

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

TÍTULO

“Evaluación de la actividad *in vitro* de fosfomicina por el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito, periodo 2017-2018”

AUTORA

Katherine Estefanía Mariño Brito

DIRECTOR

Mtr. José Eduardo Villacís Acuña

QUITO, 2019

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Katherine Estefanía Mariño Brito**, C.I. **171712038-8**; autora del trabajo de graduación intitulado: **“Evaluación de la actividad *in vitro* de fosfomicina por el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito, periodo 2017-2018”**, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **FACULTAD DE MEDICINA**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Katherine Estefanía Mariño Brito,
C.I. 171712038-8

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Bioquímica Clínica de la Srta. Katherine Estefanía Mariño Brito sobre el tema “**Evaluación de la actividad *in vitro* de fosfomicina por el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito, periodo 2017-2018**” ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'José Eduardo Villacís Acuña', written in a cursive style.

José Eduardo Villacís Acuña, Mtr.

Director

Quito, 2019

DEDICATORIA

A DIOS, por su protección y bendiciones.

A mis abuelitos Gloria, Genoveva y Antonio, por su sabiduría y cariño.

A mis padres Lola y Mario, por sus enseñanzas y todos los esfuerzos realizados para nuestra familia.

A mis hermanos Mario y Gabriel, por cuidarme siempre y ser mi ejemplo a seguir.

A mi novio Kevin, por ser mi apoyo y llenarme de amor y felicidad en cada momento.

A mi tía Magda, mis padrinos Patricio y Alicia, mis amigos Patricio Páliz y Anita Andrade Marín.

Y a toda mi familia y amigos.

Con mucho cariño les dedico mi esfuerzo empleado en la realización de este trabajo, gracias por su apoyo incondicional, todos complementan mi vida.

AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica, Facultad de Medicina Carrera de Bioquímica Clínica, y a cada uno de los profesores que, debido a su gran calidad humana y profesional, me han proporcionado un sinfín de aprendizajes académicos y personales.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y al grupo de trabajo del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM). Gracias Xavi, Rafa, Kathy, Caro, Karlita, Ruth y principalmente a Vivi, por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

Un especial agradecimiento a mi director y maestro Mtr. Eduardo Villacís por su orientación, ayuda y confianza.

A mis lectores Dr. Santiago Escalante y Mtr. Andrés Zabala, porque además de guiarme en la elaboración del presente escrito, han sido grandes maestros para mi formación.

¡MUCHAS GRACIAS!

RESUMEN

Introducción: Debido al incremento de microorganismos multirresistentes, han resurgido antimicrobianos antiguos como la fosfomicina. El interés que ha despertado se debe a que posee un mecanismo de acción único y tiene actividad bactericida de amplio espectro, incluyendo a las enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC). Sin embargo, datos que demuestren la experiencia sobre la evaluación de la susceptibilidad y el uso terapéutico de este antibiótico en infecciones graves, son escasos. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de fosfomicina por el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos. **Métodos:** La susceptibilidad *in vitro* a fosfomicina fue determinada por duplicado mediante el método de referencia “dilución en agar” y el método de difusión en disco. El tamaño de la muestra fue de 150; las especies evaluadas fueron *Klebsiella pneumoniae* (n=125), *Citrobacter freundii* (n=6), *Escherichia coli* (n=4), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Enterobacter cloacae* (n=3), *Klebsiella aerogenes* (n=2), *Morganella morganii* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2), *Citrobacter youngae* (n=1) y *Klebsiella ozaenae* (n=1). El 98,67% de las cepas poseía el gen *bla_{KPC}* y el 1,33% el gen *bla_{NDM}*. **Resultados:** De acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI 2018, el 79,3% de las cepas se ubicó en la categoría sensible, 0,7% intermedio y 16,0% resistente. El acuerdo categórico (CA) obtenido fue 96% con un error menor de 4% entre ambas metodologías. El grado de concordancia calculado a través del índice Kappa, fue 0,88. **Conclusiones:** Fosfomicina demostró buena actividad *in vitro* en las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Puede ser una opción válida para el tratamiento de infecciones producidas por estos microorganismos. **Palabras clave:** Fosfomicina, enterobacterias resistentes a carbapenémicos, dilución en agar, difusión en disco.

ABSTRACT

Introduction: Due to the increase of multidrug-resistant microorganisms, ancient antimicrobials such as fosfomicin have resurfaced. The interest awakened is because it has a unique mechanism of action and has broad-spectrum bactericidal activity, including carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). However, data that demonstrate the experience on the evaluation of the susceptibility and the therapeutic use of this antibiotic in severe infections are scarce. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of fosfomicin by agar dilution and disk diffusion method in strains of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* obtained from clinical isolates. **Methods:** The *in vitro* susceptibility to fosfomicin was determined by agar dilution and disk diffusion method. The sample size was 150; the species evaluated were *Klebsiella pneumoniae* (n = 125), *Citrobacter freundii* (n = 6), *Escherichia coli* (n = 4), *Klebsiella oxytoca* (n = 4), *Enterobacter cloacae* (n = 3), *Klebsiella aerogenes* (n = 2), *Morganella morganii* (n = 2), *Serratia marcescens* (n = 2), *Citrobacter youngae* (n = 1) and *Klebsiella ozaenae* (n = 1). 98.67% of the strains had the *bla_{KPC}* gene and 1,33% the *bla_{NDM}* gene. **Results:** According to the breakpoints established by CLSI 2018, 79,3% of the strains were in the susceptible category, 0,7% intermediate, and 16,0% resistant. A categorical agreement (CA) of 96% and 4% of minor error were obtained between both methodologies. The degree of concordance calculated through the Kappa index was 0,88. **Conclusions:** Fosfomicin demonstrated good *in vitro* activity against strains of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). It could be a valid option for the treatment of infections caused by these microorganisms.

Keywords: Fosfomicin, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, agar dilution, disk diffusion.

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XIII
LISTA DE SIGLAS.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1. JUSTIFICACIÓN	3
1.2. OBJETIVOS	7
1.2.1. Objetivo General.....	7
1.2.2. Objetivos Específicos	7
1.2.3. Limitación del estudio	7
CAPÍTULO II.....	9
2.1. ANTECEDENTES.....	9
2.2. MARCO TEÓRICO	11
2.2.1. Enterobacterias	11

2.2.1.1.	Generalidades	11
2.2.1.2.	Metabolismo y estructura.....	12
2.2.1.3.	Patogenia e inmunidad.....	12
2.2.1.4.	Resistencia antimicrobiana.....	13
2.2.1.5.	Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).....	14
2.2.1.6.	Tratamiento para infecciones causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC)	15
2.2.1.7.	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	18
2.2.1.8.	Método de difusión en disco	18
2.2.1.9.	E-test o prueba epsilométrica	20
2.2.1.10.	Métodos de dilución.....	20
2.2.2.	Fosfomicina	21
2.2.2.1.	Origen y estructura química.....	21
2.2.2.2.	Farmacodinamia (PD).....	22
2.2.2.3.	Mecanismos de resistencia.....	25
2.2.2.4.	Farmacocinética (PK)	29
2.2.2.5.	Programa de optimización para fosfomicina (PROA)	36
2.2.2.6.	Uso de fosfomicina en el sector agrícola	37
2.3.	MARCO CONCEPTUAL.....	38
CAPÍTULO III.....		40
3.1.	MARCO METODOLÓGICO	40
3.1.1.	Materiales y métodos.....	40
3.1.1.1.	Tipo de Estudio.....	40

3.1.1.2.	Tipo de Muestreo.....	40
3.1.1.3.	Tamaño de Muestra.....	40
3.1.1.4.	Criterios de Inclusión	42
3.1.1.5.	Criterios de Exclusión.....	42
3.1.1.6.	Análisis Estadístico.....	42
3.2.	PROCEDIMIENTO	43
3.3.	CONTROL DE CALIDAD.....	44
CAPÍTULO IV		45
4.1.	RESULTADOS	45
4.1.1.	Caracterización de la población de estudio.....	45
4.1.2.	Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de fosfomicina en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).....	47
4.1.2.1.	Método de difusión en disco	47
4.1.2.2.	Método de dilución en agar.....	48
4.1.3.	Comparación de métodos.....	49
4.1.3.1.	Índice Kappa de Cohen	53
4.2.	DISCUSIÓN.....	54
4.3.	CONCLUSIONES.....	58
4.4.	RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....		61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Puntos de corte clínicos para fosfomicina</i>	19
Tabla 2. <i>Tabla de contingencia entre interpretación de resultados y microorganismo. ...</i>	50
Tabla 3. <i>Discrepancias entre método estándar y referencia</i>	51
Tabla 4. <i>Preparación de diluciones</i>	100
Tabla 5. <i>Resultados de los métodos de difusión en disco y dilución en agar de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).</i>	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de β -lactamasas y Carbapenemasas.	15
Figura 2. Ejemplos de zonas de inhibición con discos de fosfomicina	19
Figura 3. Estructura molecular de fosfomicina. Creado con BioRender.....	21
Figura 4. Mecanismo de acción de fosfomicina. Creado con BioRender.....	23
Figura 5. Inactivación de fosfomicina. Creado con BioRender.	27
Figura 6. Estructura molecular de tipos de fosfomicina. Creado con BioRender.	29
Figura 7. Tipo de servicio hospitalario del cual provienen las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos.	45
Figura 8. Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos.	46
Figura 9. Diagrama circular de recuento de microorganismo analizado	47
Figura 10. Histograma de diámetros de la zona de inhibición (mm) de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) ante fosfomicina (200 μ g), mediante método de difusión en disco. Líneas rojas corresponden a los puntos de corte establecidos por CLSI 2018.	48
Figura 11. Histograma de la CMI (Concentración mínima inhibitoria) de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), mediante método de dilución en agar. Líneas rojas corresponden a los puntos de corte establecidos por CLSI 2018.	49
Figura 12. Evaluación <i>in vitro</i> de fosfomicina en cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
Figura 13. Diagrama de barras que evidencia en porcentaje los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad.	52
Figura 14. Escatograma que representa errores en las categorías clínicas entre el método de difusión en disco y dilución en agar para fosfomicina.....	53
Figura 15. Plantilla para inoculación de muestras y lectura de resultados.....	98

Figura 16. Elaboración de medios de cultivo.....	104
Figura 17. <i>Acinetobacter baumannii</i> , control positivo.	104
Figura 18. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, control negativo.....	105
Figura 19. Procesamiento de muestras.....	105
Figura 20. Lectura de resultados dilución en agar (1).....	106
Figura 21. Lectura de resultados dilución en agar (2).....	106
Figura 22. Lectura de resultados dilución en agar (3).....	107
Figura 23. Lectura de halos de inhibición de controles. Izq: <i>E. coli</i> ATCC 25922; Der: <i>A. baumannii</i>	107
Figura 24. Lectura de halos de inhibición de muestras.....	108

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Autorización INSPI	81
ANEXO 2: Acuerdo de entendimiento para la dirección de tesis en el laboratorio de referencia RAM-Q INSPI.....	82
ANEXO 3: Acuerdo de confidencialidad	89
ANEXO 4: Carta de aprobación CEISH - USFQ.....	91
ANEXO 5: Materiales, equipos y reactivos	93
ANEXO 6: Anonimización de datos	94
ANEXO 7: Recuperación de cepas conservadas.....	94
ANEXO 8: Protocolo difusión en disco (CLSI M02)	95
ANEXO 9: Protocolo dilución en agar (CLSI M07).....	96
ANEXO 10: Algoritmo de evaluación y pertinencia de reporte de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos.	102
ANEXO 11: Cálculo índice <i>kappa</i>	103
ANEXO 12: Imágenes	104

LISTA DE SIGLAS

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico.

ATCC: American Type Culture Collection.

BLEE: β - Lactamasa de espectro extendido.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FDA: Food and Drug Administration (U.S.)

G1pt: Transportador glicerol-3-fosfato.

G-6-P: Glucosa-6-fosfato.

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.

IMP: Imipenemasa.

ITU: Infección del Tracto Urinario.

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa.

MDR: Multidrogo Resistente.

MurA: UDP-GlcNAc enolpiruvil transferasa.

NDM: Nueva Delhi metalo- β -lactamasa.

OXA-48: Oxacilinasa 48.

PDR: Pandrogo resistente.

PROA: Programa de Optimización del uso de Antimicrobianos o Antimicrobial Stewardship Program (ASP).

UhpT: Transportador glucosa-6-fosfato.

VIM: Verona integron-codificada metalo- β -lactamasa.

XDR: Extremadamente drogo resistente.

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es una amenaza para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo socioeconómico a nivel mundial. Las principales causas de la generación y diseminación de bacterias multirresistentes son el uso inadecuado de antibióticos (tanto en el sector de la salud como en el agrícola) y la incorrecta higiene de manos (OMS, 2018).

Entre los microorganismos que ocasionan mayor preocupación, se encuentran las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; son bacilos Gram negativos que habitan en el intestino de varios animales, incluyendo el del ser humano. Algunas especies son relacionadas siempre a enfermedad, mientras que otras como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son parte de la microbiota normal, pero pueden convertirse en patógenos oportunistas (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014). En un inicio, las infecciones por enterobacterias eran tratadas con β -lactámicos, aminoglucósidos, entre otros; los carbapenémicos (doripenem, ertapenem, imipenem y meropenem) se consideraban el último recurso. Sin embargo, el surgimiento de la resistencia a carbapenémicos, especialmente por la producción de carbapenemasas como IMP (imipenemasa), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), NDM-1 (Nueva Delhi metalo- β -lactamasa-1), OXA-48 (oxacilinasas-48) y VIM (Verona integron-codificada metalo- β -lactamasa), ha reducido las opciones a colistín, tigeciclina, gentamicina y fosfomicina (Muñoz-Price *et al.*, 2013; Salgado, Gilsanz, & Maseda, 2015).

La fosfomicina, es un derivado del ácido fosfónico con actividad bactericida de amplio espectro, actúa inhibiendo la síntesis de peptidoglucano provocando la muerte celular bacteriana (Docobo *et al.*, 2015). Estudios clínicos han demostrado que fosfomicina es un antimicrobiano útil en terapia combinada para varios tipos de infecciones asociadas a enterobacterias multidrogo resistentes (MDR) con efectos adversos usualmente leves

(Gardiner *et al.*, 2018; Grabein, Graninger, Rodríguez, Dinh, & Liesenfeld, 2017; Joukhadar *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015; Rosso-Fernández *et al.*, 2015).

A pesar de lo mencionado, estudios sobre fosfomicina disódica en Ecuador y en Sudamérica son limitados; por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad *in vitro* de fosfomicina ante enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) mediante el método de referencia (dilución en agar) y el método de difusión en disco, con la finalidad de aportar con información científica que ayude al desarrollo de protocolos de trabajo en el área de microbiología y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

CAPÍTULO I

1.1. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los mayores desafíos de salud pública en la actualidad. La agencia “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) revela a través de estadísticas anuales, que al menos 2 millones de personas adquieren una infección resistente a los antibióticos, de las cuales, 23000 personas fallecen. El gasto gubernamental estadounidense dirigido a esta problemática va de 21 a 35 billones de dólares por año (CDC, 2013). Otra evaluación anual en la Unión Europea señala que las bacterias farmacorresistentes generan un gasto de 1500 millones de euros, y provocan 25000 muertes (OMS, 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la resistencia a los antimicrobianos prolonga la estancia hospitalaria, conllevando al incremento de la tasa de mortalidad y el gasto en salud. En Brasil, Bolivia y Perú, más de la mitad de las infecciones hospitalarias son causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos; las pérdidas del producto interno bruto se han estimado entre el 0,4% y el 1,6% (OPS, 2015).

Ante esta crisis, la OMS promueve reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación (OMS, 2017a). En el Ecuador, el organismo encargado de cumplir dichas actividades, incluyendo la estandarización de metodologías, es el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

Uno de los grupos de microorganismos que genera mayor preocupación al CRN-RAM, son las enterobacterias resistentes a carbapenémicos, ya que en el 2017 la OMS las categorizó como Prioridad 1 (CRÍTICA); la lista se fundamentó ante la urgencia (prioridad crítica, alta

o media) del desarrollo de nuevos antibióticos que sean útiles para el tratamiento de infecciones asociadas a estos microorganismos (OMS, 2017b).

