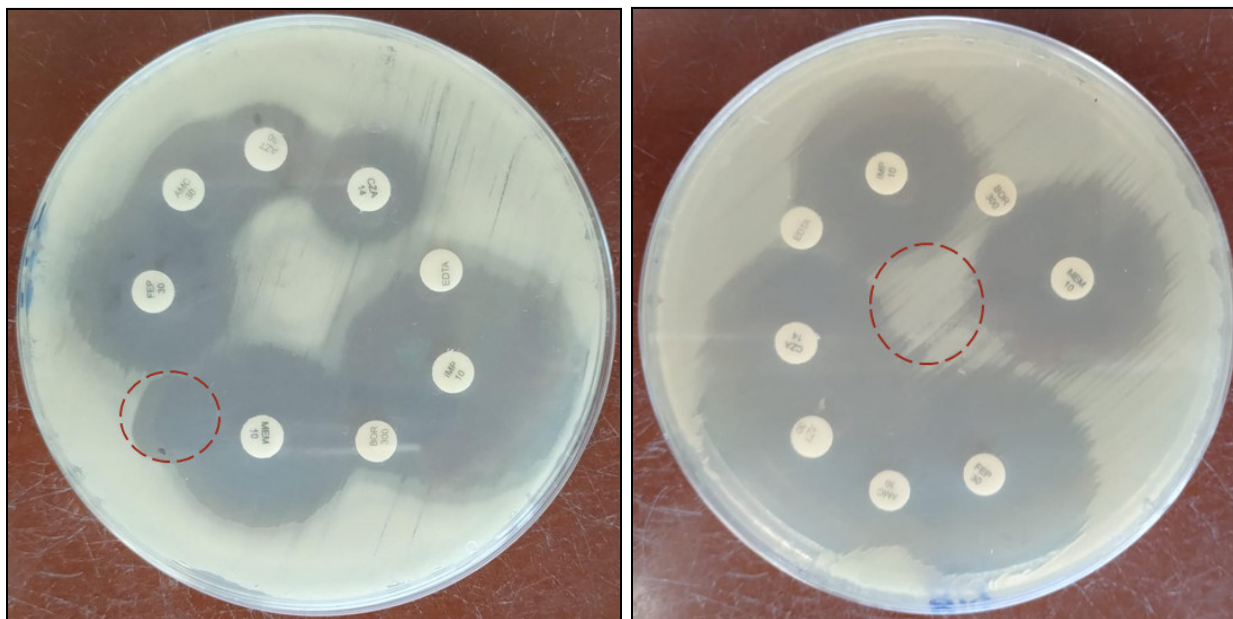
- ❖ **Halo de inhibición  $\geq 17$  mm, se correlaciona con un valor de CIM  $\leq 1$  µg/mL:** se interpreta un aislado “salvaje” es decir sin el mecanismo de resistencia, siendo potencialmente útil esta combinación terapéutica.
- ❖ **Halo de inhibición  $\leq 15$  mm, se correlaciona con un valor de CIM  $>1$  µg/mL:** se interpreta que “*in-vitro*” no se puede predecir la utilidad de esta combinación terapéutica.
- ❖ **Halo de inhibición de 16 mm:** se sugiere realizar la investigación de enzimas de tipo OXA. (OXA-163).

### 5.9.2 Col-Drop Test

Otro antimicrobiano de uso clínico en aislados multirresistentes es colistín (CL), donde la estrategia fue testear la sensibilidad a CL a través del método denominado *Col-Drop Test* [21] que surgió como alternativa, validada por las normas del CLSI, dado que con los métodos disponibles (difusión y Phoenix) se detectaron errores *very mayor* en el antibiograma, es decir falsos resultados de sensibilidad [28].

La prueba consiste en colocar sobre la placa de Agar MH hisopada con un inóculo 0,5 MF de la cepa en estudio, una gota (10 µl) de una solución de CL, preparada por la elución de 8 discos de 10 µg de CL en 5 ml de caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ .

- ❖ **Colistín sensible:** ausencia de crecimiento bacteriano en el área de descarga del CL. (**Figura 12a**).
- ❖ **Colistín resistente:** desarrollo de colonias dentro del área de descarga del antimicrobiano visibles como pátina, crecimiento confluyente o colonias aisladas. (**Figura 12b**).



a)

b)

**Figura 12: Col-Drop Test.** Ejemplos de aislados: SENSIBLE (a-ausencia de crecimiento) y RESISTENTE a colistín (b-desarrollo bacteriano). El círculo indica el punto de inoculación del antimicrobiano.

## 5.10 Identificación bacteriana y detección de genes de resistencia por métodos genotípicos.

### 5.10.1 Técnica diseñada para el diagnóstico etiológico directamente de hemocultivos positivos:

Para el caso de pacientes críticos en los que se detectó por microscopía la presencia de BGN en las dos botellas del *set* de HC, se realizaron métodos moleculares directamente de las botellas, previo al subcultivo. Tiene como ventaja acelerar la identificación del microorganismo y los genes asociados a resistencia al no requerir el cultivo [22]

El Sistema FilmArray® (**Figura 13**), en su panel BioFire BCID2® FilmArray® (*Blood Culture Identification 2 (BCD2) Panel v1.0*, Ser. No. 78285904, Lote No. 2V9U23, Bio Fire, Francia) está diseñado para detectar 43 objetivos asociados con infecciones del torrente sanguíneo, incluidas 15 bacterias gram negativas (Complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacterias*, Complejo *enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, Grupo *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomona maltophilia*), 11 bacterias gram positivas

(*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), 7 levaduras (*Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus* (*C. neoformans*/*C. gattii*)) y 10 genes de resistencia a los antimicrobianos, (CTX-M, KPC, IMP, NDM, VIM, OXA-48-like, mcr-1, mecA/C, MREJ (MRSA), vanA/B), todo con una sola prueba y con resultados disponibles en aproximadamente una hora a partir de un HC positivo.

La PCR multiplex anidada primero amplifica una región de ADN que contiene el segmento diana; después este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR que tiene lugar en una matriz con pocillos que contienen los cebadores de los diferentes ensayos. Las reacciones de PCR Film Array contienen el fluorocromo de unión al ADN LCGreen® Plus (BioFire Diagnostics) que se incorpora a las copias de ADN a medida que se generan durante cada ciclo de PCR. Cuando se une al ADN bicatenario, el colorante emite fluorescencia y el instrumento Film Array lo detecta. A medida que aumenta la temperatura y las copias de DNA bicatenario se desnaturalizan se libera el colorante LCGreen Plus y se detecta una reducción de la fluorescencia. Las copias de ADN bicatenario generadas durante la PCR (productos de PCR o amplicón) tienen secuencias únicas basadas en el segmento diana que se amplificó. La longitud y la secuencia del amplicón determinan la temperatura a la que se desnaturaliza el DNA bicatenario, lo que se conoce como temperatura de fusión ( $T_m$ ) del amplicón. Los productos de PCR elaborados a partir de diferentes dianas tendrán diferentes secuencias y por lo tanto diferentes  $T_m$ s. Finalmente, el instrumento evalúa la curva de fusión del ADN. Dado que la secuencias y la  $T_m$  de un amplicón de un objetivo específico son conocidas se puede identificar el producto de PCR específico del patógeno/s. Se excluyen los productos de PCR no específicos con diferentes  $T_m$ s [22, 29].

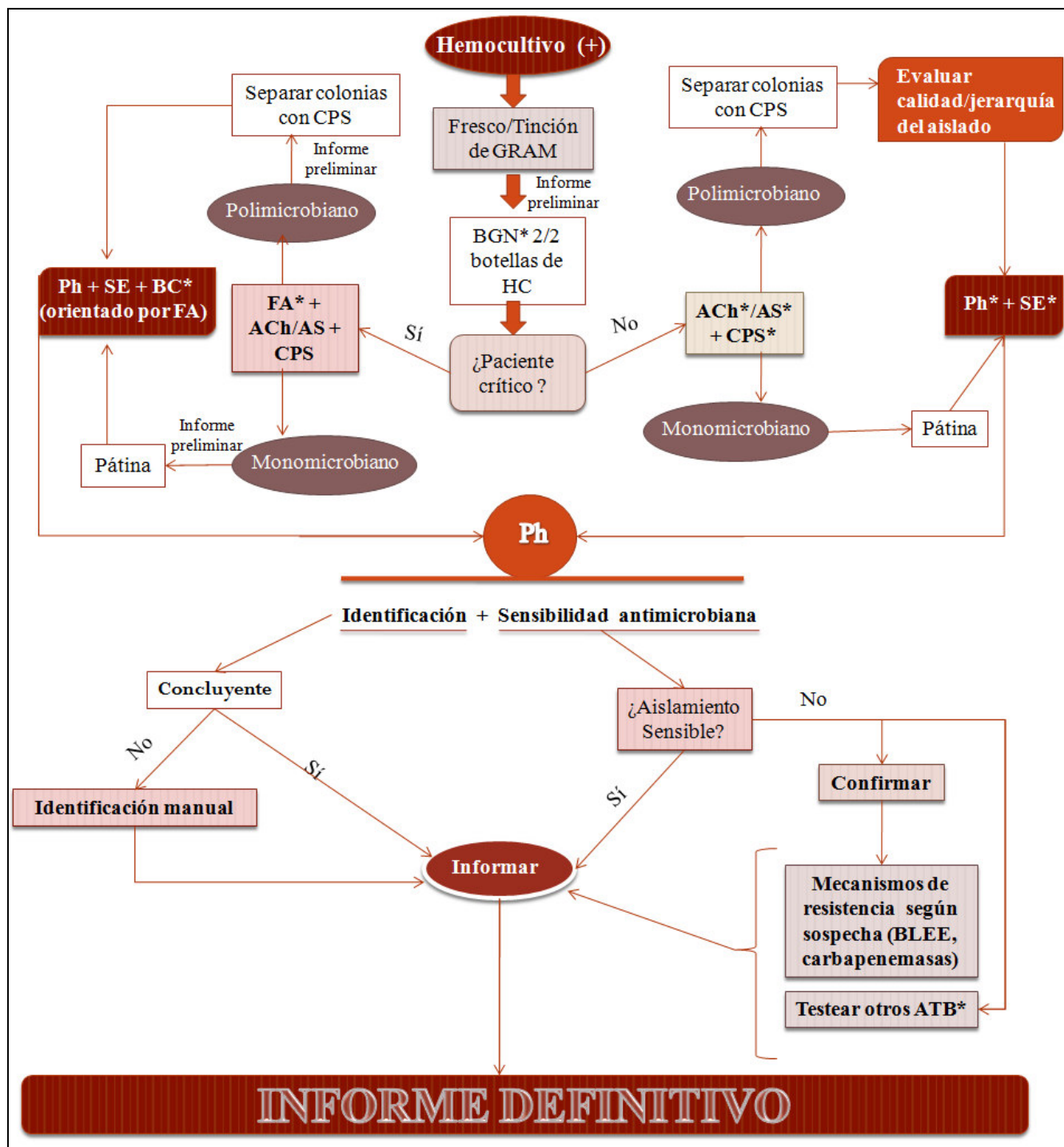
Su principal ventaja es la rapidez del resultado. El método tiene como limitante: no detecta dianas diferentes de las presentes en la plataforma, no determina el perfil de sensibilidad antibiótica, es una determinación de alto costo, realiza un sólo ensayo a la vez, aunque puede acoplarse en lugares de alta demanda de test simultáneos.