Los carbapenémicos son fármacos con amplio espectro bactericida, conocidos previamente como último recurso terapéutico en infecciones graves provocadas por bacilos Gram negativos. No obstante, en Francia en el año de 1993 se identificó la primera enterobacteria productora de carbapenemasa tipo KPC (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011), hecho que promovió el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia epidemiológica a nivel mundial y ha permitido descubrir nuevas variantes de estos mecanismos de resistencia. Años después, se hallaron numerosos brotes de carbapenemasas de clase A, B, C y D en Norteamérica (Bonomo *et al.*, 2017; Bratu *et al.*, 2005; Bush & Jacoby, 2010; Toye, Kraiden, Fuksa, Low, & Pillai, 2009), Sudamérica (Rojas *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2017; Salles, Zurita, Mejía, & Villegas, 2013; Zurita, Parra, & Cartelle, 2010), Europa (Morris *et al.*, 2012; Muñoz-Price *et al.*, 2013) y Asia (Castanheira *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2007).

En un estudio observacional multicéntrico (Argentina, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú y Venezuela) realizado entre 2013 y 2014 se estableció una prevalencia de 21% de enterobacterias resistentes a carbapenémicos con predominancia de la carbapenemasa KPC con 83% (Villegas *et al.*, 2016). Dato semejante al publicado por Rodríguez (2016) de 21,1% en un periodo de 3 años (2013 a 2015) en el Hospital Universitario Departamental de Nariño, y al del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del INSPI-Q (21%) de datos no publicados del año 2017.

La antibioterapia sugerida para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) es de tipo combinado, en la cual se incluyen colistín, tigeciclina, gentamicina y fosfomicina (Muñoz-Price *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2015). El colistín tiene efectos secundarios significativos como nefrotoxicidad y neurotoxicidad (Lim

et al., 2010). Y, además se están documentando resistencias transmitidas por plásmidos (mcr) (Ortega-Paredes, Barba, & Zurita, 2016). La tigeciclina tiene exitosas reseñas en ensayos clínicos, pero solo está indicada en infecciones de piel y partes blandas e infecciones intraabdominales complicadas (Kelly, Mathema, & Larson, 2018). El uso de gentamicina es limitado, debido a los efectos adversos potencialmente graves como ototoxicidad y nefrotoxicidad (Hayward *et al.*, 2018).

En cuanto a fosfomicina, debido a su espectro, farmacocinética, farmacodinamia y vías de administración (oral, intramuscular e intravenoso), se propone su aplicación en todo tipo de infecciones que abarcan: infecciones urinarias, respiratorias, gastrointestinales, meninges, bacteriemia, entre otras (Grabein *et al.*, 2017). Puede ser utilizada en pacientes de todo rango de edad debido a que, no produce metabolitos tóxicos, es fácil de dializar y tiene efectos secundarios mínimos (2%), solo está contraindicada cuando existe hipersensibilidad conocida. De hecho, estudios experimentales han demostrado que tiene efecto protector a la nefrotoxicidad por aminoglucósidos, vancomicina, anfotericina B y colistín. No obstante, datos clínicos que confirmen estas reseñas no están disponibles (Falagas, Vouloumanou, Samonis, & Vardakas, 2016; Gobernado, 2003).

Por consiguiente, para valorar su potencial aplicación como alternativa terapéutica, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad *in vitro* de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar y la medición de los halos de inhibición obtenidos por el método de difusión en disco; los protocolos de trabajo y puntos de corte utilizados, fueron obtenidos de las guías emitidas por las organizaciones internacionales Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018a) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2000).

El interés de comparar los métodos de susceptibilidad disponibles para fosfomicina se debe a que la dilución en agar es utilizada generalmente para investigación o para la confirmación de resultados en centros de referencia, pues es una metodología laboriosa que consume más tiempo en relación con otras metodologías. La microdilución en caldo es la base de la mayoría de los equipos automatizados y junto a la prueba epsilométrica (E-test) otorgan igualmente resultados cuantitativos, no obstante, su aplicación no es recomendada por CLSI ni EUCAST. La difusión en disco es el método cualitativo más utilizado en los laboratorios de bacteriología debido a su rapidez y bajo costo, sin embargo, se han reportado discrepancias con el método de referencia porque existen dificultades al medir la zona de inhibición por la presencia de colonias intra-halo.

Para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de fosfomicina, el CLSI y EUCAST, indican que el método de referencia es la dilución en agar suplementada con 25 mg/L de G-6-P (Glucosa-6-fosfato), ya que la microdilución en caldo (método de referencia para otros antibióticos) puede brindar resultados poco fiables (ISO 20776-1). En cuanto a los puntos de corte clínicos, EUCAST ha definido valores para la interpretación de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) (Sensible ≤ 32 , Resistente > 32 mg/L) y el diámetro de la zona de inhibición (Sensible ≥ 24 , Resistente < 24 mm) en la familia *Enterobacteriaceae*. Mientras que, CLSI solo proporciona puntos de corte de difusión en disco (Sensible ≥ 16 , Intermedio: 13-15, Resistente ≤ 12 mm) y dilución en agar (Sensible ≤ 64 , Intermedio: 128, Resistente ≥ 256 mg/L) para las especies de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* obtenidas de aislados urinarios (CLSI, 2018b; EUCAST, 2018).

Por lo tanto, los resultados del estudio resolverán las siguientes interrogantes: ¿La fosfomicina es eficaz ante enterobacterias resistentes a carbapenémicos? Y la segunda, ¿Cuál es el grado de concordancia entre el método de referencia (dilución en agar) y el método de difusión en disco para fosfomicina?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad *in vitro* de fosfomicina mediante el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al INSPI-Quito, periodo 2017-2018.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de fosfomicina mediante dilución en agar en enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al INSPI-Quito, periodo 2017-2018.
- Determinar la susceptibilidad de fosfomicina mediante el método de difusión en disco en enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al INSPI-Quito, periodo 2017-2018.
- Establecer el grado de concordancia entre el método de referencia (dilución en agar) y el método de difusión en disco para fosfomicina.
- Establecer un algoritmo de evaluación y pertinencia de reporte de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

1.2.3. Limitación del estudio

- Las cepas que no contenían datos epidemiológicos completos fueron una limitante al momento de realizar la base de datos.
- La prevalencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos utilizada en el estudio (21%) es solo de las muestras recibidas en el laboratorio de referencia RAM-Q INSPI.

- Las conclusiones del estudio no se pueden generalizar ni a la familia *Enterobacteriaceae* ni a todas las carbapenemasas, debido a que el 83% de las cepas evaluadas fueron *Klebsiella pneumoniae* y el 98,67% poseía el gen *bla_{KPC}*; ninguno portaba los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* ni *bla_{OXA48}*.

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES

Evaluaciones *in vivo* de fosfomicina han demostrado que las concentraciones de este antibiótico en el intersticio muscular y el plasma están completamente equilibradas para una amplia lista de patógenos clínicamente relevantes. Estos hallazgos apoyan el uso de fosfomicina como un agente de uso en terapia combinada para infecciones graves (Joukhadar *et al.*, 2003). En una revisión y metaanálisis sobre el uso de fosfomicina intravenosa en el que se analizaron 123 estudios en 5527 pacientes con afecciones principalmente de bacteriemia, infecciones al tracto urinario, tracto respiratorio, sistema óseo y sistema nervioso central, se indica que no se observaron diferencias clínicas ni microbiológicas con respecto al tipo de infección y microorganismo; además, se resalta la eficacia de este fármaco al compararlo con otros antibióticos. El perfil de seguridad fue propicio, con eventos adversos usualmente leves. Por lo que se concluyó que la fosfomicina disódica puede ser un arma eficaz para combatir la era multirresistente (Grabein *et al.*, 2017).

De igual manera, se ha encontrado estudios que ahondan sobre evaluaciones *in vitro* de fosfomicina, por ejemplo, la comparación de métodos de dilución en agar, microdilución en caldo y difusión en disco para fosfomicina con el fin de determinar la susceptibilidad ante *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* BLEE, sugiere que fosfomicina tiene una excelente actividad *in vitro* contra estos microorganismos. El único inconveniente es que la fosfomicina solo está aprobada por la FDA para infecciones no complicadas del tracto urinario (ITU) causadas por *E. coli* (de Cueto, López, Hernández, Morillo, & Pascual, 2006).

Un estudio que valoró la susceptibilidad de este antibiótico ante enterobacterias resistentes a carbapenémicos mediante varios métodos como E-test, difusión en disco y dilución en agar, trabajó con 80 aislados productores de KPC, OXA-48, VIM y/o NDM; el 78% de las cepas eran susceptibles a fosfomicina. En cuanto a la comparación de los métodos resultó escasa concordancia con el método de referencia (Kaase, Szabados, Anders, & Gatermann, 2014).

Otra investigación que trabajó con bacterias Gram positivas y Gram negativas recuperadas de varios tipos de muestras reportó que todos los aislados de MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilino resistente) (n = 40), MRCoNS (*Staphylococcus coagulasa* negativo meticilino resistentes) (n = 40) y *E. faecium* resistente a Vancomicina (n = 62) resultaron sensibles a la fosfomicina. En cuanto a las enterobacterias, la sensibilidad fue *E. coli* (97,5%) *K. pneumoniae* (97,3%) y *Enterobacter spp.* (86,9%). Llegando a la conclusión que fosfomicina debe ser considerada como alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones (Karadağ, Çaycı, Bilgin, Günaydın, & Eroğlu, 2014).

En Perú, un estudio transversal, evaluó la susceptibilidad a fosfomicina mediante dilución en agar y difusión en disco. Se utilizaron 266 cepas de *E. coli* BLEE obtenidas de urocultivos. El informe de los resultados fue 72,2% de microorganismos sensibles, 3,8% intermedio y 24,1% resistentes. El grado de concordancia entre los dos métodos fue excelente ($k=0,93$), por lo que señala factible la implementación de la metodología en cepas de *E. coli* BLEE (Lifonzo, Zamudio, & Champi, 2018).

Por estas razones, el protocolo de trabajo establecido por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” de la ciudad de Buenos Aires - Argentina, indica que en casos de aislamientos productores de carbapenemasas, se recomienda evaluar el disco de fosfomicina para que el médico,

en base al resultado pueda considerar su utilización por vía parenteral (WHONET ARGENTINA, 2019).

Respecto a Ecuador, la reciente actualización del Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos X edición (CNMB, 2019), ha incluido la presentación oral y parenteral de fosfomicina. Sin embargo, desde el 2018, a pedido de dos hospitales de cuarto nivel, la Dirección Nacional de Medicamentos y Dispositivos Médicos del Ministerio de Salud, les otorgó una autorización mediante Acuerdo Ministerial 0158-A, para el uso de fosfomicina disódica (N° Autorización: MSP-SNGSP-2018-1598 y MSP-SNGSP-2018-3149) en el tratamiento de infecciones graves producidas por microorganismos resistentes a otros antibióticos presentes en el CNMB vigente (enterobacterias productoras de KPC, multirresistentes).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Enterobacterias

2.2.1.1. Generalidades

La familia *Enterobacteriaceae* comprende el grupo más grande de bacilos Gram negativos (BGN) de relevancia clínica. Su hábitat natural es el intestino de varios animales, incluyendo al ser humano. Los géneros pertenecientes de mayor importancia son *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia spp.*, *Shigella spp.*, y otros más (Tille, 2014). Algunas especies como *Salmonella enterica* serovar Typhi o *Shigella dysenteriae* se relacionan siempre a enfermedad en el ser humano, mientras que otros como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son parte de la microbiota normal, pero

pueden convertirse en patógenos oportunistas provocando infecciones en piel y tejidos blandos, sistema nervioso central, tractos gastrointestinal, respiratorio, urinario, entre otros (Murray *et al.*, 2014).

2.2.1.2. *Metabolismo y estructura*

Las enterobacterias son microorganismos fermentadores de glucosa, reductores de nitrato, catalasa positivos y oxidasa negativos. Crecen en medios no selectivos y selectivos de forma anaerobia y aerobia. No forman esporas y pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos (Murray *et al.*, 2014).

Tienen pared celular, una estructura que rodea a la membrana plasmática protegiéndola del medio externo, y a su vez, mantiene la forma y rigidez celular. Está compuesta por un polímero de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil murámico llamado peptidoglucano. A diferencia de las bacterias Gram positivas, las Gram negativas tienen solo una capa fina de peptidoglucano y una membrana externa con intensa carga negativa compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos (Tortora, Funke, & Case, 2007). Entre las dos membranas se encuentra el espacio periplásmico (periplasma) que contiene enzimas degradantes (Ej.: colagenasas, hialuronidasas, proteasas y β -lactamasas) y sistemas de transporte (Brooks, Carrol, Butel, Morse, & Mietzner, 2010).

El lipopolisacárido (LPS) es el principal antígeno de la pared celular, y está conformado por tres componentes: antígeno común enterobacteriano; polisacárido O (específico de género y especie) y lípido A (responsable de la actividad de la endotoxina) (Murray *et al.*, 2014).

2.2.1.3. *Patogenia e inmunidad*

Existen factores de virulencia comunes en todos los géneros y otros específicos a cepas virulentas. Los que se asocian con frecuencia son endotoxina, producción de cápsula, variación de fase antigénica, sistemas de secreción de tipo III, secuestro de factores de

crecimiento, resistencia al efecto bactericida del suero y resistencia antimicrobiana (Murray *et al.*, 2014).

2.2.1.4. Resistencia antimicrobiana

La capacidad que tienen los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* para desarrollar mecanismos de resistencia, junto al uso indiscriminado de antibióticos ha favorecido la aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a antimicrobianos; según el grado de resistencia se clasifican como MDR, XDR y PDR (Pérez, Galán, Gutiérrez, & Guerrero, 2014). Entre los numerosos mecanismos de resistencia destacan modificación del blanco (PBP), impermeabilidad, bombas de expulsión (Eflujo) y producción de enzimática (β -lactamasas) (Casellas, 2011).

- a. **β -lactamasas:** Enzimas responsables de la resistencia a la acción de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico en su estructura molecular (Pérez *et al.*, 2014).
 - **β -lactamasas de espectro extendido (BLEE):** Tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas oximino-cefalosporinas (ceftriaxona, ceftazidima, cefepime) y monobactámicos (aztreonam). No tienen acción ante cefamicinas (cefoxitina) ni carbapenémicos. Son inhibidas por el ácido clavulánico (Pérez *et al.*, 2014).
 - **AmpC:** Cefalosporinasas dirigidas hacia cefalosporinas de primera y de segunda generación. Se incluyen también las cefamicinas y en menor medida a las de tercera generación. No son eficaces ante cefalosporinas de cuarta generación. Son inhibidas por cloxacilina y ácido fenil borónico (APB), pero no por ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam (Pérez *et al.*, 2014).

- **Carbapenemasas:** Hidrolizan a los carbapenémicos, una clase de antibióticos β -lactámicos que tienen amplio espectro y capacidad bactericida. No afectan a los monobactámicos (Ho Jeon *et al.*, 2015).

2.2.1.5. *Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC)*

Hasta 1990, la resistencia a carbapenémicos era infrecuente, generalmente se debía a la producción de BLEE o AmpC, añadida a la pérdida de porinas en la membrana externa (Casellas, 2011). En la actualidad, la mayoría de las carbapenemasas presentes en enterobacterias están mediadas por plásmidos, los cuales pueden diseminarse de varias maneras entre los aislados bacterianos. La clasificación de Ambler exhibe cuatro clases moleculares (A, B, C y D) catalogadas en base a su peso molecular y homología proteica (Bush, 2018); paralelamente Bush y Jacoby (2010) complementan la clasificación fundamentándose en el tipo de cada enzima (Ver **Figura 1**). Las serín proteasas son las de clase A, C y D mientras que las de clase B son metaloenzimas dependientes de zinc (Ho Jeon *et al.*, 2015).