**Figura 13: Sistema de PCR multiplex FilmArray™.**

A partir de lo expuesto se pone de manifiesto, que en función de los recursos disponibles al momento de procesar la muestra y teniendo en cuenta un criterio algorítmico de decisiones, se deben emplear varias metodologías de manera simultánea a fin de llegar a un resultado rápido y oportuno, en un paciente crítico.

El algoritmo de trabajo en el laboratorio de Bacteriología se detalla en la **Figura 14:**



\*BGN: bacilos gram negativos; ACh: agar chocolate; AS: agar sangre; CPS: Medio cromogénico; Ph: Phoenix; SE: sinergia extendida; FA: Film Array; BCt: Blue carba. En los HC polimicrobianos se evalúa si este hallazgo es clínicamente relevante en conjunto con el cuerpo médico.

**Figura 14:** Flujo de decisiones.

## 5.11 Población

Pacientes adultos hospitalizados en el HIGA “Evita” de Lanús en quienes se sospechó un cuadro de bacteriemia/sepsis, y el médico tratante solicitó realizar el diagnóstico etiológico mediante la toma de hemocultivos. Se incluyeron los pacientes en cuyos hemocultivos se identificaron bacilos gram negativos.

**Criterio de exclusión:** se excluyeron del análisis las muestras solicitadas para control de tratamiento y aquellas provenientes de niños y neonatos.

### 5.11.1 Variables

**Variables a relevar de los pacientes:** se registraron los datos demográficos, (edad y sexo), comorbilidad/enfermedad de base, posible foco de bacteriemia, servicio de internación, *status* COVID. Cada paciente fue codificado con un código alfanumérico a fin de garantizar la confidencialidad de la información.

**Variables a relevar de las muestras de HC:** se recopilaron los resultados de los estudios microbiológicos: (HC contaminado, negativo o con microorganismo jerarquizado, sensibilidad antimicrobiana, mecanismo de resistencia).

## 5.12 Análisis estadístico

Las medidas de frecuencia y dispersión que fueron empleadas para variables cuantitativas son la media y el desviación estándar (distribución normal), o mediana e intervalo intercuartílico, si no presentaron distribución normal. Las medidas de frecuencia que fueron empleadas para variables cualitativas son frecuencia absoluta y porcentaje. Para la comparación de variables categóricas entre los dos grupos se confeccionaron tablas de contingencia; como prueba de hipótesis se usaron el test de Chi cuadrado ( $X^2$ ) o el Test de Fischer, dependiendo del n muestral. Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó el test de no paramétrico Wilcoxon U de Mann-Whitney. La medida de asociación empleada para la comparación de la distribución entre los grupos fue el odds ratio. En las pruebas de hipótesis se usó un nivel de significación estadística de 0.05, rechazando la hipótesis nula si el valor de p resulta inferior a este nivel ( $p < 0,05$ ; prueba bilateral). Para la organización y el procesamiento de datos se emplearon como software Excel, EpiDat 3.1 y Jamovi V2.3.28.0.

## 5.13 Recursos para desarrollar el estudio:

\*Recursos materiales: El estudio se basó en datos históricos, por lo que los recursos del laboratorio fueron suficientes para su realización y no se requirieron fuentes de apoyo.

\*Recursos humanos: estudiante de UNAJ bajo supervisión del personal del laboratorio de bacteriología.

Conflictos de interés: Los participantes declaran no tener conflictos de interés.

#### **5.14 Consideraciones éticas:**

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Científico y el Comité de Ética en Investigación del hospital.

Este proyecto se enmarca como “práctica epidemiológica” en establecimientos de salud, en el contexto de “*vigilancia de Resistencias emergentes*”, y por ser un relevamiento retrospectivo se eximió del consentimiento informado. No se realizó ningún procedimiento fuera de los estándares de atención. Al analizar los datos recopilados, se respetó la confidencialidad de la identidad de los pacientes, a partir de la codificación alfa-numérica.

#### **5.15 Beneficios potenciales**

La vigilancia de los eventos de resistencia en bacilos gram negativos causantes de bacteriemias, permitirá establecer medidas de prevención y adecuar los tratamientos empíricos iniciales con beneficio para el paciente, además de aportar información útil para monitorear la transmisión nosocomial.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Hemocultivos procesados durante los períodos en estudio

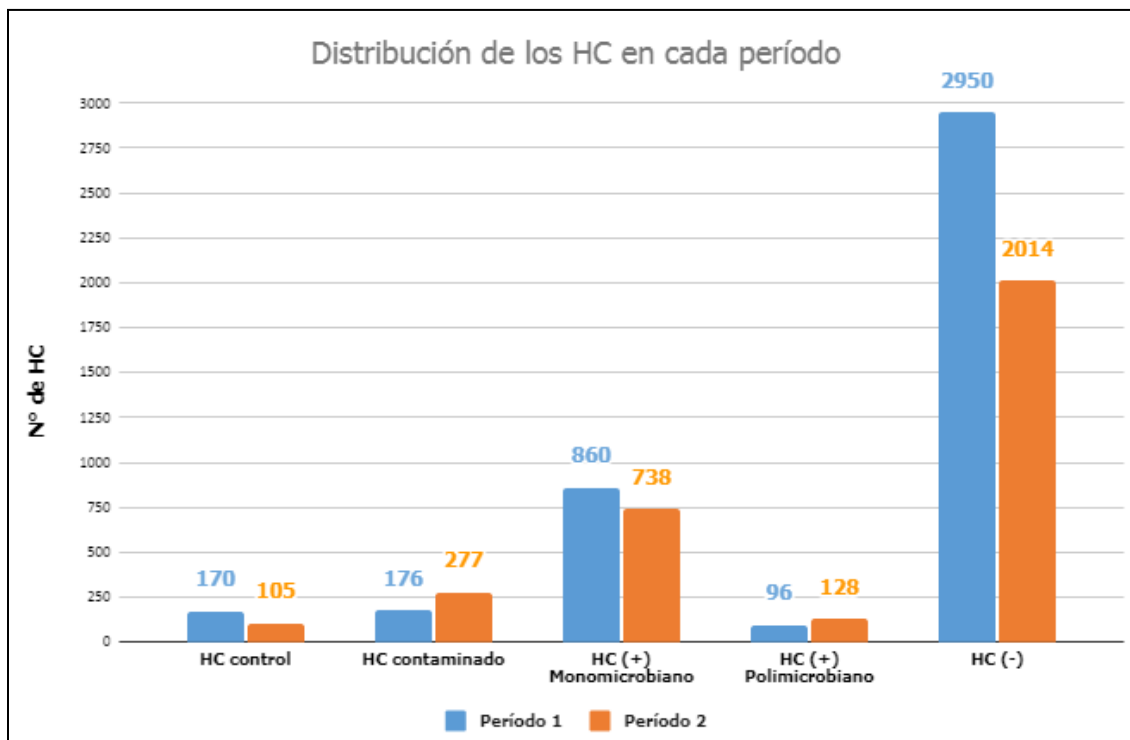
Se analizaron los resultados disponibles de los *sets* de hemocultivos (en adelante HC) procesados durante los períodos pre pandemia (P1) e intra/post pandemia (P2); el número total de muestras estudiadas fue 4.252 y 3.262, respectivamente. Los resultados se detallan en la **Tabla 1** y en el **Gráfico 1**.

**Tabla 1. Número total de Hemocultivos (HC) procesados en cada período.**

Variable	Pre Pandemia N (%)	Intra/Post Pandemia N (%)	p
<b>Total de HC</b>	4252 (100)	3262 (100)	–
<b>HC de control</b>	170 (4,0)	105 (3,2)	0,07
<b>HC contaminados</b>	176 (4,1)	277 (8,5)	<0,0001
<b>HC Monomicrobianos</b>	860 (20,2)	738 (22,6)	0,01
<b>HC Polimicrobianos</b>	96 (2,3)	128 (4,0)	<0,0001
<b>HC negativos</b>	2950 (69,4)	2014 (61,7)	<0,0001

Considerando los HC positivos, monomicrobianos y polimicrobianos clínicamente relevantes de cada período, y excluyendo los HC de control<sup>6</sup>, la tasa global de positividad resultó del 23,4% y 27,4% respectivamente; este aumento en la positividad en el P2 fue significativo (OR=0,80; [0,72-0, 90]);  $\chi^2=15,0$ ;  $p=0,001$ ). En cada período predominaron las bacteriemias monomicrobianas sobre las polimicrobianas. En el P2 hubo un aumento significativo de HC polimicrobianos (OR=0,56; [0,43-0,74]);  $\chi^2=17,7$ ;  $p=0,0001$ ) y de HC contaminados (OR=0,46 [0,38-0,56]);  $\chi^2=61,7$ ;  $p=0,0001$ ).

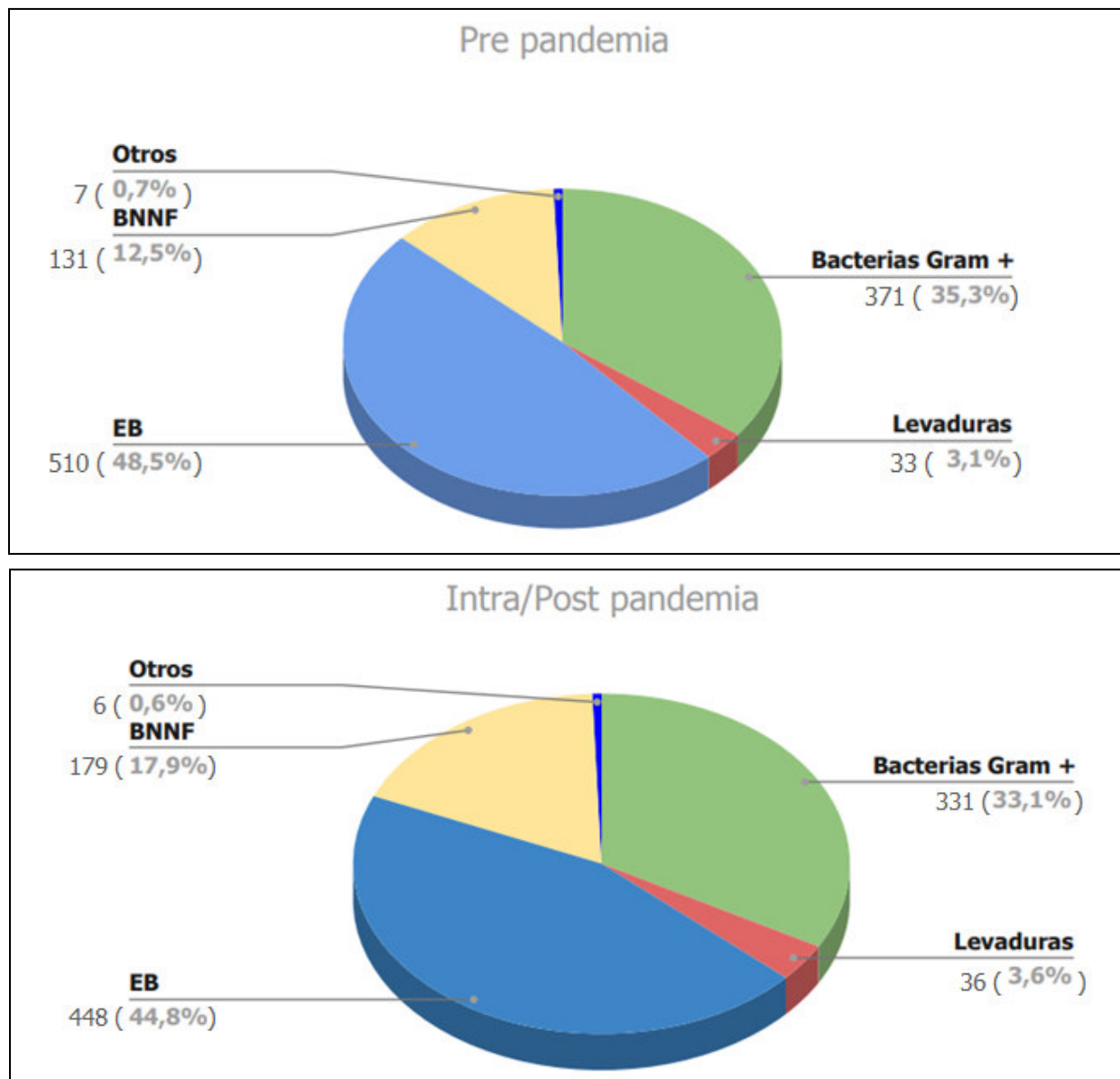
<sup>6</sup> Las muestras solicitadas para control de tratamiento se excluyeron de este análisis a efectos de no duplicar la información de los pacientes.



**Gráfico 1. Distribución de los Hemocultivos (HC) en cada período según el resultado.**

Considerando todos los microorganismos aislados de los HC clínicamente relevantes (bacterias Gram positivas, levaduras, *Enterobacterales* [EB], bacilos gram negativos no fermentadores [BNNF] y otros bacilos negativos [otros]), se aislaron bacterias gram negativas en 648 y 633 HC, lo que representó el 61,6% y 63,3 % del total en los respectivos períodos. Los resultados se detallan en el **Gráfico 2** y **Tabla A** del anexo.

Al comparar la proporción de bacterias Gram positivas, levaduras y *Enterobacterales* de cada período, no se obtuvo diferencia ( $p > 0,05$ ); pero durante la pandemia se detectó un aumento significativo en los BNNF del 12,5% al 17,9% (OR=0,65; [0,5-0,8]);  $\chi^2=11,7$ ;  $p=0,0006$ ).

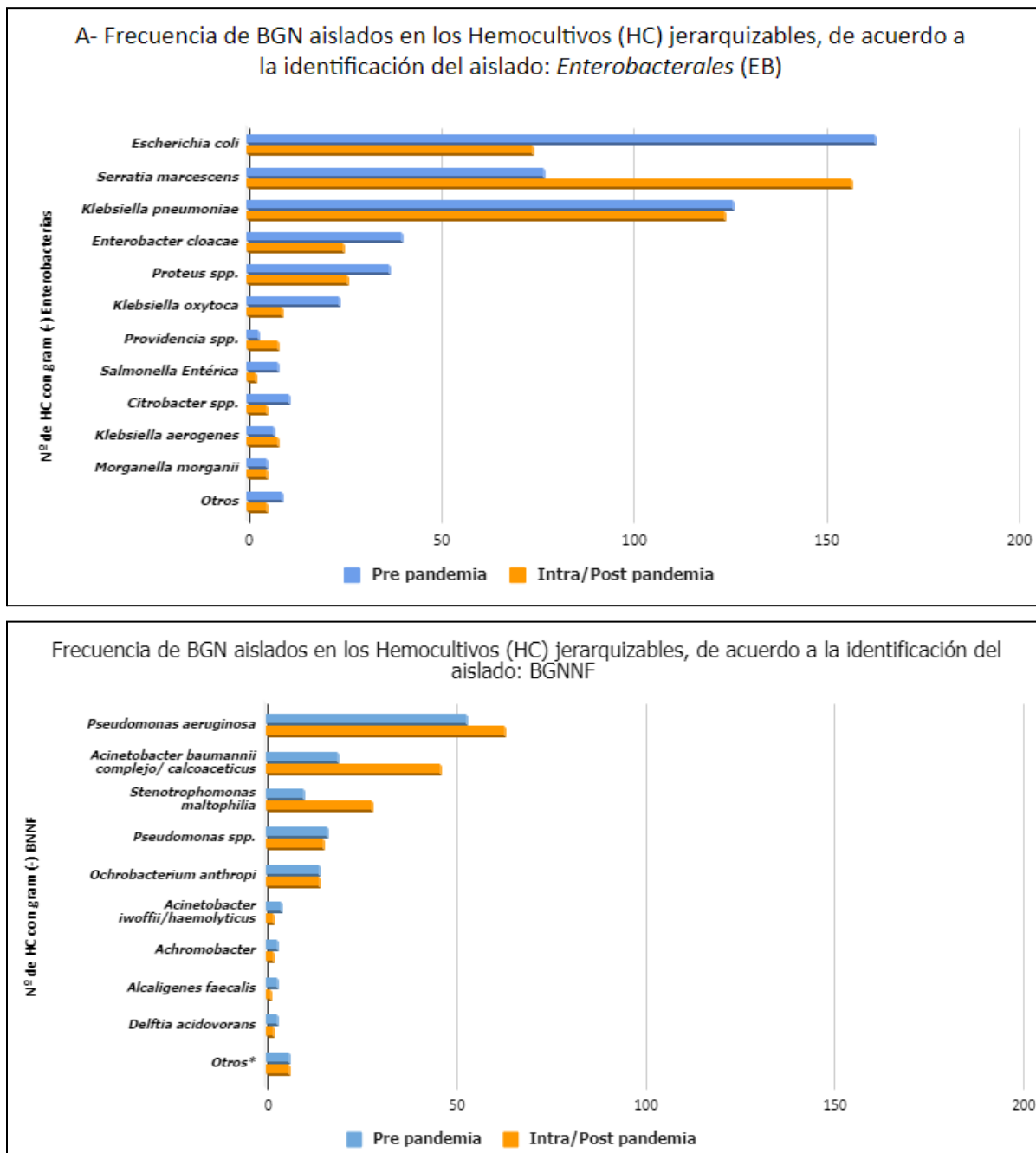


**Gráfico 2. Distribución porcentual de los microorganismos documentados en los Hemocultivos clínicamente relevantes de cada período: Pre pandemia (arriba) e Intra/post pandemia (abajo).**

## 6.2 Análisis de la frecuencia de los microorganismos.

Se analizó la prevalencia de los bacilos Gram negativos en relación a la identificación del aislado. En el grupo de los EB los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, seguidos por *Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp. y *Klebsiella oxytoca*, que representaron el 72,2% y el 65,5% del total de los respectivos períodos.

Dentro del grupo de BNNF, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter complejo baumannii/calcoaceticus* y *Stenotrophomonas maltophilia*, fueron los de mayor prevalencia. La información se detalla en el **Gráfico 3** y la **Tabla 2**.



**Gráfico 3. Frecuencia de Bacilos Gram Negativos (BGN) aislados en los Hemocultivos (HC) jerarquizables, de acuerdo a la identificación del aislado: A-Enterobacterales y B-BNNF.**

**Tabla 2. Frecuencia de Bacilos gram negativos aislados en los Hemocultivos clínicamente relevantes.**

Variable	Pre Pandemia N (%)	Intra/Post Pandemia N (%)	p
HC con Bacterias Gram (-)	648 (100)	633 (100)	–
<b>HC con EB</b>	<b>510 (78,7)</b>	<b>448 (70,8)</b>	<b>p=0,001</b>
<i>Escherichia coli</i>	163 (25,2)	74 (11,7)	P<0,0001i
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	126 (19,4)	124 (19,6)	ns
<i>Serratia marcescens</i>	77 (11,8)	157 (24,8)	P<0,0001
<i>Enterobacter cloacae</i>	40 (6,2)	25 (3,9)	ns
<i>Proteus spp.</i>	37 (5,7)	26 (4,1)	ns
<i>Klebsiella oxytoca</i>	24 (3,7)	9 (1,4)	p=0,01
<i>Citrobacter spp.</i>	11 (1,7)	5 (0,8)	ns
<i>Salmonella Entérica</i>	8 (1,2)	2 (0,3)	ns
<i>Klebsiella aerogenes</i>	7 (1,1)	8 (1,3)	ns
<i>Morganella morganii</i>	5 (0,8)	5 (0,8)	ns
<i>Providencia spp.</i>	3 (0,5)	8 (1,3)	ns
<b>Otros EB*</b>	9 (1,4)	5 (0,8)	–
<b>HC con BNNF</b>	<b>131 (20,2)</b>	<b>179 (28,3)</b>	<b>p=0,0008</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53 (8,2)	63 (10)	ns
<i>Acinetobacter complejo baumannii/calcoaceticus</i>	19 (2,9)	46 (7,3)	p=0,0004
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	10 (1,5)	28 (4,4)	p=0,002

<i>Pseudomonas spp.</i>	16 (2,4)	15 (2,4)	ns
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	14 (2,2)	14 (2,2)	ns
<i>Acinetobacter iwoffii/haemolyticus</i>	4 (0,6)	2 (0,3)	ns
<i>Achromobacter spp</i>	3 (0,5)	2 (0,3)	ns
<i>Alcaligenes faecalis</i>	3 (0,5)	1 (0,2)	ns
<i>Delftia acidovorans</i>	3 (0,5)	2 (0,3)	ns
Otros BGNF **	6 (0,9)	6 (0,9)	–
Otros gram (-)***	<b>57 (1,1)</b>	<b>66 (0,9)</b>	--

Nota: en la construcción de esta tabla se tomó como 100% la totalidad de los bacilos negativos de cada periodo.