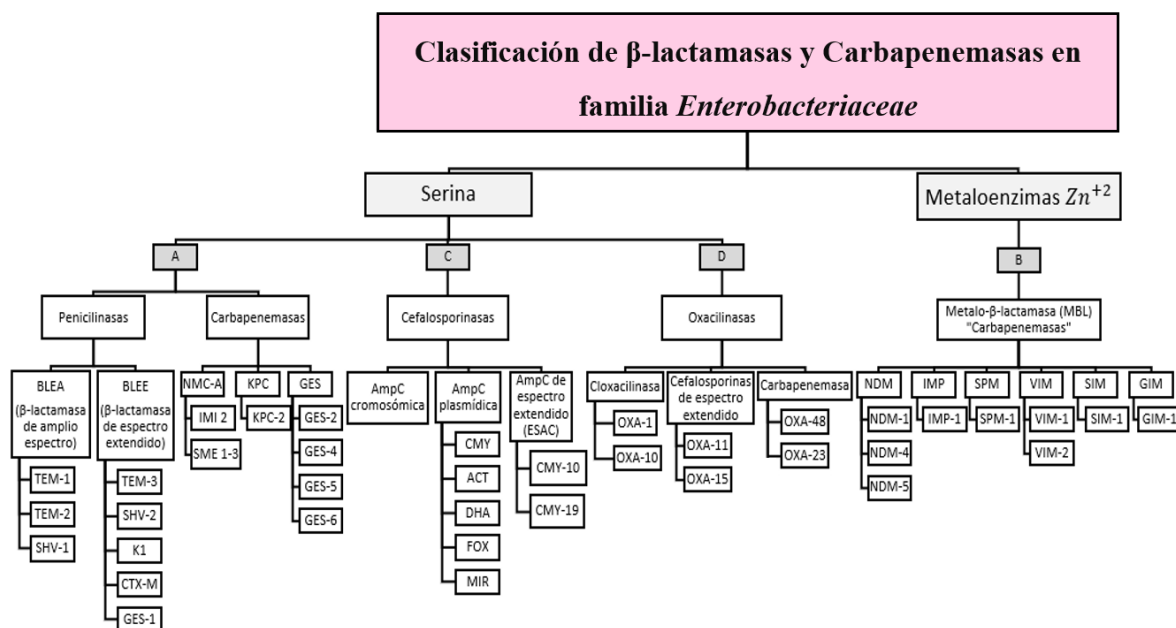


Figura 1. Clasificación de β-lactamasas y Carbapenemasas.

Autor: Mariño, E.

Fuente: (Bush, 2018; Bush & Jacoby, 2010; Ho Jeon *et al.*, 2015).

Originalmente, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) definió que una enterobacteria se cataloga como ERC cuando no era susceptible a imipenem, meropenem o doripenem, y resistente a todas las cefalosporinas de tercera generación. A partir del 2015, el mismo centro determinó que una ERC es aquella que presente una carbapenemasa o tenga una CMI ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ en los antibióticos imipenem, meropenem, o doripenem; en el caso del ertapenem una CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ (Livorsi *et al.*, 2018).

2.2.1.6. Tratamiento para infecciones causadas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC)

La elección del tratamiento adecuado para las infecciones causadas por ERC es todo un desafío, debido a que existen pocas alternativas terapéuticas, pues estos

microorganismos, a pesar de ser resistentes a los β -lactámicos, también son resistentes a quinolonas, TSX (Trimetoprim-sulfametoxazol), entre otros. Por tal razón, los antimicrobianos que permanecen activos son colistín, fosfomicina, tigeciclina y algunos aminoglucósidos (Morril, Pogue, Kaye, & LaPlante, 2016; Sheu, Chang, Lin, Chen, & Hsueh, 2019; Toye *et al.*, 2009).

Colistín es un polipéptido cíclico que pertenece al grupo de las polimixinas. Tiene actividad bactericida. Su mecanismo de acción es alterar la permeabilidad de la membrana externa bacteriana. Tiene considerables efectos adversos como nefrotoxicidad y neurotoxicidad. La tigeciclina, es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de proteínas. La FDA (Food and Drugs Administration) indica que solo debe utilizarse para el tratamiento de neumonías comunitarias, infecciones intraabdominales y de piel y de tejidos blandos; no es apta para septicemia y no atraviesa la barrera hematoencefálica. Se recomienda siempre combinar con otros antibióticos, para prevenir falla terapéutica. Ya que se han reportado recurrencias y desarrollo de resistencias, debido a su bajo nivel de concentración. Gentamicina (aminoglucósido), también inhibe la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles. Útil para infecciones del tracto urinario (ITU). En monoterapia ante ERC es ineficaz (Codjoe & Donkor, 2017; Morrill *et al.*, 2016).

La Guía de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para el Diagnóstico y tratamiento de las infecciones invasivas causadas por *Enterobacteriaceae* multirresistentes, indica que la terapia debe ser personalizada en base a los resultados de susceptibilidad, el tipo de infección y la gravedad de la enfermedad. En infecciones graves se recomienda la terapia combinada, ya que numerosos estudios han determinado que se obtiene una tasa de éxito significativamente mayor que en la monoterapia (Rodríguez-Baño *et al.*, 2015). Por ejemplo, una investigación en el 2014 manifestó que la terapia combinada con dos o más antibióticos obtuvo una tasa de

mortalidad de 27,4% ante la monoterapia que obtuvo 38,7% (Tzouvelekis, Markogiannakis, Piperaki, Souli, & Daikos, 2014).

En las combinaciones terapéuticas, colistín ha sido el que más prevalece, debido a que ataca a la membrana y permite el paso de los otros antibióticos. Si existe resistencia al colistín, se prefiere el uso de fosfomicina (antimicrobiano que interfiere en la génesis de peptidoglucano) a pesar de la escasa evidencia científica. Cuando en la terapia se incluye a un carbapenémico, se debe comprobar que su CMI sea menor a 4 µg/mL, para obtener resultados eficaces (Morril *et al.*, 2016).

En cuanto a los nuevos medicamentos, se menciona al inhibidor de β-lactamasa (Clase A, C y algunas D) llamado Avibactam. El cual se ha combinado a la cefalosporina ceftazidima (CAZ/AVI), obteniendo la restauración de susceptibilidad frente a todos los microorganismos productores de BLEE y la mayoría de KPC. La FDA lo aprobó en el 2015 para el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario, y en el 2018 para neumonías adquiridas en el hospital y asociadas a ventilación mecánica (Sheu *et al.*, 2019). Uno de los estudios destacados compara CAZ/AVI y colistín, donde se evidenció la superioridad de CAZ/AVI; se asoció con mejores resultados clínicos y disminuyó la tasa de mortalidad (Van Duin *et al.*, 2018).

Meropenem/Vaborbactam, es un inhibidor de serina β-lactamasa que contiene boro. Fue admitido en el 2017 por la FDA para el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario. Ha demostrado tasas de susceptibilidad que van del 66,2 al 100% (Sheu *et al.*, 2019).

Plazomicina es un aminoglucósido sintético de próxima generación. Inhibe las enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Es de amplio espectro, actúa ante cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, incluido los productores de BLEE y carbapenemasas.

Su uso fue aceptado en el 2018 por la FDA para el tratamiento de adultos con infecciones complicadas del tracto urinario (Salgado *et al.*, 2015; Sheu *et al.*, 2019).

Eravaciclina es una tetraciclina de amplio espectro. La FDA aprobó su uso en 2018 para el tratamiento de infecciones intraabdominales complicadas. Refiere tener mayor actividad que la tigeciclina contra CRE (Sheu *et al.*, 2019).

2.2.1.7. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Son pruebas para evaluar de forma *in vitro* la respuesta de los microorganismos ante los antimicrobianos; su resultado puede ser utilizado para la vigilancia epidemiológica y como factor predictivo de eficacia clínica. Es decir, respaldan la elección del tratamiento ante infecciones (Murray *et al.*, 2014). Los principales métodos que se van a enumerar, utilizan el agar Mueller Hinton, el cual debe cumplir los requerimientos de calidad establecidos por organismos reguladores como CLSI, entre los cuales están: 4 mm de grosor del agar, concentración de cationes divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}), pH (7,2 - 7,4) y concentración de timina y timidina (CLSI, 2018a).

2.2.1.8. Método de difusión en disco

Evalúa la susceptibilidad de un microorganismo frente a antibióticos impregnados en discos. La zona donde se ha inhibido el crecimiento, será directamente proporcional a la susceptibilidad de la bacteria y se categoriza como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) en base a puntos de corte establecidos por organizaciones internacionales como CLSI o EUCAST (SEIMC, 2000). En la **Tabla 1**, se indican los puntos de corte clínicos para fosfomicina.

Tabla 1.
Puntos de corte clínicos para fosfomicina

	EUCAST					CLSI					
	Potencia de disco (µg)	Diámetro de disco (mm)		CMI (mg/L)		Diámetro de disco (mm)			CMI (mg/L)		
<i>Enterobacteriaceae</i>		S	R	S	R	S	I	R	S	I	R
Fosfomicina oral / IV	200	≥24	<24	≤32	>32						
<i>Escherichia coli</i> (ITU)											
Fosfomicina	200					≥16	13-15	≤12	≤64	128	≥256

Fuente: (CLSI, 2018b; EUCAST, 2018).

EUCAST, señala que se debe tener especial cuidado en la lectura de los halos de inhibición de fosfomicina, debido a que es común la presencia de colonias intra-halo. El mecanismo de resistencia subyacente a estas colonias mutantes ha sido analizado en cepas de *E. coli*. Lucas *et al.* (2018) llegó a la conclusión que las colonias mutantes internas no susceptibles pueden ocurrir debido a la pérdida de la función o la eliminación del transportador *uhpT* (codificado por el gen *uhpA*) y confirma que es seguro no tomarlas en cuenta. Por lo tanto, las colonias ubicadas dentro del halo no se deben considerar, se debe medir el diámetro del halo definido. En la **Figura 2**, se muestran ejemplos de lectura de disco de fosfomicina.

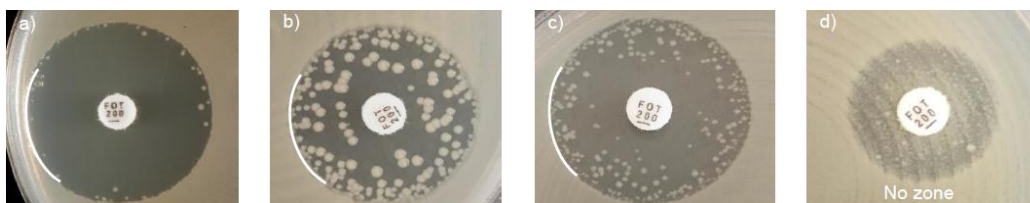


Figura 2. Ejemplos de zonas de inhibición con discos de fosfomicina

a-c): Ignorar todas las colonias intra-halo, medir en base al borde definido del halo de inhibición. **b):** Sin zona de inhibición.

Fuente: (EUCAST, 2018).

2.2.1.9. E-test o prueba epsilométrica

Es una prueba en la cual, una tira de 5 x 50 mm posee un gradiente continuo exponencial de concentración de un antimicrobiano. Tiene una escala de interpretación de resultados en µg/mL en la parte superior. La lectura de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) se da en aquel punto de intersección entre la tira y el borde más pequeño de la zona de inhibición (Cavaliere *et al.*, 2005).

2.2.1.10. Métodos de dilución

Los métodos de dilución en caldo o agar, se utilizan para cuantificar la actividad *in vitro* de los antimicrobianos (CLSI, 2012).

- a. Dilución en agar:** La dilución en agar es un método en el cual, el agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar. Se trabajan con concentraciones diferentes en varias placas. Los inóculos de los microorganismos (alrededor de 10^4 UFC por muestra) se aplican sobre la superficie del agar dentro de 15 minutos. Para determinar el punto final, se colocan las cajas en una superficie oscura, se registra la CMI que tenga la menor dilución que ha inhibido completamente el desarrollo bacteriano. No se considerará el desarrollo de una colonia o una sutil película causada por el depósito del inóculo (CLSI, 2012).
- b. Dilución en caldo:** Se basa en la determinación de crecimiento bacteriano en diluciones seriadas del antibiótico con un medio de cultivo (caldo). El punto final se define por la falta de turbidez del caldo, y se establece la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (SEIMC, 2000).
- **Macro dilución:** Por cada combinación de microorganismo y antimicrobiano se utiliza una serie de tubos, incluyendo un control que

contenga caldo sin antibiótico. Cada tubo contiene 1 mL de medio estéril (CLSI, 2012).

- **Microdilución:** A diferencia de la macrodilución, esta prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, con un volumen final por pocillo de 100 µL (CLSI, 2012).

2.2.2. Fosfomicina

2.2.2.1. Origen y estructura química

Compuesto aislado por primera vez en España en 1969 en especies de *Streptomyces*. Es un antibiótico de naturaleza epoxídica, derivado del ácido fosfónico. Es hidrosoluble, de bajo peso molecular (138 g/mol), y alcanza una excelente concentración en la mayoría de los tejidos. Tiene actividad bactericida de amplio espectro (Ver **Figura 3**) (Falagas *et al.*, 2016).

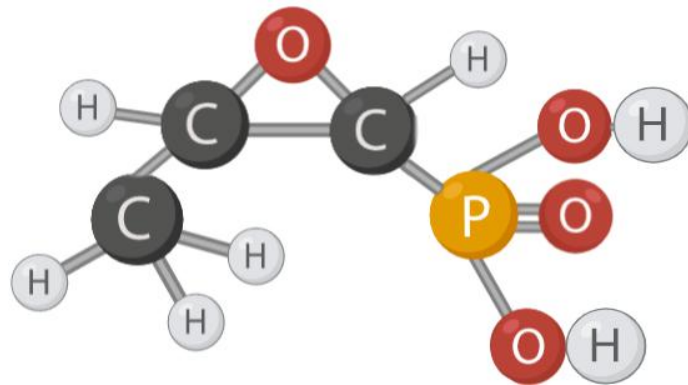


Figura 3. Estructura molecular de fosfomicina. Creado con BioRender.

Autor: Mariño, E.

Fuente: (Falagas *et al.*, 2016).

2.2.2.2. **Farmacodinamia (PD)**

- a. **Mecanismo de acción:** La fosfomicina bloquea irreversiblemente la condensación de UDP-N-acetil glucosamina con p-enolpiruvato, al unirse covalentemente a MurA (UDP-GlcNAc enolpiruvil transferasa), paso primordial en la síntesis de peptidoglucano (Ver **Figura 4**). Lo que conlleva a la muerte celular bacteriana (Docobo *et al.*, 2015; Musmade, Poonam, Sunil, & Agasti, 2013).

- b. **Espectro de acción:** Se considera que fosfomicina es activa ante bacterias Gram negativas (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, etc) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, etc). Además, microorganismos fastidiosos como *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aerococcus urinae* y *Helicobacter pylori*. Sin embargo, no tiene acción ante anaerobios como *Bacteroides spp.* (Falagas *et al.*, 2016).

Microorganismos intrínsecamente resistentes son *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus capitis*, *S. saprophyticus* y *Mycobacterium tuberculosis* (Falagas *et al.*, 2016). Previamente, *Pseudomonas aeruginosa* estaba catalogada igual, pero a partir del 2018, CLSI la eliminó de la categoría (CLSI, 2018b).

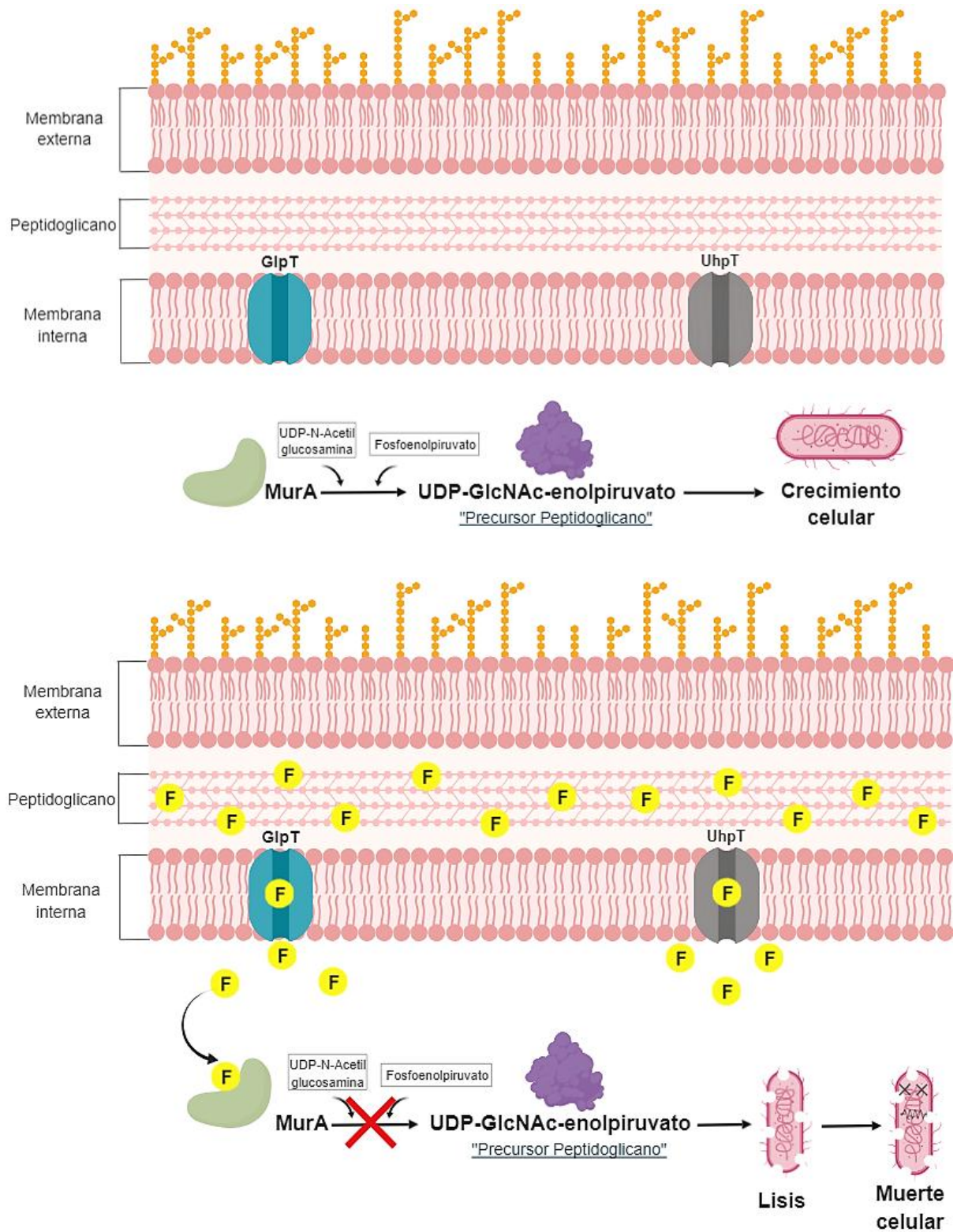


Figura 4. Mecanismo de acción de fosfomicina. Creado con BioRender.

Autor: Mariño, E.

Fuente: (Castañeda, Blázquez, & Rodríguez, 2013; Gales & Vignoli, 2018).

- c. Actividad inmunomoduladora:** Se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, que fosfomicina afecta la función de la inmunidad humoral y celular. Suprime la producción de proteínas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-1 α , IL-6, IL-2 (Linfocito-T), leucotrieno B4 (LTB4-Neutrófilo) e IL-8 ARNm por LTB4 (monocito); incrementa la producción de IL-10 de linfocitos, monocitos y neutrófilos para inhibir la síntesis de citocinas (Morikawa, Oseko, & Morikawa, 1993; Sauermann *et al.*, 2007).
- d. Actividad en biopelículas:** Experimentos donde se ha ensayado a fosfomicina sola y en combinación de forma *in vitro* y en modelos de infección, revelaron que tiene la capacidad de penetrar en biopelículas. Fue la única capaz de erradicar de *E. coli* (CTX-M15) en comparación con gentamicina, colistín y tigeciclina; sin embargo, la combinación colistín/fosfomicina tuvo la mayor tasa de curación (Corvec, Taffin, Betrisey, & Borens, 2013). En cuanto a biopelículas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), se expuso que fosfomicina asociada a rifampicina erradicaron un 83% de la población bacteriana (Mihailescu *et al.*, 2014). Fosfomicina/tobramicina para inhalación (FTI)(4:1), tiene propiedades que pueden curar infecciones respiratorias crónicas, por ejemplo, infecciones por biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes que tengan bronquiectasia con y sin fibrosis quística (Anderson, Kenney, MacLeod, Henig, & O'Toole, 2016).
- e. Actividad bactericida intracelular:** Tiene excelente efecto bactericida en el crecimiento intracelular de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (intrafagosomal) y *L. monocytogenes* (intracitosólico) analizadas en líneas

celulares Caco-2 (Enterocito) (Okada, Nishio, & Danbara, 2003) y de *S. aureus* intra-osteoblásticos (Valour, Trouillet, & Laurent, 2015).

2.2.2.3. **Mecanismos de resistencia**

- a. **Heterorresistencia:** Es el fenotipo dominante en especies de *Streptococcus pneumoniae*, ya que contienen la proteína MurA1 (Engel, Gutiérrez-Fernández, Flückiger, Martínez-Ripoll, & Mühlemann, 2013).
- b. **Resistencia inherente:** Debido al mecanismo de acción único y a la estructura molecular de fosfomicina, la resistencia cruzada es poco común. Se ha descrito mutaciones en la enzima MurA (*Chlamydia spp.*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio fischeri*) y reciclaje de peptidoglucano (*Pseudomonas sp.*) (Falagas *et al.*, 2016).
 - **Modificación del blanco (MurA):** A pesar de ser el mecanismo de mayor prevalencia en bacterias, es inusual en microorganismos resistentes a fosfomicina. En *E. coli* radica en mutaciones en Cys115 (sitio de unión de fosfomicina para inactivar irreversiblemente la enzima MurA) por el aminoácido aspartato (Gales & Vignoli, 2018).
- c. **Resistencia adquirida:** Mutaciones que afectan a los sistemas de transporte de nutrientes dependientes de AMPc (GlpT y UhpT) y enzimas que modifican el antimicrobiano son los principales descritos (Castañeda *et al.*, 2013).
 - **Transportador Glpt (Transportador de glicerol-3-fosfato):** El represor de este transportador, la proteína GlpR, se une cerca de la región promotora del gen *glpT*, bloqueando la transcripción y generando la resistencia (Gales & Vignoli, 2018).

- **Transportador UhpT (Transportador de glucosa-6-fosfato):** Se encarga de transportar hexosa-fosfato, provocando la acumulación de glucosa-6-fosfato y permitiendo la entrada de fosfomicina a la bacteria. Este sistema está regulado por los genes *uhpA*, *uhpB* y *uhpC*, la inactivación de cualquiera puede generar la resistencia (Falagas *et al.*, 2016).
- **Presencia de adenosín monofosfato cíclico (AMPc):** Se necesitan altos niveles de AMPc para la expresión de los transportadores en enterobacterias. Mutaciones en genes *cyaA* y *ptsI* causan su reducción en niveles intracelulares. Además, si se inactiva por la presencia del represor AMPc-CRP se impide la expresión de ambos sistemas (Gales & Vignoli, 2018).
- **Modificación del antimicrobiano:** Metaloenzimas que catalizan la apertura del anillo oxirano y quinasas que fosforilan a la molécula para inactivarla (Ver **Figura 5**).
 - **FosA (Glutación S-transferasa):** Es dependiente de Mn^{+2} , agrega glutación al anillo oxirano. Se ha detectado en aislamientos de *S. marcescens*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Por el momento no se ha descrito en bacterias Gram positivas (Falagas *et al.*, 2016; Gales & Vignoli, 2018).
 - **FosB (Tiol S-transferasa):** Enzima dependiente de Mg^{+2} o Mn^{+2} . Rompe el anillo, al unirse al sustrato llamado Bacilitiol. Su presencia se ha descrito en *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecium* y otros (Falagas *et al.*, 2016; Gales & Vignoli, 2018).

- **FosX:** Son hidrolasas dependientes de Mn^{+2} ; catalizan la adición de agua al antibiótico cuando existe un residuo de ácido glutámico en el sitio activo de la enzima. Ha sido hallada en *Listeria monocytogenes* (Falagas *et al.*, 2016; Gales & Vignoli, 2018).
- **FosC:** Descrita en *Pseudomonas syringae*; cataliza la fosforilación con ATP (Castañeda *et al.*, 2013).
- **FomA y FomB:** Quinasas que fosforilan a fosfomicina para inactivarla. Funcional y estructuralmente se relacionan a FosC. Se ha identificado en *Streptomyces spp.* y *P. aeruginosa* (Castañeda *et al.*, 2013).

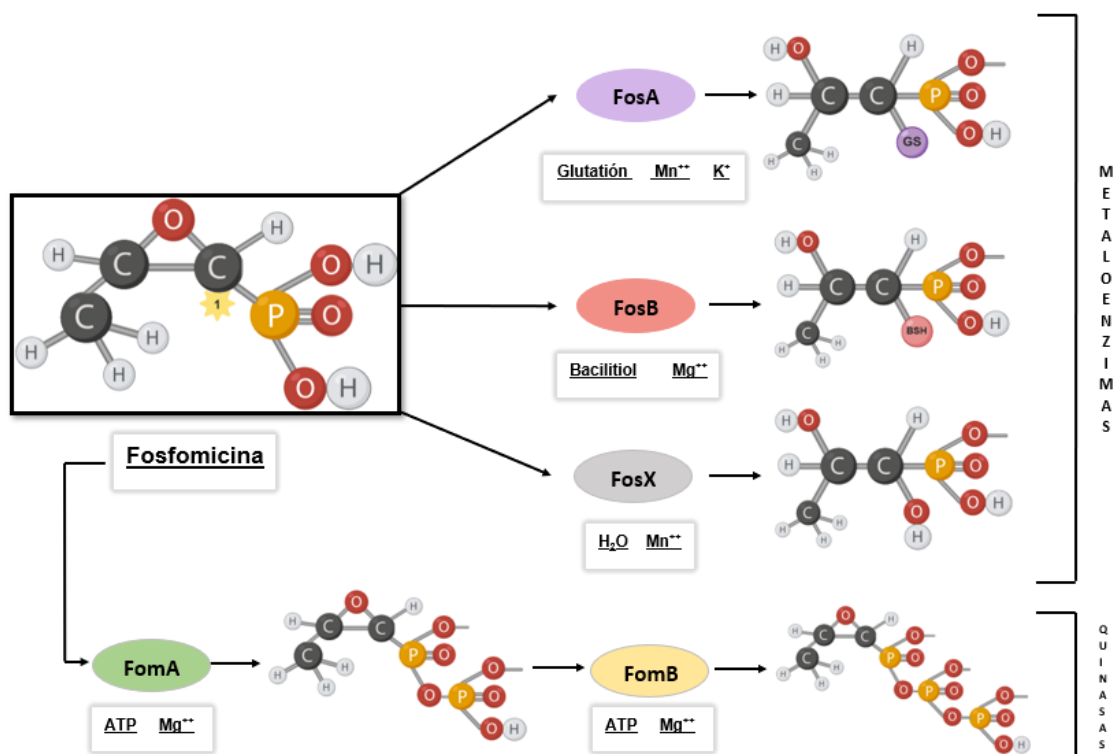


Figura 5. Inactivación de fosfomicina. Creado con BioRender.

Autor: Mariño, E.

Fuente: (Castañeda *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista epidemiológico, la variante FosA3, es la más preocupante debido a que su transmisión es mediante plásmidos. Fue hallada por primera vez en Japón en un estudio comprendido entre el año 2002 al 2007 en una cepa de *E. coli* (Wachino, Yamane, Suzuki, Kimura, & Arakawa, 2010). En los años siguientes se detectó que continuó diseminándose por Asia, a través de muestras de humanos, animales y alimentos (Ho *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2012, 2013; Lee *et al.*, 2012).

El primer reporte de caso de la presencia del gen *fosA3* en Estados Unidos fue en 2015, en una mujer que padecía drepanocitosis y enfermedad renal en etapa terminal, refirió no haber viajado a Asia. Durante 5 años padeció recurrentes ITU por *E. coli* BLEE, y recibió terapia con 6 antibióticos diferentes a fosfomicina. En un cultivo recolectado en el sitio de salida del catéter peritoneal se aisló una cepa de *E. coli* que mediante E-test y dilución en agar obtuvo una CMI > 1024 µg/mL de fosfomicina. Dada la elevada resistencia, se buscó la presencia de los genes *fosA3* y *fosC2*, y se halló el gen *fosA3* (confirmado por secuenciación genética). Las similitudes con el plásmido originario de Asia sugirieron que es probable que este se haya trasladado a Estados Unidos mediante viajes humanos o la importación de alimentos (Alrowais *et al.*, 2015).

Jiang *et al.* (2015) evaluó mediante dilución en agar la susceptibilidad a fosfomicina de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE (n=80) y KPC (n=278); las que resultaron resistentes fueron procesadas para detectar los genes *fosA*, *fosA3* y *fosC2* mediante amplificación por PCR. Complementariamente, ejecutó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y halló que aparte de que la mayoría de los aislamientos estaban relacionados clonalmente, 94 cepas de *K. pneumoniae* KPC-2 portaban el gen *fosA3*, es decir, estos microorganismos eran resistentes a las cefalosporinas, carbapenémicos y a la fosfomicina.

2.2.2.4. Farmacocinética (PK)

- a. **Uso clínico:** Su disponibilidad comercial es: oral (fosfomicina trometamol y fosfomicina cálcica), intramuscular y endovenosa (fosfomicina disódica) (Ver **Figura 6**).

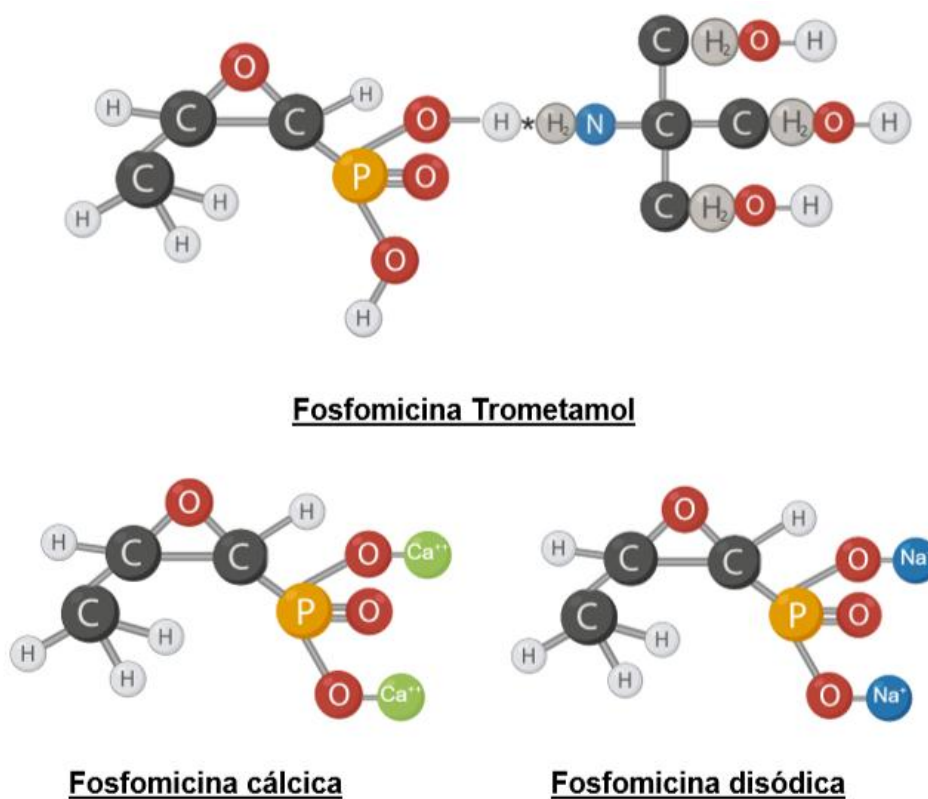


Figura 6. Estructura molecular de tipos de fosfomicina. Creado con BioRender.

Autor: Mariño, E.

Fuente: (Falagas *et al.*, 2016).

- **Fosfomicina oral:** Su absorción ocurre en el intestino delgado y es excretada sin metabolizar en la orina (Roussos, Karageorgopoulos, Samonis, & Falagas, 2009). La velocidad y el grado de absorción de fosfomicina trometamol es seis veces mejor que fosfomicina cálcica (Borsa, Leroy, Fillastre, Godin, & Moulin, 1988).