Referencias: \*Otros EB: *Enterobacter hormaechei*, *Cedecea neteri*, *Escherichia hermannii*, *Klebsiella ozaenae*, *Pantoea agglomerans*. /\*\*Otros BNNF: *Sphingomonas paucimobilis*, *Cupriavidus pauculus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Bergeyella zoohelcum*, *Burkholderia cepacia complejo*, BGN no id no fermentador; *Brevundimona spp.*, *Ralstonia pickettii*./\*\*\*Otros gram (-): <sup>5</sup>*Campylobacter fetus*, <sup>6</sup>*jejuni*, <sup>5-6</sup>*Haemophilus influenzae*, <sup>5-6</sup>*Aeromonas caviae*/<sup>5</sup>*hydrophila*, <sup>5</sup>*Gardnerella vaginalis*.

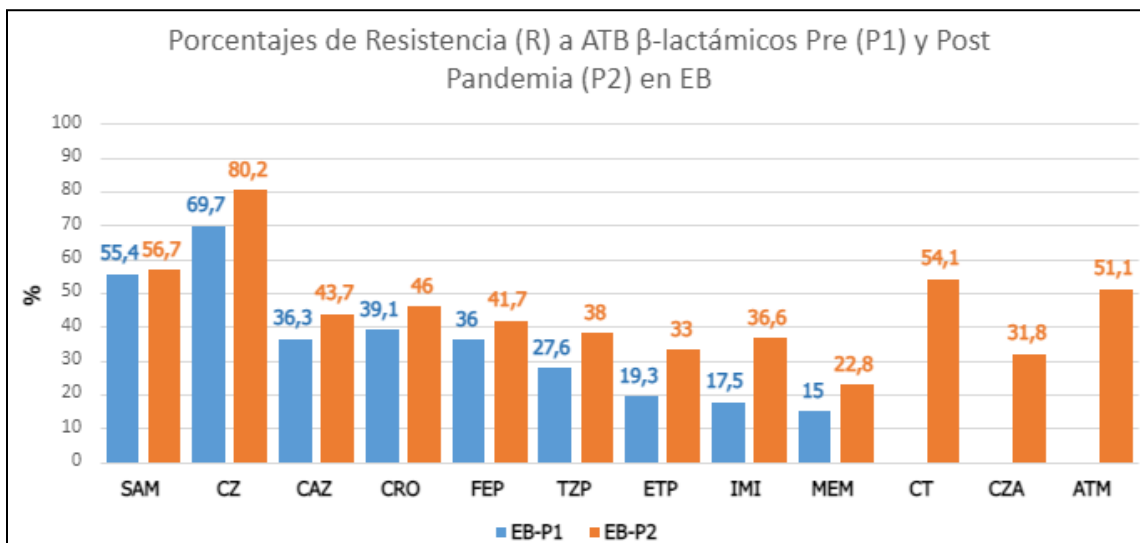
En ambos períodos de estudio los EB resultaron más prevalentes que los BNNF, aunque durante el P2 se notó una reducción del 78,7% al 70,8% (OR=1,52; [1,18-1,96]);  $\chi^2=10,6$ ;  $p=0,001$ ).

También se evidenció un cambio en la frecuencia relativa de las especies bacterianas. En el Período 2 se detectó un descenso significativo en *E. coli* y *Klebsiella oxytoca*, y un aumento de la prevalencia de *Serratia marcescens*. (OR=0,40; [0,30-0,55]);  $\chi^2=35,7$ ;  $p<0,0001$ ).

Respecto a los BNNF, *Acinetobacter* complejo *baumannii/calcoaceticus* y *S. maltophilia* tuvieron aumentos significativos en la etapa intra/post pandemia ( $p<0,05$ ). No se encontraron diferencias al comparar la frecuencia de aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

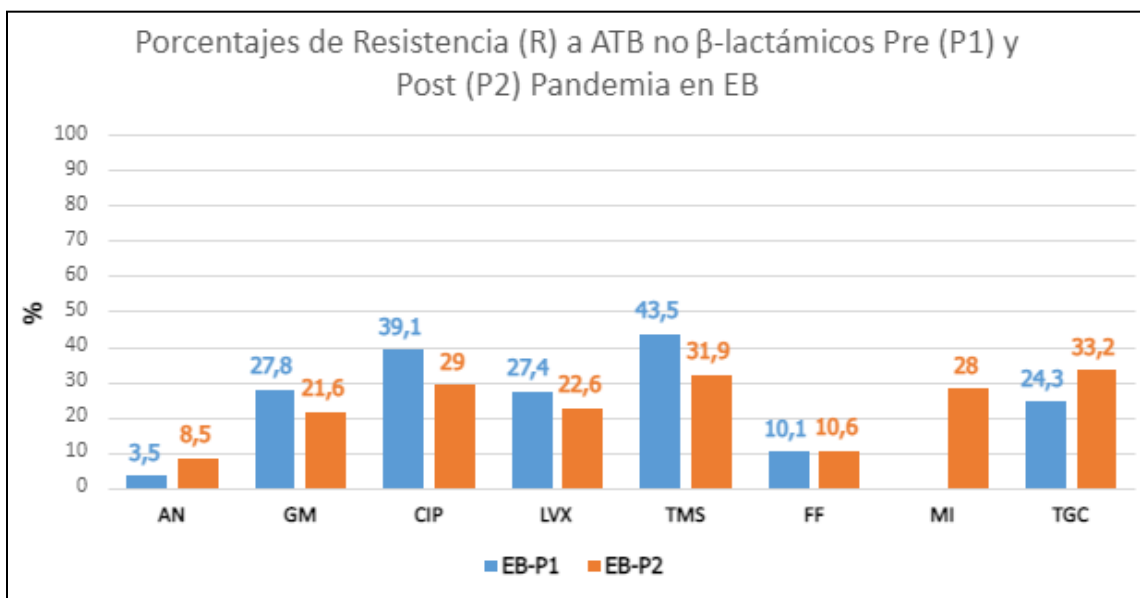
### 6.3 Análisis de los perfiles de resistencia:

Se analizó el porcentaje de Resistencia (R) global en los EB a los antimicrobianos ensayados. Para este cálculo se consideró la información del primer aislado en aquellos pacientes que tuvieran más de un episodio de bacteriemia con el mismo microorganismo. Los datos se muestran en los **Gráficos 4 y 5**.



**Referencias:** SAM: Ampicilina-sulbactam, CZ: Cefazolina, CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriaxona, FEP: Cefepime, TZP: Piperacilina-Tazobactam, ETP: Ertapenem, IMI: Imipenem, MEM: Meropenem, CT: Ceftolozano-Tazobactam, CZA: Ceftazidima-Avibactam, ATM: Aztreonam

**Gráfico 4. Porcentaje de resistencia en *Enterobacteriales* (EB) a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en cada período.**



**Referencias:** AN: Amicacina, GM:Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina, TMS:Trimetoprima – Sulfametoxazol, FF: Fosfomicina, MI: Minociclina, TGC: Tigeciclina

**Gráfico 5. Porcentaje de resistencia en *Enterobacteriales* (EB) a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos en cada período.**

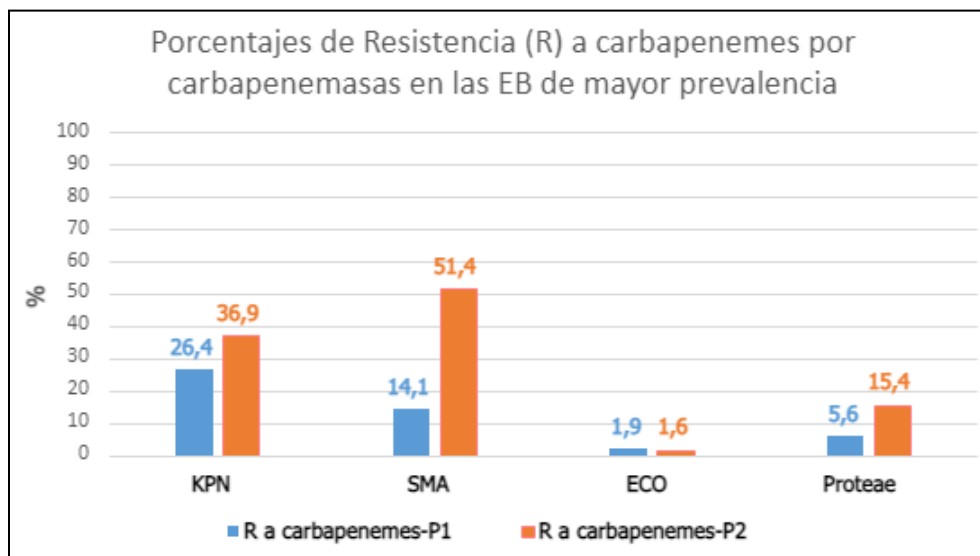
Con respecto a los EB se observó un aumento de la resistencia en todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el P2. La producción de BLEE fue positiva en el 36% de los *Enterobacterales* del P1 y en el 42% del P2 (OR=0,77; [0,61-0,99]);  $\chi^2=4,16$ ;  $p=0,04$ ).

En cuanto a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos hubo una disminución de la resistencia a GM, CIP, LVX y TMS; y un aumento de la resistencia a AN y TGC en el P2. FF mantuvo iguales niveles de R en ambos periodos.

Los antibióticos CZA, ATM, CT y MI no fueron ensayados en P1, dado que surgieron como alternativas en los aislados multirresistentes; no obstante presentaron niveles de resistencia mayores al 20%.

A efectos de analizar la Resistencia a carbapenemes por carbapenemasas, se consideraron las EB de mayor prevalencia: *Klebsiella pneumoniae* (KPN), *Serratia marcescens* (SMA), *Escherichia coli* (ECO) y el conjunto de *Proteus spp*, *Providencia spp* y *Morganella morganii* (Proteae).

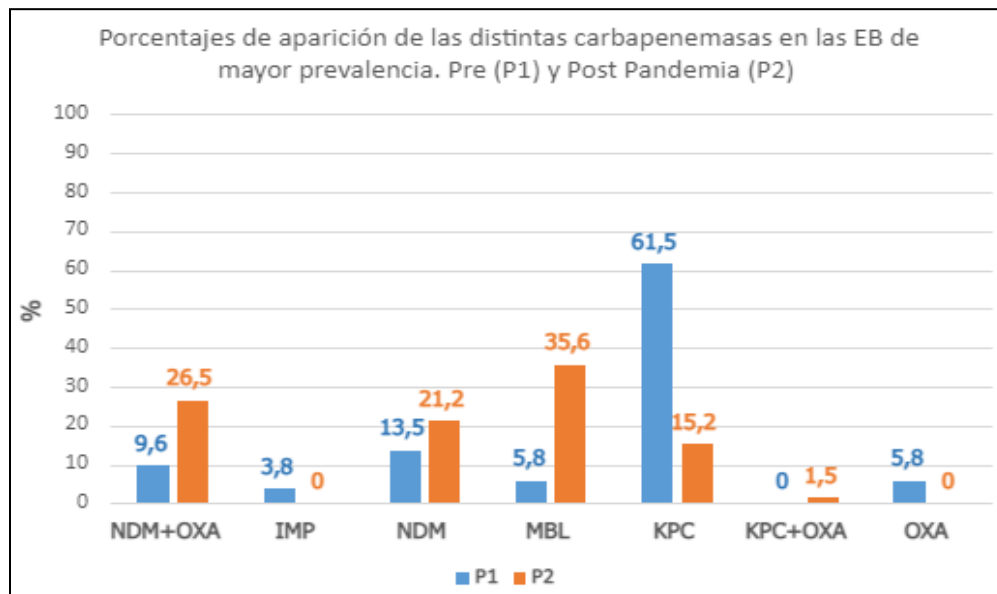
**Gráfico 6.**



**Gráfico 6. Porcentajes de resistencia a carbapenemes por carbapenemasas prevalentes en cada periodo.**

Durante la pandemia, excepto en ECO, se notó un aumento en el porcentaje de aislados productores de carbapenemasas. Este incremento fue muy significativo en *Serratia marcescens* (OR=0,15; [0,07-0,32]);  $\chi^2=29,7$ ;  $p<0,0001$ ).

Posteriormente se analizó la frecuencia de aparición según el tipo de Carbapenemasa encontrada en esas EB. **Gráfico 7.**



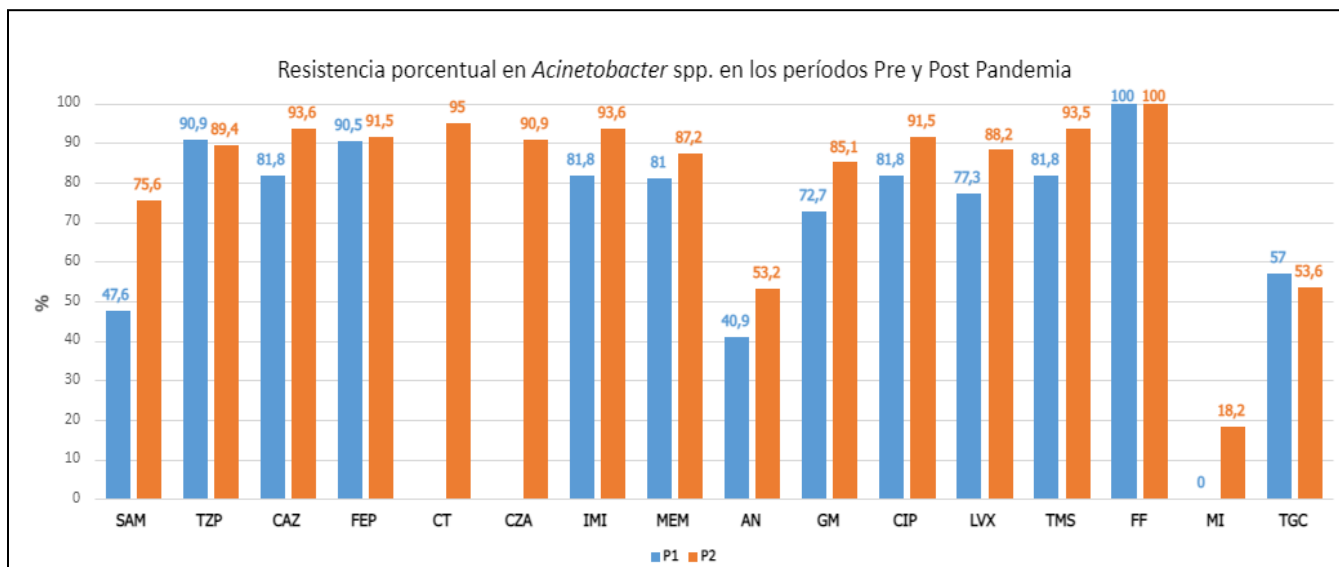
**Gráfico 7. Porcentajes de aparición de las distintas carbapenemasas en las EB de mayor prevalencia en cada período.**

Durante la pandemia el porcentaje de EB productores de carbapenemasas aumentó significativamente del 11,0% (52/472) al 29,3% (132/450), (OR=0,29; [0,20-0,42];  $\chi^2=48,3$ ;  $p<0,0001$ ). También se notó un cambio en la distribución del tipo de enzima, dado que en el P1 la enzima de tipo KPC representó el 61,5% de las carbapenemasas detectadas, y en P2 sólo el 16,7%. (OR=8,00; [3,88-16,47];  $\chi^2=36,2$ ;  $p<0,0001$ ), dato que refleja el incremento de MBL durante la pandemia. También se detectó un incremento significativo de EB productores de dos carbapenemasas, doble productores de NDM+OXA, con porcentajes que se elevaron del 9,6% en P1 al 26,5% en P2 (OR=0,29; [0,10-0,80];  $\chi^2=6,26$ ;  $p<0,05$ ). **Gráfico 7.**

En 19 aislados con producción de BLEE y MBL se realizó la Pre-difusión CZA/ATM; 18 resultaron positivos, prediciendo la utilidad terapéutica de esta combinación de antimicrobianos.

En los BNNF, para el análisis de las resistencias se consideraron los aislamientos de *Acinetobacter* spp; *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, dado que resultaron las especies de mayor prevalencia. Nuevamente se consideró la información del

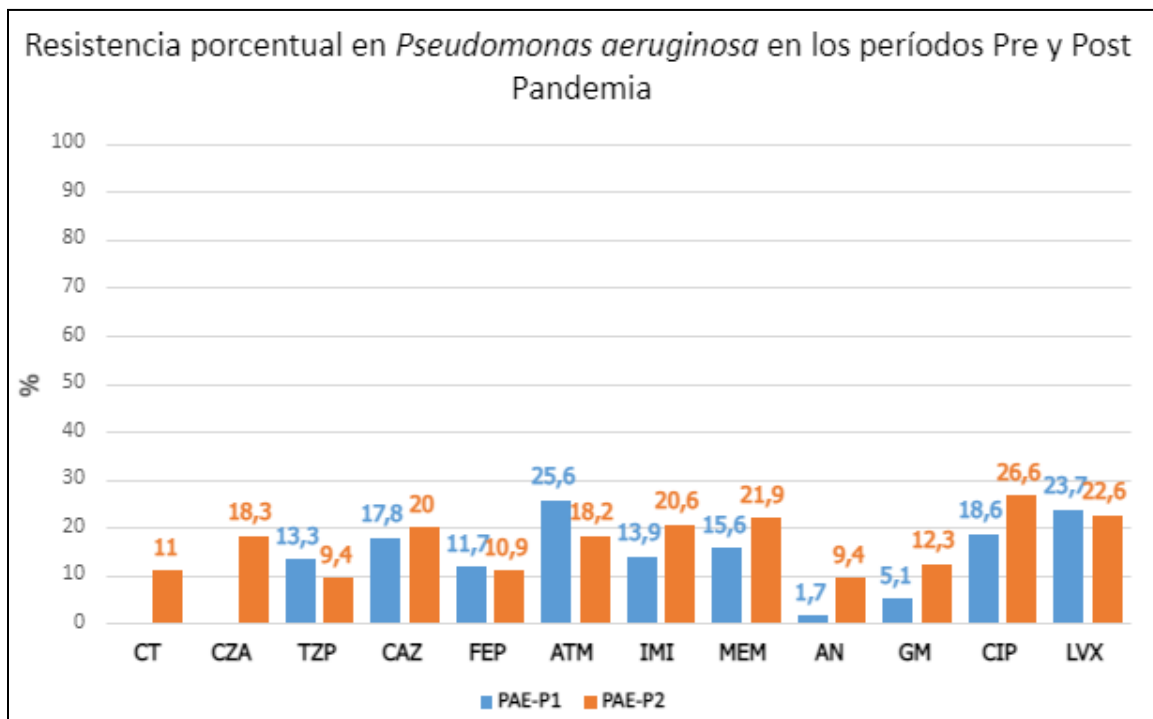
primer aislado en aquellos pacientes que tuvieran más de un episodio de bacteriemia con el mismo microorganismo. La información se detalla en los **Gráficos 8, 9 y 10**.



**Referencias:** SAM: Ampicilina-sulbactam, TZP: Piperacilina-Tazobactam, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, CT: Ceftolozano-Tazobactam, CZA: Ceftazidima-Avibactam, IMI: Imipenem, MEM: Meropenem, AN: Amicacina, GM: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina, TMS: Trimetoprima – Sulfametoxazol, FF: Fosfomicina, MI: Minocilina, TGC: Tigeciclina

### **Gráfico 8. Comparación de los porcentajes de resistencia en *Acinetobacter* spp. en cada período.**

En *Acinetobacter* spp., se puede observar elevados niveles de R a la mayoría de los antimicrobianos ensayados, que se incrementaron durante la pandemia. MI resultó el de mayor actividad “*in vitro*”.



**Gráfico 9. Comparación de los porcentajes de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* en cada período.**

En *P. aeruginosa*, la mayoría de los antibióticos aumentaron los porcentajes de resistencia durante la pandemia, excepto TZP, FEP, ATM, y LVX.