- **ITU (Infección del tracto urinario) no complicadas:** Una dosis única de 3 g de fosfomicina trometamol llega al pico de concentración máxima a las 4 horas, el cual, se mantiene de 1 a 2 días (Keating, 2013).
- **Fosfomicina disódica (endovenosa):** Gracias a que su unión a proteínas plasmáticas es despreciable, tiene excelente penetración en el tejido subcutáneo, muscular, pulmonar, óseo, entre otros. La eliminación no renal es insignificante, el 95% es excretada sin cambios por la orina (Michalopoulos, Livaditis, & Gougoutas, 2011). A partir de la técnica de microdiálisis, se demuestra su capacidad de penetración (Joukhadar *et al.*, 2003).
 - **Piel y tejidos blandos:** Una dosis única de 8 g de fosfomicina tiene una elevada capacidad de penetración en el líquido intersticial de los tejidos blandos; alcanza niveles de concentración adecuados para inhibir y erradicar *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. marcescens*, *Enterobacter cloacae* y *P. aeruginosa* (Frossard *et al.*, 2000; Joukhadar *et al.*, 2003).
 - **Tracto respiratorio inferior:** Los perfiles farmacocinéticos de tejido pulmonar infectado son similares al plasma y tejido pulmonar sano, lo que indica que fosfomicina penetra eficazmente y tiene la habilidad de ejercer su efecto bactericida en colonias de MRSA y enterobacterias productoras de BLEE (Matzi *et al.*, 2010).
 - **Hueso:** Mediante la administración de 100-200 mg/kg a pacientes con pie diabético, se demostró que fosfomicina es altamente efectiva ante infecciones por *S. aureus* y MRSA (*S. aureus* meticilina-

resistente), ya que tiene capacidad de unirse al tejido óseo por su similitud estructural con la hidroxapatita (Legat *et al.*, 2003; Schintler *et al.*, 2009).

– **Sistema Nervioso Central (SNC) y LCR (líquido cefalorraquídeo):**

En pacientes que mantenían intacta la barrera hematoencefálica se demostró que fosfomicina penetraba adecuadamente para el tratamiento de infecciones; además la penetración a LCR era mayor cuando las meninges estaban inflamadas (Parker, Lipman, Koulenti, Dimopoulos, & Roberts, 2013). Otro estudio farmacocinético reveló que, 8 g c/8 horas durante 5 días proporciona una concentración suficiente de antibiótico en el LCR durante todo el tratamiento (Pfausler *et al.*, 2004).

– **ITU complicadas:** Análisis *in vitro* demuestran la alta susceptibilidad de patógenos urinarios como enterobacterias MDR ante fosfomicina; sin embargo, se recomienda terapia combinada (Neuner, Sekeres, Hall, & van Duin, 2012; Patel, Patel, Shetty, Soman, & Rodrigues, 2017).

– **Endocarditis y bacteriemia (terapia combinada):** La combinación de fosfomicina con linezolid ha resultado una terapia exitosa en infecciones por *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) (Xu-Hong *et al.*, 2014). Junto a doripenem es altamente eficaz ante infecciones por microorganismos resistentes como MRSA, *E. coli* y *K. pneumoniae* (Lingscheid, Tobudic, Poepl, Mitteregger, & Burgmann, 2013). Fosfomicina más imipenem o ceftriaxona sobrepasa significativamente la eficacia de vancomicina en el

tratamiento de endocarditis asociadas a MRSA y *S. aureus* glicopéptido-intermedio (del Ríó *et al.*, 2016).

- **Fosfomicina disódica (intraperitoneal):** Suministrar 4 g de fosfomicina por vía intraperitoneal es efectiva para el tratamiento de peritonitis e infecciones sistémicas (Tobudic *et al.*, 2012).
- **Fosfomicina disódica (inhalatoria):** Se encuentra en investigación, combina fosfomicina (4) con tobramicina (1) para inhalación (FTI) (4:1) con la finalidad de erradicar biopelículas de *P. aeruginosa* (Anderson *et al.*, 2016; Trapnell *et al.*, 2008).

b. Interacción con otros antimicrobianos: Según Morril *et al.* (2016), la terapia combinada (sinergismo) es la mejor opción ante bacterias multirresistentes ya que se aumenta la velocidad de eliminación y por ende, se reduce el desarrollo de resistencias. A continuación, se enuncian los antibióticos que han demostrado efecto sinérgico y antagónico con fosfomicina frente a ciertos microorganismos.

- **Sinergia (Gram negativos)**
 - ***E. coli* – BLEE:** carbapenémicos, aztreonam, colistín, netilmicina y tigeciclina (Samonis, Maraki, Karageorgopoulos, Vouloumanou, & Falagas, 2012).
 - ***K. pneumoniae* – BLEE:** imipenem, colistín, netilmicina, tigeciclina (Samonis *et al.*, 2012).

- ***Enterobacteriaceae-NDM-1: colistín*** (Berçot, Poirel, Dortet, & Nordmann, 2011).
- ***K. pneumoniae RC (Resistente a Carbapenémicos)***: carbapenémicos (70%), colistín (36%), tigeciclina (30%) y netilmicina (42%) (Samonis *et al.*, 2012).
- ***K. pneumoniae – KPC2***: meropenem (65%) y colistín (12%) (Souli *et al.*, 2011).
- ***K. pneumoniae – VIM-2/NDM-2***: colistín y colistín/meropenem (Tängdén *et al.*, 2014).
- ***K. pneumoniae – OXA-48***: imipenem (42%), meropenem (33%) y tigeciclina (33%) (Evren, Kurt, Çolako, & Arslan, 2013).
- ***Acinetobacter baumannii RC (Resistente a Carbapenémicos)***: colistín (73,3%) (Leelasupasri, Santimaleeworagun, & Jitwasinkul, 2018).
- ***Pseudomonas aeruginosa RC***: colistín (22%) (Di *et al.*, 2015), carbapenémicos, aminoglucósidos, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime y ciprofloxacino (Ferrari, Passeri, Vitali, & Martinez, 2013).
- ***Pseudomonas aeruginosa MDR***: imipenem (46.7%), meropenem (53.3%), doripenem (73.3%), colistín, netilmicina y tigeciclina (13.3%) (Samonis *et al.*, 2012).

- **Sinergia (Gram positivos)**
 - ***Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA):** doripenem (95%), linezolid (98%), quinupristin-dalfopristin (100%), ceftriaxona (94%), imipenem (88%), minociclina (87%), rifampicina (50%) (del Río *et al.*, 2016; Duez *et al.*, 2014; Lingscheid *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2011; Tang, Chen, Cheng, *et al.*, 2013; Xu-Hong *et al.*, 2014).
 - ***S. aureus* glicopéptido-intermedio / *S. aureus* vancomicina-intermedio (VISA):** imipenem, linezolid, vancomicina (Pachón-Ibáñez *et al.*, 2011).
 - ***Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE):** teicoplanina (89%), imipenem (100%), ceftriaxona (100%), daptomicina, amoxicilina y linezolid (Descourouez, Jorgenson, Wergin, & Rose, 2013; Tang, Chen, Zhang, *et al.*, 2013).

- **Antagonismo (Gram negativos)**
 - ***K. pneumoniae* – OXA-48:** colistín (Evren *et al.*, 2013).
 - ***Neisseria gonorrhoeae*:** ertapenem (Wind, Vries, & van Dam, 2015).

- **Antagonismo (Gram positivos)**
 - ***Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE):** ampicilina (Tang, Chen, Zhang, *et al.*, 2013).

c. Grupos específicos de pacientes: Puede ser utilizada en pacientes de todo rango de edad y condición. Adultos mayores (CIPLAMED, 2016; Falagas *et al.*, 2016; Laboratorios ERN, 2013), niños y neonatos (Traunmiller *et al.*, 2011), embarazadas incluida la lactancia (Roussos *et al.*, 2009), pacientes en estado crítico (Joukhadar *et al.*, 2003) y pacientes con insuficiencia renal (Gobernado, 2003; Tobudic *et al.*, 2012).

d. Efectos adversos (Fosfomicina sódica): Los efectos secundarios descritos son mínimos (2%) (Falagas *et al.*, 2016; Gobernado, 2003). Su uso está contraindicado cuando existe hipersensibilidad conocida, si no es el caso, es considerada segura (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).

- **Hipersensibilidad:** exantema, urticaria, angioedema y anafilaxis (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).
- **Alteraciones gastrointestinales:** vómito, dispepsia, anorexia, diarrea y náuseas (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).
- **Alteraciones en la función hepática:** aumentos temporales de transaminasas y fosfatasa alcalina (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).
- **Alteraciones hematológicas:** ligera eosinofilia y trombocitosis (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).
- **Otros:** flebitis, broncoespasmo y cefalea (CIPLAMED, 2016; Laboratorios ERN, 2013).

2.2.2.5. Programa de optimización para fosfomicina (PROA)

Un Programa de Optimización del uso de Antimicrobianos (PROA) conocido también como Antimicrobial Stewardship Program (ASP), es un conjunto de estrategias establecidas para reducir el uso inapropiado de antibióticos; a partir de la selección adecuada del antimicrobiano, su dosis, ruta y duración de la terapia (Asociación Panamericana de Infectología, 2016).

Fosfomicina es uno de los antibióticos con gran potencial para ser utilizado en un PROA, debido a que posee varias propiedades, tales como bajo peso molecular, hidrosolubilidad, despreciable unión a proteínas (que le permite alcanzar una excelente concentración en la mayoría de los tejidos), capacidad inmunomoduladora, inhibición de adhesión bacteriana al epitelio, penetración al biofilm, efecto protector a la toxicidad de otros antibióticos y su eficacia contra enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas (Falagas *et al.*, 2016).

Varios estudios señalan que fosfomicina es considerada una óptima alternativa para la terapia antimicrobiana combinada. Ha obtenido exitosos resultados en el tratamiento de bacteriemias, neumonías, infecciones intraabdominales, infecciones de piel y tejidos blandos, entre otras. Se debe a la sinergia que tiene con otros antibióticos; por ejemplo, con β -lactámicos, lipopéptidos (daptomicina) o glucopéptidos (vancomicina) es efectiva contra MSSA y MRSA; con linezolid destruye biopelículas y si se asocia a colistín o aminoglucósidos es eficaz contra bacterias Gram negativas (Múñez, Ramos, & Fernández, 2019).

Por lo tanto, aplicar un PROA para fosfomicina en las instituciones de salud sugiere la reducción de costos, la obtención de mejores resultados clínicos y la disminución de la aparición de microorganismos multirresistentes y los efectos adversos (Múñez *et al.*, 2019).

2.2.2.6. Uso de fosfomicina en el sector agrícola

Un estudio observacional desarrollado en una zona rural de la provincia de Esmeraldas evaluó cepas de *Escherichia coli* presentes en heces de aves de corral y humanos. Se detectó una alta resistencia a cefotaxima (66,1%) en pollos de engorde. Las secuencias de los genes *bla_{CTX-M}* de las bacterias de pollos y humanos eran idénticas, sugiriendo un evento de desbordamiento (término que refiere que la infección surge a partir de un foco animal y se extiende o transmite al humano) (Hedman *et al.*, 2019). Este estudio evidencia que las granjas porcícolas y avícolas tienen gran impacto sobre la selección y propagación de la resistencia antimicrobiana a los humanos.

A pesar de que no existen estudios similares que incluyan a fosfomicina en el perfil, los veterinarios sí la utilizan para controlar varias enfermedades. En aves: colibacilosis, septicemia, coriza infecciosa, síndrome de cabeza hinchada, onfalitis, cólera aviar, tifoidea aviar, artritis bacteriana; en cerdos: complejo respiratorio porcino pleuroneumonía, artritis bacteriana, erisipela, infecciones intestinales, cistitis, pielonefritis y metritis (FARBIOPHARMA S.A., 2017).

El Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Avícolas, indica que fosfomicina debe retirarse dos días antes del sacrificio del animal o la utilización de sus productos. Solo si se cumple esta regla, se garantiza que no existan residuos de medicamentos en la carne y/o derivados para que puedan ser aptos para el consumo humano (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, 2016).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Antibiograma: panel de susceptibilidades *in vitro* a varios antimicrobianos (Ryan & Ray, 2011)

Bactericida: antimicrobiano que inhibe el crecimiento y mata a la población bacteriana (Tortora *et al.*, 2007).

Bacteriostático: antimicrobiano que solo inhibe el crecimiento bacteriano (Tortora *et al.*, 2007).

Colonización: presencia de microorganismos que no alteran las funciones normales del organismo (Murray *et al.*, 2014).

Concentración mínima inhibitoria (CMI): es la menor concentración que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo (CLSI, 2012).

Escala McFarland: referencia para suspensiones bacteriológicas, permite conocer las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro, según una escala de 0,5 a 10 (Winn, Allen, Janda, Koneman, & Procop, 2008).

Espectro: tipos de microorganismos antes los cuales tiene actividad el antimicrobiano (Winn *et al.*, 2008).

MDR: resistencia a al menos un antibiótico de tres o más familias consideradas para el tratamiento de infecciones (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), 2016).

PDR: resistencia a todos los antibióticos de todas las familias habitualmente utilizadas en el tratamiento de la infección (RENAVE, 2016).

Resistencia microbiana: tolerancia que tiene el microorganismo a los antimicrobianos, debido a distintos mecanismos de defensa (Murray *et al.*, 2014)

Resistente: término que indica que un microorganismo no se inhibe por las concentraciones clínicamente posibles de un agente antimicrobiano (Tille, 2014).

Susceptible/Sensible: término que indica que un microorganismo se inhibirá con concentraciones clínicamente posibles de un antimicrobiano (Tille, 2014).

XDR: extensa resistencia; ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de varias familias de antimicrobianos (RENAVE, 2016).

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. Materiales y métodos

3.1.1.1. *Tipo de Estudio*

El estudio fue de tipo descriptivo y transversal. Ya que la descripción se limitó a los hallazgos del laboratorio, no se manipuló las variables independientes, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la susceptibilidad por difusión en disco de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE) caracterizadas por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) en el año 2017 y 2018.

3.1.1.2. *Tipo de Muestreo*

Se realizó un muestreo de tipo aleatorio simple en el que cualquier cepa caracterizada como enterobacteria resistente a carbapenémicos pudo formar parte del estudio.

3.1.1.3. *Tamaño de Muestra*

En el cálculo del tamaño muestral se utilizó la fórmula de población finita con un error del 5% y un intervalo de confianza del 95%. La prevalencia utilizada (21%), fue proporcionada por el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del INSPI-Q de datos no publicados del año 2017.

Población finita:

N = Universo Poblacional

Nivel de confianza = 95% = 0,95 Z = 1,96

E (error)= 0,05 %

p (prevalencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos) = 21%

q = (1-p)

n = tamaño de la muestra

$$n = \frac{NpqZ^2}{(N - 1)E^2 + pqZ^2}$$

N = 310

Z = 1,96

E = 0,05

p = 0,21

q = 0,79

n = tamaño de la muestra

$$n = \frac{310(0,21)(0,79)(1,96)^2}{(310 - 1)(0,05)^2 + (0,21)(0,79)(1,96)^2}$$

$$n = 140,14 = 140$$

$$n = 140$$

Decisión: Con un intervalo de confianza del 95% y un error del 5% se determinó un tamaño de muestra de 140 cepas; pero se amplió a 150 para obtener datos más relevantes.

3.1.1.4. Criterios de Inclusión

- Cepas caracterizadas como enterobacterias resistentes a carbapenémicos.
- Cepas con información epidemiológica completa (microorganismo, Código INSPI, edad, sexo, tipo de muestra y servicio hospitalario) (ANEXO 1).
- Cepas receptadas en el periodo comprendido entre 2017 y 2018.

3.1.1.5. Criterios de Exclusión

- Aislamientos de otros géneros y especies no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.
- Cepas obtenidas de muestras de hisopados rectales (colonizaciones).
- Cepas repetidas por paciente.

3.1.1.6. Análisis Estadístico

Se trabajó con los softwares WHONET 2018, Microsoft Excel y el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 23.0. El análisis fue realizado mediante gráficos estadísticos. En la caracterización de la población de estudio se utilizó diagramas circulares y de barras. La evaluación de la actividad *in vitro* de fosfomicina se representó en histogramas. Para la comparación de métodos se utilizaron tablas, diagrama de barras, escatogramas y por último, se calculó el índice Kappa de Cohen para establecer el grado de concordancia entre ambos métodos.

3.2. PROCEDIMIENTO

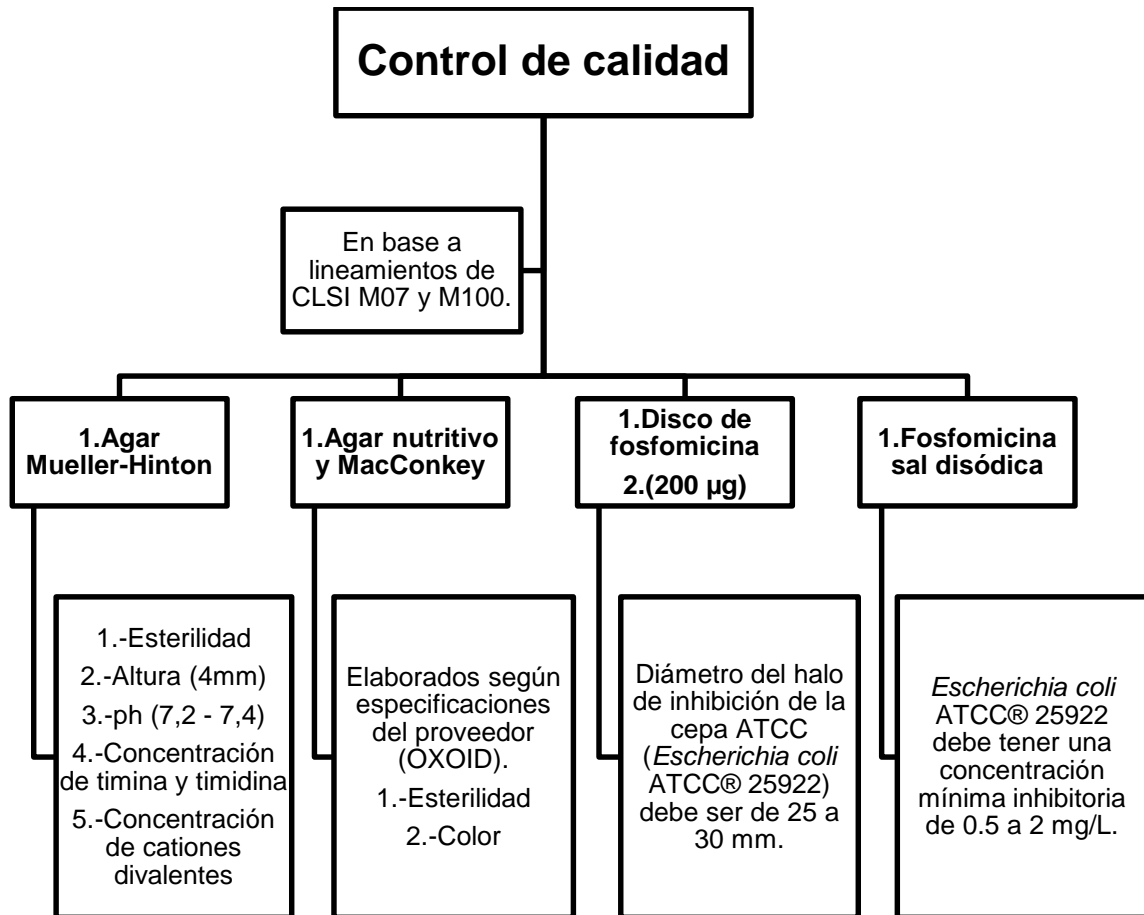
El presente estudio fue realizado en cuatro fases; en la fase uno se elaboró y presentó el Plan de Trabajo de Titulación al Comité de Unidad de Titulación de la Carrera de Bioquímica Clínica. Al ser aprobado, se solicitó el permiso para la ejecución de la investigación en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y por el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito (CEISH-USFQ). Se procedió a firmar acuerdos de entendimiento para la dirección de tesis, uso de muestras y datos epidemiológicos requeridos en el estudio y la declaración de confidencialidad en el laboratorio de referencia RAM-Q INSPI.

En la fase dos, fueron comprados los reactivos y materiales (ANEXO 5). Simultáneamente, se recolectó la información en base de datos WHONET, a partir de la cual, fue creada la base de datos con anonimización (ANEXO 6). Posteriormente, se recuperó las cepas conservadas (ANEXO 7) y se ejecutó el análisis de susceptibilidad de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos, mediante difusión en disco (ANEXO 8) y dilución en agar (ANEXO 9).

La fase tres incluye el ingreso de resultados en sistema informático (Microsoft Excel) y el desarrollo del análisis estadístico en Microsoft Excel, WHONET 2018 y programa informático IBM SPSS Statistics versión 23.0.

Finalmente, en la fase cuatro, se analizaron los resultados obtenidos, se elaboró el algoritmo de evaluación y pertinencia de reporte de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ANEXO 10) y se procedió a la redacción y presentación del Trabajo de Titulación.

3.3. CONTROL DE CALIDAD



CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Caracterización de la población de estudio

Los aislados clínicos utilizados en este estudio provienen en un 34% de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), seguido de las áreas de Hospitalización y Cirugía con un 32,67% y 12,66% respectivamente (Ver **Figura 7**). Datos sugerentes a que estas áreas requieren mayor vigilancia e intervención por los comités de control de infecciones.

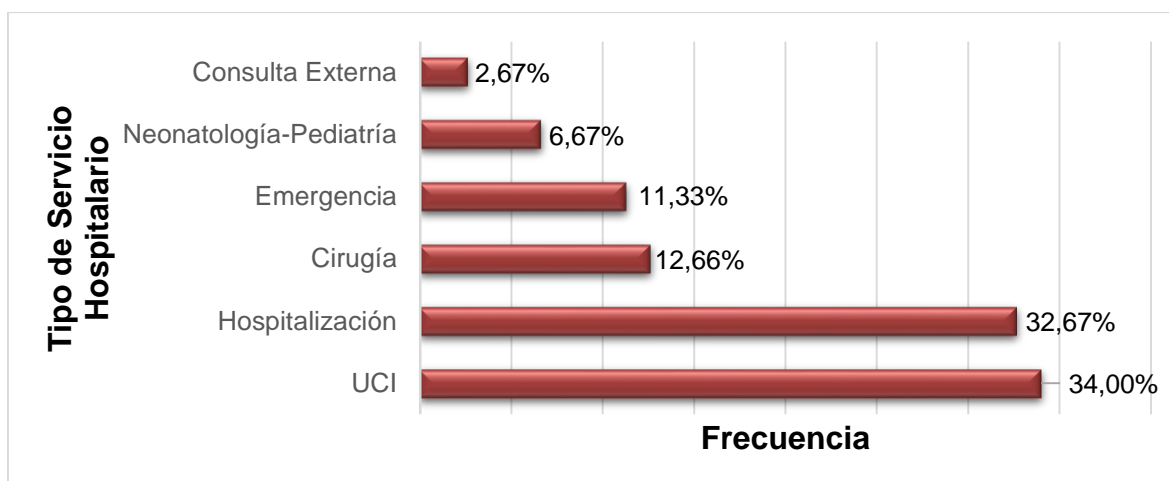


Figura 7. Tipo de servicio hospitalario del cual provienen las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

Autor: Mariño, E.

En la **Figura 8** se indican los tipos de muestras clínicas de los que provienen las cepas. El 36,67% proceden de sangre, el 22,67% de muestras del tracto respiratorio y el 18,67% de orina. El tratamiento requerido para todos los mencionados puede ser fosfomicina en combinación con otros antibióticos.

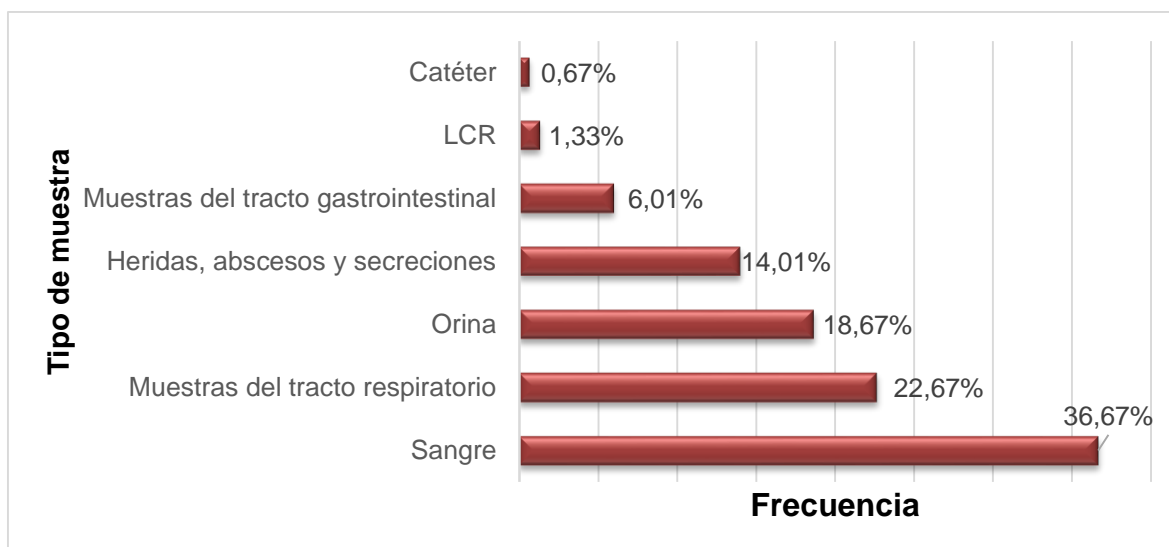


Figura 8. Tipos de muestras clínicas de las que provienen las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

Autor: Mariño, E.

Como se muestra en la **Figura 9**, de un total de 150 cepas, se aislaron 10 especies diferentes de enterobacterias, *Klebsiella pneumoniae* (n=125), *Citrobacter freundii* (n=6), *Escherichia coli* (n=4), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Enterobacter cloacae* (n=3), *Klebsiella aerogenes* (n=2), *Morganella morganii* (n=2), *Serratia marcescens* (n=2); *Citrobacter youngae* (n=1) y *Klebsiella ozaenae* (n=1). Es notable la predominancia de *K. pneumoniae*, se debe a que este microorganismo tiene mayor capacidad de generar resistencia a los carbapenémicos.

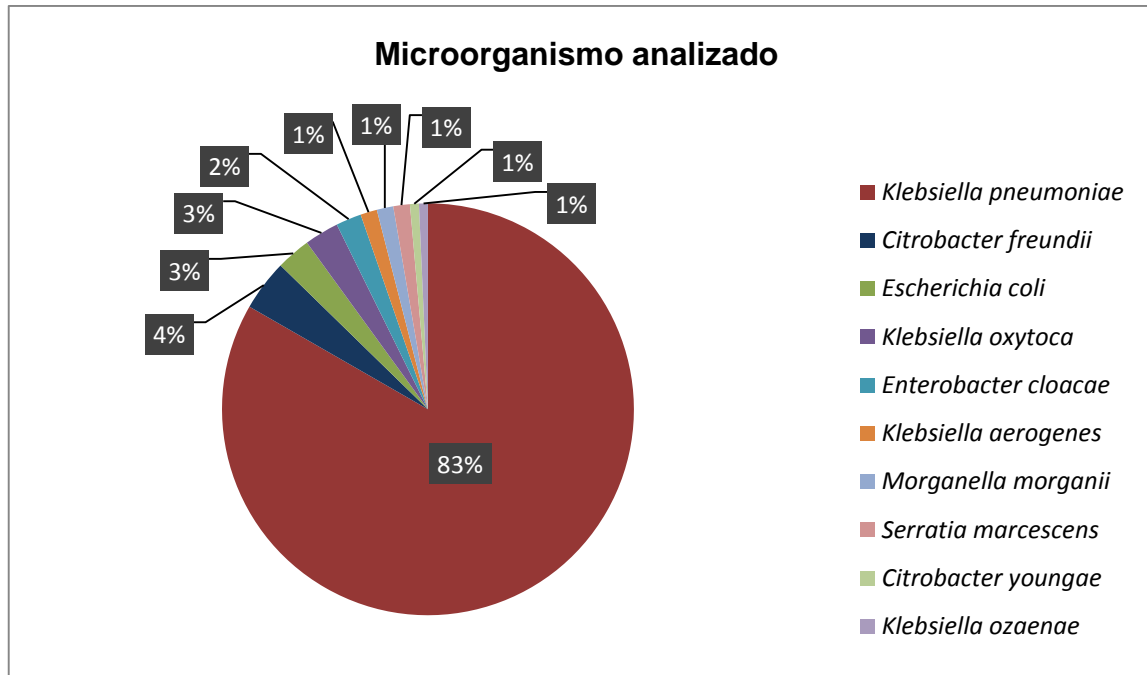


Figura 9. Diagrama circular de recuento de microorganismo analizado

Autor: Mariño, E.

Con respecto a los mecanismos de resistencia, el 98,67% de los microorganismos poseía el gen *bla_{KPC}* y el 1,33% *bla_{NDM}*; ninguno portaba los genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* y *bla_{OXA48}*. El gen *bla_{NDM}* sólo estuvo presente en una cepa de *Citrobacter freundii* y una de *Escherichia coli* (cabe recalcar que fueron las 2 únicas cepas no portadoras de KPC).

4.1.2. Evaluación de la actividad *in vitro* de fosfomicina en cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).

4.1.2.1. Método de difusión en disco

El histograma de los halos de inhibición obtenidos mediante el método de difusión en disco revela una curva bimodal que permite diferenciar claramente cada criterio de interpretación;

en total, 24 aislados son resistentes (≤ 12 mm), 4 intermedios (13-15 mm) y 122 sensibles (≥ 16 mm). La tendencia de la curva se da entre 19 y 22 milímetros. Por lo tanto, se puede considerar el uso de fosfomicina en la terapia (Ver **Figura 10**).

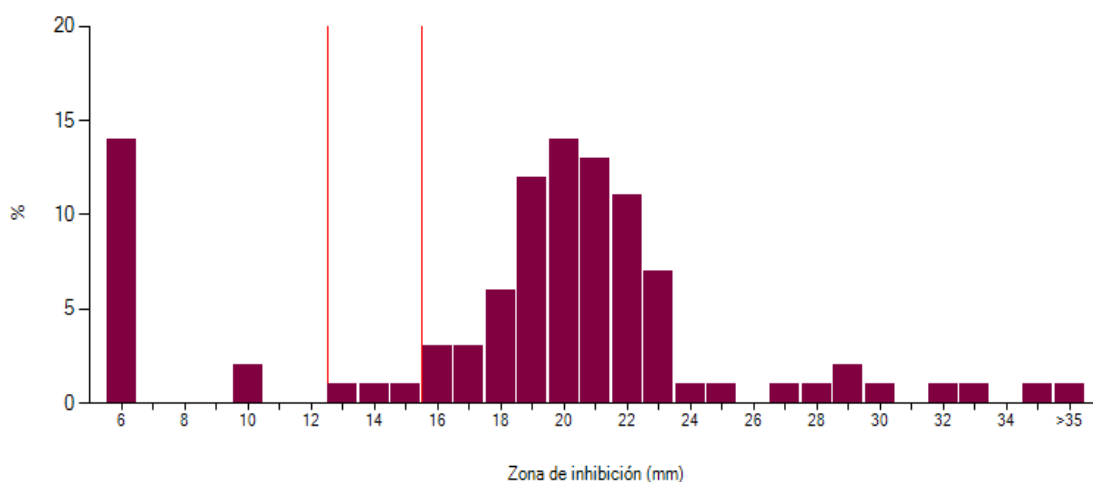


Figura 10. Histograma de diámetros de la zona de inhibición (mm) de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) ante fosfomicina (200 μ g), mediante método de difusión en disco. Líneas rojas corresponden a los puntos de corte establecidos por CLSI 2018.

Autor: Mariño, E.

4.1.2.2. Método de dilución en agar

La **Figura 11** representa la distribución de la CMI. Al igual que el histograma de la difusión en disco, se observa que la predominancia de los aislados se ubica en la categoría sensible (≤ 64 μ g/mL), seguido de resistente (≥ 256) y, por último, intermedio (128 μ g/mL). Es decir, también sugiere la inclusión de fosfomicina en el tratamiento.