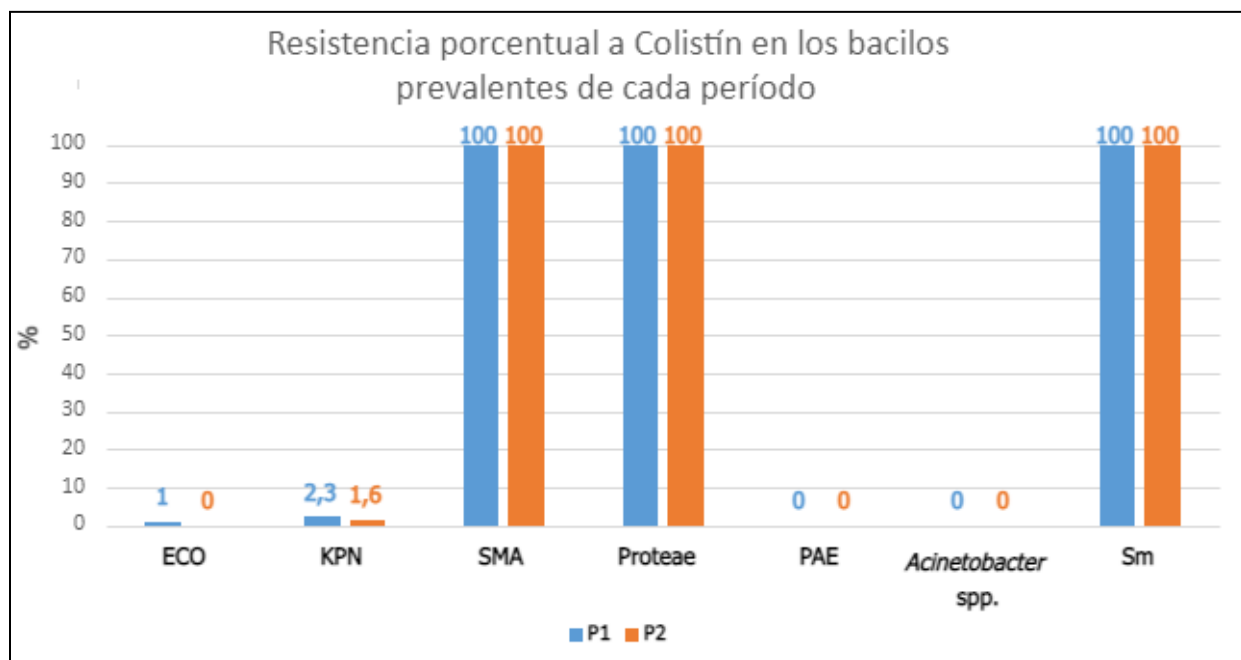
Los antibióticos CZA, CT no fueron ensayados en P1, dado que surgieron como alternativas en los aislados multirresistentes. CZA y CT demostraron no ser una alternativa en los casos de *Acinetobacter* spp. (porcentaje de R superior al 90%); siendo potencialmente útiles para *P. aeruginosa*.

Ni en *Acinetobacter* spp, ni en *Pseudomonas aeruginosa* se encontraron aislados productores de BLEE ni de carbapenemasas plasmídicas.

Respecto de *S.maltophilia* en el P1 no se detectaron aislados resistentes a MI ni a LVX. Uno de 9 aislados disponibles para realizar la prueba de sensibilidad a TMS fue resistente, y 6 de 10 lo fueron frente a CAZ. En el P2, tampoco se encontraron aislados con resistencia a MI, pero 22/27 aislados fueron R a CAZ, 3/27 a LVX y 10/27 a TMS<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> Dado que el número de aislamientos fue menor a 30, no se expresó como porcentaje.

Finalmente se analizó la R a CL, de acuerdo a los datos del *Col Drop test*. Los mismos se detallan en el **Gráfico 10**.



Referencias: ECO: *E. coli*, KPN: *Klebsiella pneumoniae*, SMA: *Serratia marcescens*, PAE: *Pseudomonas aeruginosa*, Sm: *Stenotrophomona maltophilia*

**Gráfico 10. Porcentaje de resistencia a colistín en los BGN prevalentes de cada período.**

Considerando que CL es un antimicrobiano de uso limitado a infecciones por BGN multirresistentes, los resultados muestran que su utilidad potencial queda acotado a ECO, KPN, *Acinetobacter* spp. y PAE, dado que dentro de los BGN prevalentes de este estudio, SMA, Proteae y *S. maltophilia* presentan resistencia natural a esta droga.

#### 6.4 Características de los pacientes

Se identificaron un total de 543 y 488 pacientes con bacteriemias por BGN, en los respectivos períodos. No se hallaron diferencias en la población en relación a las edades y a la prevalencia según el sexo, aunque predominaron los varones ( $p > 0,05$ ).

En ambos grupos, un tercio de los pacientes no presentaron una enfermedad de base (EdB) conocida al momento de realizar el HC. ( $p > 0,05$ ). Esta información se muestra en la **Tablas 3 y 4**.

**Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población con bacteriemia por BGN.**

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>Pre-Pandemia N (%)</b>	<b>Intra/Post Pandemia N (%)</b>
<b>Total de pacientes con bacteriemia por BGN</b>	543	488
<b>Sexo (varón)<sup>1</sup></b>	315 (58,0)	254 (52,0)
<b>Edad media en años (<math>\pm</math>DE<sup>2</sup>) Mediana (rango) / RIC<sup>3</sup></b>	60,6 (17,9) 63,0 (19-99) / 23,8	60,8 (17,0) 62,0 (19-98) / 21,8
<b>Episodios de bacteriemia /pacientes</b>	648/543=1,2	633/488=1,3
<b>Sin EdB conocida al momento del HC (+)</b>	194 (35,8)	155 (32,2)

<sup>1</sup>p>0,05; <sup>2</sup>DE: desvío estándar; <sup>3</sup>RIC: rango intercuartil.

#### 6.4.1 Enfermedad de Base (EdB)

**Tabla 4. Enfermedad de base al momento de la realización del HC.**

<b>Enfermedad de base (EdB)</b>	<b>P1 (N=543)</b>	<b>P2 (N=488)</b>	<b>p</b>
<b>Sin EdB conocida</b>	194 (35,8%)	157 (32,2%)	ns
<b>Diabetes</b>	95 (17,5%)	102 (20,9%)	ns
<b>Inmunosupresión por HIV/enf. oncohematológica</b>	45 (8,34%)	34 (6,9%)	ns
<b>Tumor sólido (TS)</b>	43 (8,0%)	24 (5,0%)	ns
<b>Asma/EPOC</b>	25 (4,54%)	29 (5,9%)	ns
<b>Cardiopatía</b>	25 (4,54%)	16 (3,35%)	ns
<b>Accidente Cerebro-Vascular (ACV)</b>	24 (4,4%)	8 (1,7%)	s (0,01)
<b>Hipertensión arterial (HTA)</b>	20 (3,6%)	45 (9,2%)	s (0,0003)
<b>Ins. renal crónica (IRC)</b>	17 (3,1%)	14 (2,9%)	ns

<b>Cirrosis</b>	10 (1,8%)	14 (2,9%)	ns
<b>Enf. de Alzheimer</b>	8 (1,5%)	7 (1,5%)	ns
<b>Colagenopatía</b>	7 (1,3%)	7 (1,5%)	ns
<b>Sin información</b>	3 (0,55%)	2 (0,38%)	ns
<b>Otros</b>	27 (5,1%)	29 (5,9%)	–

De acuerdo a la EdB se puede observar que durante la pandemia aumentó significativamente la bacteriemia por BGN en personas con HTA (OR=0,37; [0,21-0,64]);  $\chi^2=13,37$ ;  $p=0,0003$ ), y se redujo en pacientes con ACV (OR=2,77; [1,23-6,23]);  $p=0,001$ ). También aumentó el número de bacteriemias en pacientes con EPOC, Cirrosis, Diabetes, IRC, y TS, y se redujo en pacientes con cardiopatías y con VIH, aunque estos datos no fueron estadísticamente significativos.

#### **6.4.2 Frecuencia de los episodios de bacteriemia por BGN según los servicios de internación.**

Los servicios de internación en donde con mayor frecuencia se diagnosticaron bacteriemias por BGN fueron: Clínica médica, UCI (Unidad de Cuidados Intensivos), Cardiología, UCO (Unidad Coronaria), y Cirugía. Los resultados se detallan en la **Tabla 5**.

Durante la pandemia los casos de bacteriemia por BGN tuvieron una reducción significativa en pacientes asistidos en Maternidad y obstetricia (OR=5,07; [2,09-12,27]);  $\chi^2=15,8$ ;  $p=0,0001$ ).; hubo un leve incremento en pacientes de UTI y cirugía pero no fueron significativos ( $p>0,05$ ).

**Tabla 5. Distribución de los episodios de bacteriemia por BGN según el servicio de internación.**

Servicios de internación	Pre Pandemia N (%)	Intra/Post Pandemia N (%)
<b>Clínica médica</b>	361 (55,7)	357 (56,3)
<b>UCI</b>	139 (21,5)	153 (24,2)
<b>Cardiología</b>	53 (8,2)	45 (7,1)
<b>UCO</b>	25 (3,8)	24 (3,8)
<b>Cirugía</b>	27 (4,2)	37 (5,8)
<b>Maternidad/Obstetricia</b>	30 (4,6)	6 (1,0)
<b>Ortopedia y traumatología</b>	7 (1,0)	8 (1,3)
<b>Otros</b>	3 (0,5)	2 (0,3)
<b>Emergencia/Guardia</b>	3 (0,5)	1 (0,2)
<b>Total (100)</b>	648	633

#### 6.4.3 Principales focos de bacteriemia por BGN.

Tomando la información disponible de las órdenes médicas de solicitud de HC, los focos de bacteriemia por BGN más frecuentes fueron: fiebre de origen desconocido (29,5% y 40,3%), pulmonar (24,4% y 28,1%), acceso vascular (13,3% y 13,7%), renal/urinario (13,6% y 5,1%), piel y partes blandas (9,7% y 4,3%), y representaron el 90,5% y el 91,5% de los respectivos períodos de estudio. (Tabla 6).

**Tabla 6. Frecuencia de episodios de bacteriemia por BGN según el foco de infección.**

Focos según su frecuencia (n) en los HC jerarquizables	Pre Pandemia N (%)	Intra/Post pandemia N (%)	p
<b>Fiebre de origen desconocido</b>	191 (29,5)	255 (40,3)	p<0,0001
<b>Pulmonar</b>	158 (24,4)	178 (28,1)	ns
<b>Acceso vascular</b>	86 (13,3)	87 (13,7)	ns
<b>Renal /Urinario</b>	88 (13,6)	32 (5,1)	p<0,0001

<b>Piel y partes blandas</b>	63 (9,7)	27 (4,3)	p<0,0001
<b>Abdominal</b>	34 (5,2)	33 (5,2)	ns
<b>Endovascular</b>	8 (1,2)	11 (1,7)	ns
<b>Ginecológico</b>	12 (1,8)	3 (0,5)	p=0,03
<b>Herida/Herida quirúrgica</b>	2 (0,3)	2 (0,3)	ns
<b>Otros*</b>	6 (0,9)	5 (0,8)	–
<b>Total (100)</b>	648	633	

Nota:\* Absceso hepático, pericárdico, pleural, prótesis vascular, óseo/articular, meníngeo.

Durante la pandemia se registró un aumento significativo de bacteriemias por BGN sin foco conocido (OR=0,61; [0,49-0,78]);  $\chi^2=16,4$ ; p<0,0001), un aumento no significativo asociado al foco pulmonar, y una reducción significativa de las asociadas a foco renal, partes blandas y ginecológico; del resto no hubo modificaciones (p>0,05).

#### 6.4.4 Análisis del *Status* COVID en la población en estudio.

A partir de la información disponible en el Sistema SISA (Sistema Integrado de Información Sanitario Argentino) y el LIS del laboratorio, se investigó el *Status* COVID de los 488 pacientes con bacteriemias por BGN, con los siguientes resultados: COVID (+): 140 (28,7%), COVID (-): 193 (39,5%), y COVID sin datos: 155 (31,8%).

Se determinó también el porcentaje de bacteriemias causadas por EB productoras de carbapenemasas según el *Status* COVID de los pacientes. Los resultados fueron: 29% en la población COVID (+), 39% en la COVID (-), y 34% en la población con COVID desconocido. En base a los datos obtenidos de ambas situaciones, en aproximadamente 1/3 del total de pacientes no se pudo saber la condición frente al COVID, lo que dificulta realizar una conclusión certera sobre la población estudiada.

## **7. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES**

En este trabajo se abordó un análisis comparativo de los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos documentados durante Marzo de 2017 a Diciembre de 2019 (Pre-pandemia) y Marzo 2020 a Diciembre 2022 (Intra/Post-pandemia). Se destacan los siguientes aspectos:

### **7.1 Hemocultivos procesados en cada período:**

Durante la pandemia, se pudo evidenciar una disminución del número de pacientes hemocultivados, aunque hubo un aumento en la tasa de hemocultivos (HC) positivos, HC polimicrobianos y HC contaminados.

En general los pacientes hospitalizados, especialmente aquellos con COVID-19 grave, requirieron en su asistencia el uso de dispositivos médicos insertados (catéteres intravenosos, sondas vesicales o respiradores), los cuales proporcionan un acceso directo al torrente sanguíneo y sirven como puntos de entrada para los microorganismos de la biota del paciente, de las manos del operador o microorganismos del ambiente hospitalario. Posicionar al paciente boca abajo para mejorar la oxigenación en casos de insuficiencia respiratoria grave (paciente pronado), pudo aumentar la dificultad para obtener muestras de sangre de manera aséptica. Por lo que, en este contexto, estas pudieron ser causas del aumento de la tasa de HC positivos, polimicrobianos y contaminados.

### **7.2 Prevalencia de especies documentadas por cultivo:**

Los BGN de mayor prevalencia en ambos períodos dentro de los *Enterobacterales* (EB) fueron *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcesces*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp. y *K. oxytoca*; en el grupo de bacilos negativos no fermentadores de glucosa (BNNF) fueron *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *S. maltophilia*. Durante la pandemia se notó un cambio en su frecuencia de aparición, evidenciado por un aumento en la prevalencia de *Serratia marcescens*, *Acinetobacter complejo baumannii/calcoaceticus* y *S. maltophilia*.

Este hallazgo se puede deber a que estos microorganismos son patógenos oportunistas relacionados con infecciones adquiridas en el ámbito hospitalario, que afectan a pacientes con enfermedades de base, debilitados, inmunodeprimidos, y multi invadidos.

Entre las características comunes más importantes de los BNNF se destacan: la gran versatilidad nutricional, que les permite adaptarse eficazmente al ambiente hospitalario, la capacidad para diseminarse desde reservorios exógenos (p. ej., soluciones acuosas y superficies inertes húmedas como respiradores, broncoscopios, equipos de diálisis e incluso soluciones desinfectantes) y/o endógenos (principalmente mucosas respiratoria e intestinal), la resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos y la facilidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos de uso clínico.

*S. marcescens* puede contaminar ambientes y reservorios pobres en nutrientes (agua potable,

cañerías e insumos hospitalarios); se adhiere fácilmente a instrumental hospitalario, catéteres, endoscopios y tubos intravenosos, siendo capaz de sobrevivir en superficies inanimadas, factor que favorece su permanencia y diseminación.

### **7.3. Eventos de resistencia (R) en BGN causantes de bacteriemias:**

En las EB la producción de BLEE y de Carbapenemasas son la resultante de la adquisición de material genético transferible; es una resistencia no predecible, de ahí la importancia de su detección, pues la misma invalida prácticamente el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Respecto a este punto, durante la pandemia se observó un aumento de EB productores de BLEE del 36% al 42%, del porcentaje de EB productores de carbapenemasas del 11% al 29% ( $p < 0,05$ ), con un marcado aumento de MBL, y un incremento de EB doble productora de carbapenemasas (NDM+OXA) del 9,6% al 26,5% ( $p < 0,05$ ), que fue coincidente con el aumento de la prevalencia de *S. marcescens*.

En relación a los BNNE, no se hallaron *Acinetobacter* spp. ni *P. aeruginosa* productores de BLEE y Carbapenemasas plasmídicas, aunque estos microorganismos suelen presentar resistencias a varios antimicrobianos de uso clínico, por mecanismos vinculados a la baja permeabilidad de su membrana externa, a la expresión natural de sistemas de eflujo, a una gran dotación genética de enzimas cromosómicas, a la que suman su capacidad de adquirir nuevos determinantes de resistencia. Durante la pandemia se evidenció un aumento en la R en *Acinetobacter* spp, a los antibióticos ensayados, lo que incrementó su perfil de multiresistencia. En *S. maltophilia* se produjo un aumento de la R a los antimicrobianos de elección para el tratamiento como son levofloxacina (LVX) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS).

### **7.4 Alternativas terapéuticas para aislados multirresistentes:**

Es importante remarcar los siguientes conceptos:

- Un aislado productor de BLEE (+) debe ser tratado con un carbapenem u otra opción no  $\beta$ -lactámica.
- Un aislado productor de carbapenemasas, debe ser tratado con una opción que puede requerir la combinación de ATB, lo que va a depender del microorganismo, del foco de infección, del tipo de enzima y del nivel de resistencia a meropenem.
- Una EB puede tener más de un tipo de carbapenemasa, y/o co-productar BLEE.

Este escenario se asocia con altos costos relacionados al tratamiento, largas estancias hospitalarias, y a una mayor morbimortalidad, si no se dispone de una terapéutica inmediata adecuada.

Es por eso que desde el laboratorio de Bacteriología se debe disponer de los recursos no sólo para detectar los mecanismos de resistencia (FilmArray, *Blue Carba test*, Pruebas Inmunocromatográficas, sinergias de inhibición, etc), sino para testar antimicrobianos alternativos (Pre Difusión CZA-ATM, col Crop *test*, CT, CZA) como se detalló en materiales y métodos, ante la necesidad de dar un resultado de manera precoz.

Los ATB que fueron ensayados en la pandemia como alternativas en aislados multirresistentes en EB (CZA, ATM, CT, TGC y MI) presentaron niveles de R mayores al 20%, resultando amikacina y fosfomicina los de mayor actividad “*in vitro*”. En los BNNF, CZA y CT no fueron una alternativa en *Acinetobacter* spp, pero fueron potencialmente útiles en *P. aeruginosa*. Esta situación denota la reducción de opciones terapéuticas.

Colistín (CL) es un antimicrobiano con un estrecho margen terapéutico y elevada toxicidad, pero que suele ser una alternativa de último recurso. Durante la pandemia se determinó un incremento significativo de BGN con resistencia natural a CL como *S. marcescens*, *S. maltophilia* y también de integrantes de *Proteae* spp, limitando aún más las opciones terapéuticas.

## 7.5 Pacientes.

En los periodos estudiados los pacientes tuvieron similitudes en cuanto a edad y sexo, con un leve predominio de varones. Durante la pandemia se diagnosticó un porcentaje mayor de bacteriemias por BGN en pacientes hipertensos ( $p < 0,05$ ) y diabéticos respecto del P1, y disminuyó en pacientes de maternidad/obstetricia, situación que pudo estar relacionada a la reducción de las consultas de este servicio para preservar la exposición al virus de las mujeres embarazadas. El número de pacientes con bacteriemia por BGN fue menor durante la pandemia (543 pacientes en P1 y 488 en P2), y puede ser reflejo de lo antedicho. El principal origen de bacteriemia fue la fiebre de origen desconocido, con reducción de los focos renal, partes blandas, y ginecológico ( $p < 0,05$ ). Nuevamente esto pudo estar asociado al tipo de patología que debió ser asistida en un hospital. En ambos períodos los servicios que solicitaron el mayor número de HC fueron Clínica médica y la UCI.

Al indagar el *status* COVID en los pacientes con bacteriemias por BGN, no se pudo analizar esta condición, dado que el dato no estuvo disponible en  $\frac{1}{3}$  de los casos. Esto resultó una de las limitaciones de este estudio, inherente al diseño retrospectivo, en el que se recopilaron datos sobre eventos o condiciones que ya ocurrieron.

Al comienzo de la pandemia por COVID-19, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, USA), recomendó que los sistemas de atención médica prioricen las visitas urgentes con el objetivo de disminuir la propagación de COVID-19 en los centros de salud. Por ello, y en concordancia con las medidas de aislamiento social, hubo una disminución en la atención de pacientes, y la accesibilidad fue la primera cualidad que resultó afectada, a lo

que se sumó el miedo de la población a acudir a cualquier centro sanitario por considerar que estos podían ser fuente de contagio.

Durante la pandemia COVID-19 el sistema de salud vivió una situación de *stress* resultante de una combinación de factores, incluido el aumento repentino de casos, la escasez de recursos médicos, escasez de camas en las unidades de internación, la fatiga del personal sanitario que enfrentó cargas de trabajo extremadamente pesadas y nuevas condiciones de trabajo, la desorganización y la falta de preparación al inicio para enfrentar una pandemia de esta magnitud, contribuyeron al caos en algunos hospitales.

En este estudio se puso de manifiesto el exhaustivo trabajo que implica dar una respuesta rápida en pacientes que corren riesgo de vida. El tiempo que transcurre desde la detección de la botella de HC positiva hasta la de identificación y sensibilidad definitiva, es crítico para que el paciente pueda recibir cuanto antes una terapia antimicrobiana dirigida. Obtener este resultado, muchas veces tiene sus limitaciones, requiere de recursos técnicos y humanos que no siempre están disponibles.

Finalmente, la pandemia por COVID-19 generó un escenario que propició el incremento de la R bacteriana y la aparición de aislados con acotadas opciones para el tratamiento.

Los datos aquí mostrados avalan la hipótesis de partida: *“La situación de emergencia sanitaria consecuenta a la Pandemia COVID-19, favoreció el aumento de los porcentajes de resistencia bacteriana en los episodios de bacteriemia por bacilos Gram negativos”*. Por esta razón es muy importante generar estrategias para prevenir y contener la diseminación de la resistencia antimicrobiana, dada las escasas alternativas terapéuticas disponibles.