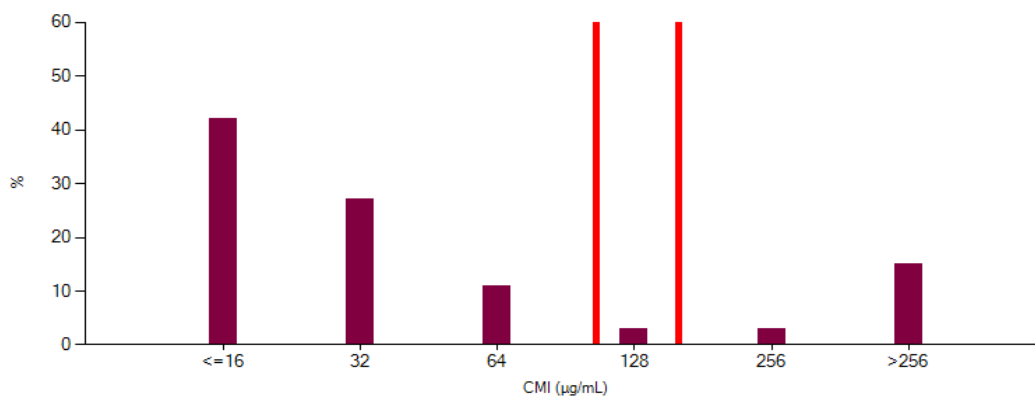


Figura 11. Histograma de la CMI (Concentración mínima inhibitoria) de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), mediante método de dilución en agar. Líneas rojas corresponden a los puntos de corte establecidos por CLSI 2018.

Autor: Mariño, E.

4.1.3. Comparación de métodos

Se evaluó la actividad *in vitro* de fosfomicina mediante el método estándar (difusión en disco) y el método de referencia (dilución en agar). En la **Tabla 2**, se exponen los resultados obtenidos de cada microorganismo, a través de ambas metodologías. Es notable que las interpretaciones concuerdan en casi todas las especies, sin embargo, no se puede emitir una conclusión general sobre la familia *Enterobacteriaceae*, porque el 83% de las cepas son *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 2.

Tabla de contingencia entre interpretación de resultados y microorganismo.

		Interpretación de resultados					
		Dilución en agar			Difusión en disco		
		S	I	R	S	I	R
Microorganismo recibido	<i>Citrobacter freundii</i>	5	-	1	5	-	1
	<i>Citrobacter youngae</i>	1	-	-	1	-	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	-	1	2	-	1
	<i>Escherichia coli</i>	4	-	-	4	-	-
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	-	-	2	-	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	-	-	4	-	-
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	-	-	1	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98	3	24	100	4	21
	<i>Morganella morganii</i>	-	1	1	1	-	1
	<i>Serratia marcescens</i>	2	-	-	2	-	-
TOTAL		119	4	27	122	4	24

S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente.

Autor: Mariño, E.

En la **Tabla 3** se observa las discrepancias que se dieron entre los dos métodos. Tres cepas de *K. pneumoniae* fueron interpretadas como intermedio por difusión en disco, mientras que por dilución en agar resultaron resistentes. Una cepa de *M. morganii* y dos de *K. pneumoniae* fueron sensibles por el método estándar, pero en la lectura de la CMI, se determinó que eran de susceptibilidad intermedio. En consecuencia, los resultados que requerirían confirmación por dilución en agar son los que obtengan un halo de inhibición entre 13 y 16 mm.

Tabla 3.
Discrepancias entre método estándar y referencia

Microorganismo	Dilución en agar	Difusión en disco
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3)	Resistente	Intermedio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=2)	Intermedio	Sensible
<i>Morganella morganii</i> (n=1)	Intermedio	Sensible

Autor: Mariño, E.

En la **Figura 12**, se exponen los similares resultados obtenidos de *Klebsiella pneumoniae*, a través de ambas metodologías. Por consiguiente, el método de difusión en disco podría ser utilizado para evaluar a este microorganismo.

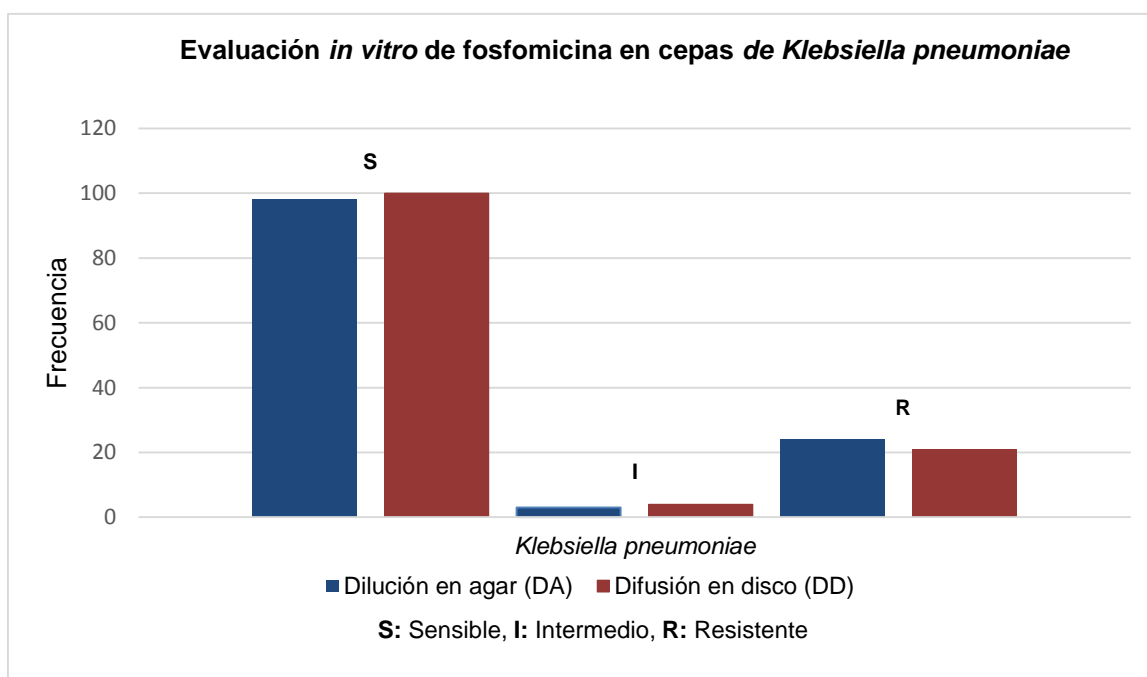


Figura 12. Evaluación *in vitro* de fosfomicina en cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Autor: Mariño, E.

En la **Figura 13** se representa en términos porcentuales los resultados del estudio; por difusión en disco se obtuvo 81,33% en categoría sensible, 2,67% en intermedio y 16% resistente, por dilución en agar el 79,33% resultó sensible, el 2,67% intermedio y el 18% resistente. Resultados sugerentes de que el método de difusión en disco puede ser utilizado para evaluar fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

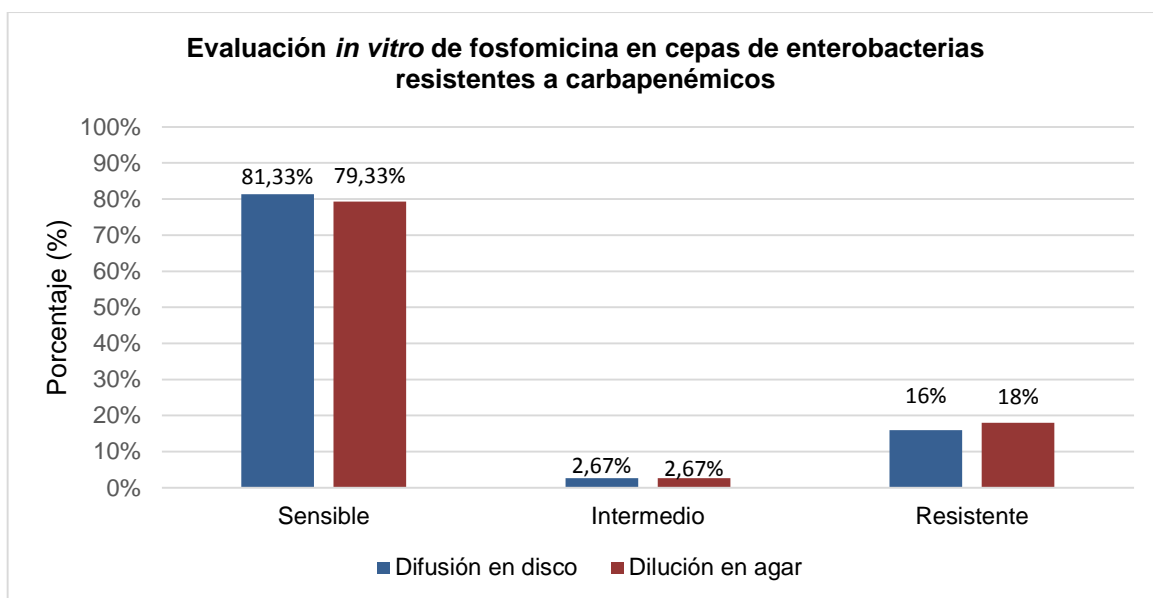


Figura 13. Diagrama de barras que evidencia en porcentaje los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad.

Autor: Mariño, E.

En la **Figura 14**, se encuentra un escatograma. Un diagrama en el cual se representa el porcentaje de aislamientos según las interpretaciones de susceptibilidad. En Resistente (R) se obtuvo 16,0%, en Intermedio (I) 0,7% y en Sensible (S) 79,3%. Además, incluye los errores en las categorías clínicas; el error menor resultante fue de 4%, este surge cuando un método obtiene resultado intermedio y otro informa susceptible o resistente. El acuerdo categórico o Categorical Agreement (CA) fue 96% ya que no se presentaron errores graves

ni muy graves. Para considerar un método adecuado, CLSI recomienda que en el desempeño de las pruebas de susceptibilidad se obtenga $\geq 95\%$ de acuerdo categórico, $\leq 10\%$ de error menor, $\leq 3\%$ de errores graves y $\leq 1,5\%$ de errores muy graves; por tal razón, el método de difusión en disco sí es adecuado para la evaluación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).

FOS (Dilución en agar)	R	16.0% Resistente	2.0% Error menor	Error muy grave
	I	Error menor	0.7% Intermedio	2.0% Error menor
	S	Error grave	Error menor	79.3% Sensible
		R	I	S
		FOS (Difusión en disco)		

Figura 14. Escatograma que representa errores en las categorías clínicas entre el método de difusión en disco y dilución en agar para fosfomicina.

Autor: Mariño, E.

4.1.3.1. Índice Kappa de Cohen

Se obtuvo el índice Kappa a partir del cálculo del porcentaje de concordancia y el porcentaje de concordancia debida al azar (**ANEXO 11**). El resultado obtenido fue 0,88; fue interpretado de acuerdo a las clasificaciones de Landis y Koch, y se concluyó que al ser mayor a 0,75 la concordancia entre los métodos es excelente, no depende del azar.

4.2. DISCUSIÓN

Las enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) son un grave problema de salud pública a nivel mundial, provocan infecciones muy difíciles de combatir y pueden llegar a ser mortales en aproximadamente el 50% de individuos (Martin, Fahrbach, Zhao, & Lodise, 2018). Por lo regular, una infección asociada a ERC no se da en la comunidad, ocurre en ambientes hospitalarios; principalmente en pacientes que requieren atención con dispositivos médicos como ventiladores respiratorios o catéteres, y aquellos tratados prolongadamente con antibióticos (CDC, 2015). Estas referencias son concertantes con el presente estudio, pues de las 150 cepas de ERC analizadas, el 34% fue remitido de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y el 32,67% de hospitalización; dato sugerente de que estas áreas requieren mayor vigilancia e intervención por los comités de control de infecciones.

Los aislados clínicos provinieron especialmente de sangre (36,67%), muestras del tracto respiratorio (22,67%) y orina (18,67%); Palacios-Baena *et al.*, (2015) refiere el 10% de sus muestras proceden de sangre y el 43% de orina, Carrilho *et al.*, (2016) obtuvo 42% de microorganismos causantes de neumonía y 40,2% de ITU. Estas discordancias con lo reportado en esta investigación pueden corresponder a que han sido realizadas en otras zonas territoriales con diferente perfil epidemiológico. Además, las ERC pueden ocasionar una infección en cualquier órgano o tejido del cuerpo humano.

Referente al tipo de microorganismo, *Klebsiella pneumoniae* prevaleció con 83%. semejante a los estudios de Palacios-Baena *et al.* (2015) con 74% y Carrilho *et al.* (2016) con 89%. Se debe a que dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae* se destaca por su capacidad de generar resistencia a los antibióticos mediante varios mecanismos; en cuanto a la resistencia a los carbapenémicos, la presencia de genes de

carbapenemasas han sido reportados en todo el mundo por la facilidad de diseminación a través de la transferencia horizontal de genes, mediada en especial por plásmidos y transposones (Nordmann *et al.*, 2011). En este estudio, el 98,67% de las cepas fue KPC, seguido de 1,33% de NDM-1, similar a la investigación latinoamericana de Villegas *et al.* (2016) donde reseñó 83% KPC, 9% VIM, 8% NDM sin IMP ni OXA-48 pero disímil con la desarrollada en España por Palacios-Baena *et al.* (2015), que refiere solamente 2% de enterobacterias productoras de KPC y 74% OXA-48. Acordando con los análisis epidemiológicos de Logan & Weinstein (2017) que describen a la carbapenemasa tipo KPC como propagada o endémica en Ecuador y otros países de Sudamérica y con David *et al.* (2019) sobre la predominancia del gen *bla_{OXA48}* en Europa.

Para el análisis de la evaluación *in vitro* de fosfomicina se realizaron histogramas indicadores de la tendencia de los aislados clínicos en la categoría sensible mediante el método de dilución en agar y difusión en disco. El escatograma obtenido a partir del emparejamiento de las dos metodologías resolvió que la susceptibilidad a fosfomicina de las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC) fue 79,3% sensible, 0,7% intermedio, y 16,0% resistente. Resultados similares en cuanto a sensibilidad, con los de Endimiani *et al.* (2010), Tuon *et al.* (2013) y Hirsch *et al.* (2015) que refieren el 93, 94 y 99% en *K. pneumoniae* KPC, Pogue *et al.* (2013) 85% en ERC, Kaase *et al.* (2014) 78% en enterobacterias y con Lifonzo *et al.* (2018) 72% en *E. coli* BLEE. A diferencia de una investigación en Reino Unido donde la sensibilidad fue 61% en 81 cepas de ERC (Livermore *et al.*, 2011); este dato discordante puede corresponderse al diferente tamaño muestral trabajado o a su vez, la susceptibilidad a fosfomicina en esta población puede ser característicamente reducida y requiere mayor atención para evitar el aumento del número de microorganismos resistentes.

De acuerdo al valor de resistencia obtenido, se infiere que en 6 años la resistencia a fosfomicina ha aumentado 11% en el Ecuador, dato calculado gracias al estudio de Zurita

(2012) realizado entre el 2002 al 2012 donde reporta menos del 5% de microorganismos no susceptibles a fosfomicina. Según Gales & Vignoli (2018), en la familia *Enterobacteriaceae* solo se ha hallado el gen de resistencia *fosA*, sin embargo, Lee *et al.* (2012), Ho *et al.* (2013) y Hou *et al.* (2013) señalan la diseminación de la variante *fosA3* por Asia y su arribo a Estados Unidos (Alrowais *et al.*, 2015). Por lo tanto, una investigación dirigida a detectar la presencia de este gen en el país sería relevante, porque es elevada la probabilidad de que esté presente en Sudamérica y Ecuador.

Respecto a la comparación entre el método de referencia (dilución en agar) y el método de difusión en disco para fosfomicina, se obtuvo un acuerdo categórico (CA) de 96% y 4% de error menor en las categorías clínicas, este tipo de error surge cuando un método obtiene resultado intermedio y el otro informa susceptible o resistente, dato concordante con las discrepancias del estudio. Estos valores fueron equivalentes a los conseguidos en los estudios realizados en el 2006 por de Cueto *et al.*, 94,87% de CA, 3,5% de errores mayores, 1,4% de errores menores y 0,23% de errores muy graves (*E. coli* y *K. pneumoniae* BLEE), en el 2014 por Perdigão-Neto *et al.* (96/100)% de CA y (4/0)% de errores muy graves (*K. pneumoniae/Enterobacter* spp.) y en el 2015 por Hirsch *et al.* 93,8% de CA, 5% de errores menores y 1,3% de errores mayores. No coincide con Endimiani *et al.* (2010), con 33,8% de errores menores, ni con la descripción de Kaase *et al.* (2014) que obtuvo 27% de errores menores; cabe recalcar que este último autor utilizó el punto de corte sensible ≥ 20 mm para la interpretación del halo de inhibición.