## 8. ANEXO

**Tabla A. Distribución de los microorganismos documentados en los Hemocultivos (HC) clínicamente relevantes.**

Variable	Pre Pandemia n (%)	Intra/Post Pandemia n (%)
Número Total de Microorganismos detectados en los HC.	1052	1000
HC con Bacterias Gram (+)	371 (35,2)	331 (33,1)
<i>Enterococcus</i> spp.	97 (9,22)	146 (14,6)
<i>Staphylococcus aureus</i> (SAU)	139 (13,2)	107 (10,7)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2 (0,2)	-
SCN <sup>a</sup>	55 (5,2)	40 (4,0)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25 (2,4)	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	10 (1,0)	8 (0,8)
<i>Streptococcus</i> spp. <sup>1</sup>	24 (2,3) <sup>1</sup>	12 (1,2) <sup>2</sup>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7 (0,7)	5 (0,5)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5 (0,5)	4 (0,4)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (0,2)	1 (0,1)
Otros	5 (0,5) <sup>3</sup>	8 (0,8) <sup>4</sup>
HC con levaduras	33 (3,1)	36 (3,6)
HC con bacilos gram (-)	648 (61,6)	633 (63,3)
N° de HC con gram (-) EB <sup>b</sup>	510 (48,5)	448 (44,8)
N° de HC con gram (-) BNNF <sup>c</sup>	131 (12,5)	179 (17,9)
Otros gram (-)	5 <sup>7</sup> (0,7)	6 <sup>6</sup> (0,6)

**Referencias:** <sup>a</sup>SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativos, <sup>b</sup>EB: enterobacterias, <sup>b</sup>BNNF: bacilos gram negativos no fermentadores.

<sup>1</sup>*Streptococcus* sp: <sup>1</sup>*S. viridans*, <sup>1</sup>*S. mitis*, <sup>1</sup>*S. anginosus*, <sup>1-2</sup>*S. constellatus*, <sup>1</sup>*S. alfa-hemolitico*, <sup>1</sup>*S. grupo G*, <sup>1</sup>*S. porcinus*, <sup>1</sup>*S. sanguinis*, <sup>1</sup>*S. oralis*, <sup>1</sup>*S. gallolyticus ssp*, <sup>1</sup>*S. pasteurianus*, <sup>1</sup>*S. infantarius*.

<sup>3-4</sup>*Aerococcus viridans*, <sup>3</sup>*Leuconostoc mesenteroides*, <sup>4</sup>*Clostridium perfringens*, <sup>4</sup>*Listeria monocytogenes*, <sup>4</sup>*Mycobacterium tuberculosis*.

<sup>5</sup>*Campylobacter fetus*/<sup>6</sup>*jejuni*, <sup>5-6</sup>*Haemophilus influenzae*, <sup>5-6</sup>*Aeromonas caviae*/<sup>6</sup>*hydrophila*, <sup>5</sup>*Gardnerella vaginalis*, <sup>5-6</sup>*Bacilos acidorresistentes*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1-Bravo, Felipe, Galván, Gonzalo, & Arancibia, José M.. (2022). Infecciones bacterianas en pacientes internados por COVID-19 en Unidad de Paciente Crítico. *Revista chilena de infectología*, 39(2), 224-226. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182022000200224>
- 2-Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- 3-Cantón R, Lifschitz E, Aranaz JM, Ferrer R, Ramírez P, Salavert M, Soriano A, Fernández Díaz JM, Barberán J. Informe sobre Resistencia Antimicrobiana. 2022. Hiris Innovation Technologies. ISBN: 978-84-09-45294-1
- 4-Cercenado Emilia. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, 2015, vol. 28, no 1, p. 8-11.
- 5-CLSI. (2022). M100-Ed32. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Payne Publishing.
- 6-Domínguez Espín , F. S. ., Chicaiza Abad , J. P. ., Sánchez Altamirano , M. F. ., Muñoz Sanizaca , E. J. ., & Tixilema Arias , C. M. . (2023). Impacto de la resistencia microbiana a antibióticos a causa de la pandemia del covid-19. *Dominio De Las Ciencias*, 9(1), 186–196. <https://doi.org/10.23857/dc.v9i1.3126>
- 7-Espinosa Perez, M., García Fenoll, R., Mormeneo Bayo, S., Martínez Álvarez, R. M., Frutos Millán, V., Villuendas Usón, M. C., Palacián Ruiz, M. P., Arbonés Mainar, J. M., Martínez Jiménez, M. C., & Ramos Paesa, C. (2022). Impacto de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en pacientes con COVID-19 [Impact of *Staphylococcus aureus* bacteremia in COVID-19 patients]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 35(5), 468–474. <https://doi.org/10.37201/req/022.2022>
- 8-Estrada Calles, D. M., Rodríguez Gamboa, M. F., & Velázquez Álvarez, E. A. (2022). Resistencia a antibióticos betalactámicos: situación actual y nuevas estrategias. *RD-ICUAP*, 8(22), 13-27. <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2022.22.682>
- 9-Lezameta, Lizet, Gonzáles-Escalante, Edgar, & Tamariz, Jesús H.. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27(3), 345-351. Recuperado en 17 de febrero de 2024, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342010000300006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342010000300006&lng=es&tlng=es).

- 10-Miranda García, M<sup>a</sup> C.. (2013). Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69(4), 244-248. <https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>
- 11-Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., Gniadkowski, M., Malamou-Lada, E., Martinez-Martinez, L., Navarro, F., Nordmann, P., Peixe, L., Pournaras, S., Rossolini, G. M., Tsakris, A., Vatopoulos, A., & Cantón, R. (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(2), 112–122. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x>
- 12-Morales I, Ricardo. (2003). Tratamiento de bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista chilena de infectología* , 20 (Supl. 1), 24-27. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003020100003>
- 13-Muñoz, A. B. Bacteriemias por Gram negativos en el paciente crítico Tesis de grado. 2019. Disponible en: <https://zagan.unizar.es/record/111534/files/TAZ-TFG-2019-962.pdf>
- 14-Nastro, M., Álvarez, C., Potente, N., Cervino, I., Vay, C., Famiglietti, Ángela, & Rodríguez, C. H. (2023). Caracterización de aislamientos de enterobacterias doble productores de carbapenemasas en un hospital universitario. *Actualizaciones En Sida E Infectología*, 31(113). <https://doi.org/10.52226/revista.v31i113.166>
- 15-Pasteran, F., Veliz, O., Ceriana, P., Lucero, C., Rapoport, M., Albornoz, E., Gomez, S., Corso, A., & ReLAVRA Network Group (2015). Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 53(6), 1996–1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.03026-14>
- 16-Pasteran F, Chavez M, Ceriana P, Lucero C, Menocal A, Gomez S, Corso . A validation of a rapid prediffusion disk assay to determine aztreonam plus avibactam (ATM-AVI) susceptibility for carbapenemase producing Enterobacterales (CPE). Servicio Antimicrobianos, INEI ANLIS “Dr. C. Malbrán”- Buenos Aires (Argentina). ECCMID 2021.
- 17-Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- 18-Pérez VL, Fernández FA, Olivera RY, Puig MY, Rodríguez MA. Infecciones nosocomiales y resistencia antimicrobiana. *Rev Cub Med Int Emerg*. 2019;18 (1):1-17.
- 19-Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of clinical microbiology*, 51(12), 4281–4283. <https://doi.org/10.1128/JCM.01634-13>
- 20-ProcedimientoS en Microbiología Clínica sobre los hemocultivos (Loza Fernández de Bobadilla E (coordinadora). Hemocultivos. 3a. SEIMC 2003). Disponible en:

<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia3a.pdf>

- 21-Rapoport M, Menocal MA, Lucero C, Mendieta J M, Tuduri E, Pasteran F, Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET-Argentina, Corso A. Distribución y perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de principales patógenos causantes de bacteriemia (BAC) en Argentina- RED WHONET 2022. XXIII CONGRESO SADI 2023. Poster nro. 0437. Disponible en: <https://infectologia.info/abstracts/distribucion-y-perfil-de-sensibilidad-a-los-antimicrobianos-de-principales-patogenos-causantes-de-bacteriemia-bac-en-argentina-red-whonet-2022/>
- 22-Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017
- 23-Salazar Campoazano A N, & Veliz Castro T I. (2022). Infecciones bacterianas y perfil de resistencia antimicrobiana en pacientes con COVID-19. *Revista Científica FIPCAEC (Fomento De La investigación Y publicación científico-técnica multidisciplinaria)*. ISSN : 2588-090X . Polo De Capacitación, Investigación Y Publicación (POCAIP), 7(4), 1759-1772. Recuperado a partir de <https://fipcaec.com/index.php/fipcaec/article/view/707>
- 24- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- 25-Soloaga R.. Criterios de interpretación de hemocultivos: análisis crítico de diversas pautas. Biomérieux, 2010. Disponible en: <https://revistabioanalis.com/images/flippingbook/Rev36%20n/nota3.pdf>
- 26-Touchet, Nancy Melgarejo, Busignani, Sofía, Dunjo, Pamela, Brítez, Mariel, Kawabata, Aníbal, Silvagni, Marlene, Rojas, Carolina, Mereles, Eva, López, Evelyn, Salinas, Juana, Scavone, Natalia, Abreu, Karina, Colman , Jessy, Medina, Betania, Irala, Juan, Goertzen, Stefan, López, Vanesa, Ortiz, Rosana, Lird, Graciela, & Martínez Mora, Mario. (2021). Primer informe de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas en hospitales de Paraguay. Año 2021.. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* , 19 (3), 35-43. Publicación electrónica del 00 de diciembre de 2021. <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.03.35>
- 27-<http://antimicrobianos.com.ar/2021/02/protocolo-predifusion-rapida-aztreonam-avibactam/>. Fecha de consulta: 23 de Enero de 2024

- 28-<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2019/06/Protocolo-COLISTIN-DROP-TEST.pdf>. Fecha de consulta: 24 de Enero de 2024
- 29-[https://www.biofire.com/wp-content/uploads/2016/06/HTFA-PRT-0049\\_Torch\\_Melting\\_Curve\\_Analysis\\_Tech\\_Note.pdf](https://www.biofire.com/wp-content/uploads/2016/06/HTFA-PRT-0049_Torch_Melting_Curve_Analysis_Tech_Note.pdf). Fecha de consulta: 24 de Enero de 2024
- 30-<https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/227042/20200320>. Fecha de consulta: 10 de Febrero de 2024
- 31-[http://static.bd.com/documents/eifu/500008940\\_ZLU\\_A\\_SD\\_500008940\\_ES.pdf](http://static.bd.com/documents/eifu/500008940_ZLU_A_SD_500008940_ES.pdf). Fecha de consulta: 11 de Febrero de 2024

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Stano', written in a cursive style with a long horizontal stroke at the bottom.