Kaase (2014), además señala que es discutible la elección del método de dilución en agar como referencia; a su criterio, ningún método que evalúe a fosfomicina ha demostrado correlacionarse al resultado clínico. El autor llegó a esta conclusión, en base a la pequeña área sobre la cual se aplica el inóculo, por lo tanto, las subpoblaciones resistentes deberían considerarse mucho más que en la lectura del método epsilométrico o difusión en disco.

El grado de concordancia obtenido mediante el cálculo del índice *Kappa* fue 0,88; se interpretó el resultado de acuerdo a las clasificaciones de Landis y Koch, y se concluyó que al ser mayor a 0,75 la concordancia entre los métodos es excelente, no depende del azar. Este dato es similar al obtenido en Perú por Lifonzo *et al.* (2018) que fue 0,93; la diferencia con este estudio fue que la población estudiada se conformó de cepas de *E. coli* BLEE. Kaase *et al.* (2014) obtuvo 0,807 pero entre Etest y dilución en agar.

El presente trabajo tiene algunas limitaciones, la primera es el pequeño tamaño de la muestra, y la segunda, que las conclusiones del estudio no se pueden generalizar a la familia *Enterobacteriaceae* ni a todas las carbapenemasas porque la mayoría de las cepas analizadas fueron *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC. No obstante, el estudio si pudo demostrar que fosfomicina tiene buena actividad en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC), por lo que podría ser una buena alternativa terapéutica para este tipo de agentes. Además, la aplicación del método de difusión en disco puede considerarse en los laboratorios de bacteriología para determinar la susceptibilidad de fosfomicina en estos microorganismos, principalmente para tamizaje. Los resultados que requerirían ser confirmados por el método de referencia (dilución en agar) serían los que obtengan un halo de inhibición de 13 a 16 mm mediante el método de difusión en disco.

Finalmente, al ser fosfomicina un antimicrobiano clave para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, es necesario que CLSI y EUCAST establezcan criterios comunes con respecto a la interpretación de su susceptibilidad ante enterobacterias. Considerando que *K. pneumoniae*, tiene sensibilidad reducida a fosfomicina por la presencia del gen cromosómico *fosA* (Elliott *et al.*, 2019; Klontz *et al.*, 2017).

4.3. CONCLUSIONES

- Dada la complejidad del método de dilución en agar y el mayor consumo de tiempo que requiere, su aplicación es recomendada en laboratorios de referencia. La difusión en disco es el sistema más práctico para evaluar la susceptibilidad en laboratorios de rutina; a causa de los errores menores, los resultados que requerirían ser confirmados por el método de referencia (dilución en agar) serían los que obtengan un halo de inhibición de 13 a 16 mm mediante el método de difusión en disco.
- Para considerar un método adecuado, CLSI recomienda que en el desempeño de las pruebas de susceptibilidad se obtenga $\geq 95\%$ de acuerdo categórico, $\leq 10\%$ de error menor, $\leq 3\%$ de errores graves y $\leq 1,5\%$ de errores muy graves; por lo tanto, el método de difusión en disco (200 μg fosfomicina/50 μg G-6-P, OXOID) sí es adecuado para la evaluación de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).
- El grado de concordancia entre el método de difusión en disco y dilución en agar es categorizado como excelente, es decir, los resultados obtenidos por el método estándar no dependen del azar.
- El algoritmo de evaluación y pertinencia de reporte de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (**ANEXO 10**) fue elaborado con la finalidad de su posible implementación en el CRN-RAM del INSPI-Q para que se pueda emitir el informe de susceptibilidad al establecimiento de salud responsable del aislamiento. Y de esta manera, el médico tratante, basándose en un protocolo integral validado, pueda considerar a fosmicina como terapia alternativa o combinada en infecciones causadas por estos microorganismos multirresistentes.

- El interés y el uso de fosfomicina ha aumentado en los últimos años debido sus amplias cualidades farmacológicas y sus elevados índices de sensibilidad que se presentan en bacterias multirresistentes, sin embargo, son necesarios criterios comunes sobre puntos de corte clínicos y su utilización en regímenes terapéuticos.

4.4. RECOMENDACIONES

- Los datos clínicos sobre el uso de fosfomicina intravenosa en el tratamiento de infecciones graves son limitados, se necesita más estudios experimentales y clínicos que garanticen el éxito de la terapia antimicrobiana.
- Es necesario que se desarrollen estudios que detecten genes *fosA* (principalmente *fosA3*) en bacterias Gram negativas que han resultado resistentes a fosfomicina mediante dilución en agar, de esta manera se evitaría la diseminación de estos genes de resistencia.
- De acuerdo con la farmacocinética y farmacodinamia de fosfomicina, es aconsejable que los establecimientos de salud elaboren un PROA para este antibiótico. Se reducirán costos, se obtendrán mejores resultados clínicos y disminuirá la aparición de bacterias multirresistentes y los efectos adversos.
- A excepción de las infecciones del tracto urinario (ITU) debe evitarse el uso de fosfomicina en monoterapia por el riesgo elevado de que el microorganismo desarrolle resistencia.

- Se recomienda que La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – Agrocalidad, no permita la fabricación, formulación, importación, comercialización, registro y uso de productos que contengan como ingrediente activo fosfomicina para uso o consumo animal. Porque es un antimicrobiano considerado como última alternativa en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes. De esta manera, se cumpliría con el objetivo 4 (Utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal) del plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos establecido por la OMS.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. (2016). Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Avícolas. Retrieved from <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dia/manual-avicola-08-11-2016.pdf>
- Alrowais, H., Mcelheny, C. L., Spychala, C. N., Sastry, S., Guo, Q., Butt, A. A., & Doi, Y. (2015). Fosfomycin Resistance in Pennsylvania, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 10–12.
- Anderson, G., Kenney, T., MacLeod, D., Henig, N., & O'Toole, G. (2016). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cultured airway cells by a fosfomycin/tobramycin antibiotic combination, 67(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12015>.
- Asociación Panamericana de Infectología. (2016). *GUÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA DE OPTIMIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS (PROA) A NIVEL HOSPITALARIO*. (M. V. Villegas, G. Esparza, & J. Zurita, Eds.).
- Berçot, B., Poirel, L., Dortet, L., & Nordmann, P. (2011). In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(August), 2295–2297. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr296>
- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F. (2017). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*, 1–8. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>
- Borsa, F. O., Leroy, A., Fillastre, J., Godin, M., & Moulin, B. (1988). Comparative Pharmacokinetics of Tromethamine Fosfomycin and Calcium Fosfomycin in Young and Elderly Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(6), 938–941.

- Bratu, S., Landman, R., Haag, R., Recco, A., Eramo, M., & Quale, J. (2005). Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch. Intern. Med.*, (165), 1430–1435.
- Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2010). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. McGraw Hill.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on B-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1–20.
- Bush, K., & Jacoby, G. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Carrilho, C., Oliveira, M., Gaudereto, J., Perozin, J. S., Urbano, M. R., Camargo, C. H., ... Costa, S. F. (2016). A prospective study of treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections and risk factors associated with outcome. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1979-z>
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*, 30(6), 519–528. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
- Castañeda, A., Blázquez, J., & Rodríguez, A. (2013). Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomicin Resistance, *Antibiotic*, 217–236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mathai, D., Bell, J. M., Jones, R. N., & Mendes, R. E. (2011). Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 1274–1278.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01497-10>

Cavalieri, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. L., McCarter, Y., Sharp, S., ...

Spiegel, C. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.

CDC. (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States.

CDC. (2015). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Healthcare Settings. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html>

CIPLAMED. (2016). CRIFOS Injection (Fosfomicin sodium).

CLSI. (2012). METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCION, 32(2).

CLSI. (2018a). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 11 th ed. CLSI standard M07. Clinical Laboratory Standards Institute.

CLSI. (2018b). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI supplement M100 (28th ed.).

Codjoe, F., & Donkor, E. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>

David, S., Reuter, S., Harris, S. R., Glasner, C., Feltwell, T., & Argimon, S. (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>

de Cueto, M., López, L., Hernández, J., Morillo, C., & Pascual, A. (2006). In Vitro Activity of Fosfomicin against Extended-Spectrum-B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of Susceptibility Testing Procedures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 368–370.

<https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.368>

del Río, A., García-de-la-Mària, C., Entenza, J. M., Gasch, O., Armero, Y., Soy, D., ... the Hospital Clinic Experimental Endocarditis Study Group. (2016). Fosfomycin plus β -lactams as synergistic bactericidal combinations for experimental endocarditis due to methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 478–486. <https://doi.org/10.1128/AAC.02139-15>

Descourouez, J. L., Jorgenson, M. R., Wergin, J. E., & Rose, W. E. (2013). Fosfomycin synergy in vitro with amoxicillin, daptomycin, and linezolid against vancomycin-resistant enterococcus faecium from renal transplant patients with infected urinary stents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1518–1520. <https://doi.org/10.1128/AAC.02099-12>

Di, X., Wang, R., Liu, B., Zhang, X., Ni, W., Wang, J., ... Cai, Y. (2015). In vitro activity of fosfomycin in combination with colistin against clinical isolates of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antibiotics*, (28), 1–5. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.27>

Docobo, F., Drusano, G., Johnson, A., Goodwin, J., Whalley, S., Conejo, M., ... Hope, W. (2015). Pharmacodynamics of Fosfomycin : Insights into Clinical Use for. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5602–5610. <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-15>

Duez, J.-M., Adochitei, A., Péchinot, A., Siebor, E., Sixt, N., & Neuwirth, C. (2014). In Vitro Combinations of Five Intravenous Antibiotics with Dalfopristin-Quinupristin Against *Staphylococcus aureus* in a 3-Dimensional Model . *Journal of Chemotherapy*, 20(6), 684–689. <https://doi.org/10.1179/joc.2008.20.6.684>

Elliott, Z., Barry, K., Cox, H., Stoesser, N., Carroll, J., Vegesana, K., ... Mathers, J. (2019).

The Role of *fosA* in Challenges with Fosfomycin Susceptibility Testing of Multispecies *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- Producing Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(10), 1–8.

Endimiani, A., Patel, G., Hujer, K. M., Swaminathan, M., Perez, F., Rice, L. B., ... Bonomo, R. A. (2010). In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 526–529. <https://doi.org/10.1128/AAC.01235-09>

EUCAST. (2018). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version. Retrieved from http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

Evren, E., Kurt, Ö., Çolako, Ş., & Arslan, H. (2013). In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem , meropenem , colistin and tigecycline against OXA 48 – positive *Klebsiella pneumoniae* strains ☆ , ☆☆. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76, 335–338. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.004>

Falagas, M., Vouloumanou, E., Samonis, G., & Vardakas, K. (2016). Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(2), 321–347. <https://doi.org/10.1128/CMR.00068-15>.

FARBIOPHARMA S.A. (2017). Ficha técnica FOSTROMICIN. Retrieved from https://farbiopharma.com/wp-admin/images/FICHAS_TECNICAS/FOSTROMICIN.pdf

Ferrari, D., Passeri, M., Vitali, L., & Martinez, R. (2013). Case Report Article In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 299–303. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0012-2013>

Frossard, M., Joukhadar, C., Erovic, B. M., Dittrich, P., Mrass, P. E., Van Houte, M., ... Muller, M. (2000). Distribution and antimicrobial activity of fosfomycin in the interstitial

fluid of human soft tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2728–2732. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2728-2732.2000>

Gales, A., & Vignoli, R. (2018). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos*.

Gardiner, B. J., Mahony, A. A., Ellis, A. G., Lawrentschuk, N., Bolton, D. M., Zeglinski, P. T., ... Grayson, M. L. (2018). Is Fosfomycin a Potential Treatment Alternative for Multidrug-Resistant Gram-Negative Prostatitis?, 58(August). <https://doi.org/10.1093/cid/cit704>

Gobernado, M. (2003). Revisión Fosfomicina, 16(Nº 1), 15–40.

Grabein, B., Graninger, W., Rodríguez, J., Dinh, A., & Liesenfeld, D. (2017). Intravenous fosfomycin d back to the future . Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.005>

Hayward, R. S., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., & Ross, J. D. C. (2018). Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(2), 223–238. <https://doi.org/10.1111/bcp.13439>

Hedman, H., Eisenberg, J., Vasco, K., Blair, C., Trueba, G., Berrocal, V., & Zhang, L. (2019). High Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase CTX-M – Producing Escherichia coli in Small-Scale Poultry Farming in Rural Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2, 374–376. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0173>

Hirsch, E. B., Raux, B. R., Zucchi, P. C., Kim, Y., Mccoy, C., Kirby, J. E., ... Eliopoulos, G. M. (2015). Activity of fosfomycin and comparison of several susceptibility testing methods against contemporary urine isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.012>

- Ho Jeon, J., Hun Lee, J., Jin Lee, J., Seung Park, K., Mustafa Karim, A., Lee, C., ... Hee Lee, S. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>
- Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Lai, E. L., Cheung, Y. Y., Lau, T. C. K., & Chow, K. H. (2013). Prevalence and molecular epidemiology of plasmidmediated fosfomicin resistance genes among blood and urinary Escherichia coli isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART 11), 1707–1713. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062653-0>
- Hou, J., Huang, X., Deng, Y., He, L., Yang, T., Zeng, Z., ... Liu, J.-H. (2012). Dissemination of the Fosfomicin Resistance Gene fosA3 with CTX-M β -Lactamase Genes and rmtB Carried on IncFII Plasmids among Escherichia coli Isolates from Pets in China . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2135–2138. <https://doi.org/10.1128/aac.05104-11>
- Hou, J., Yang, X., Zeng, Z., Lv, L., Yang, T., Lin, D., & Liu, J. H. (2013). Detection of the plasmid-encoded fosfomicin resistance gene fosA3 in Escherichia coli of food-animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 766–770. <https://doi.org/10.1093/jac/dks465>
- Jiang, Y., Shen, P., Wei, Z., Liu, L., He, F., Shi, K., ... Yu, Y. (2015). Dissemination of a clone carrying a fosA3-harboring plasmid mediates high fosfomicin resistance rate of KPC-producing Klebsiella pneumoniae in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(1), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.010>
- Joukhadar, C., Klein, N., Dittrich, P., Zeitlinger, M., Geppert, A., Skhirtladze, K., ... Müller, M. (2003). Target site penetration of fosfomicin in critically ill patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1247–1252. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg187>

- Kaase, M., Szabados, F., Anders, A., & Gatermann, G. (2014). Fosfomicin Susceptibility in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Germany, *52*(6), 1893–1897. <https://doi.org/10.1128/JCM.03484-13>
- Karadağ, A., Çaycı, Y. T., Bilgin, K., Günaydın, M., & Eroğlu, C. (2014). In vitro efficacy of fosfomicin against clinical strains, *4*(2), 55–58. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2014.02.0127>
- Keating, G. (2013). Fosfomicin trometamol: A review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Adis Drug Reviews (Springer)*, *73*(17), 1951–1966. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0143-y>
- Kelly, A. M., Mathema, B., & Larson, E. L. (2018). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *50*(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.012>. Carbapenem-resistant
- Klontz, E., Tomich, A., Günther, S., Lemkul, J., Deredge, D., Silverstein, Z., ... MacKerell, A. (2017). Structure and Dynamics of FosA- Mediated Fosfomicin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(11), 1–13.
- Laboratorios ERN. (2013). Fosfocina inyectable Especificaciones técnicas.
- Lee, S., Park, Y., Yu, J., Jung, S., Kim, Y., Jeong, S., & Arakawa, Y. (2012). Prevalence of acquired fosfomicin resistance among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* clinical isolates in korea and IS26-composite transposon surrounding fosA3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(12), 2843–2847. <https://doi.org/10.1093/jac/dks319>

- Leelasupasri, S., Santimaleeworagun, W., & Jitwasinkul, T. (2018). Antimicrobial Susceptibility among Colistin, Sulbactam, and Fosfomycin and a Synergism Study of Colistin in Combination with Sulbactam or Fosfomycin against Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Pathogens*, 2018, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2018/3893492>
- Legat, F. J., Maier, A., Dittrich, P., Zenahlik, P., Kern, T., Nuhsbaumer, S., ... Müller, M. (2003). Penetration of fosfomycin into inflammatory lesions in patients with cellulitis or diabetic foot syndrome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 371–374. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.371-374.2003>
- Li, Y., Zheng, B., Li, Y., Zhu, S., Xue, F., & Liu, J. (2015). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135269>
- Lifonzo, S., Zamudio, P., & Champi, R. (2018). Sensibilidad a Fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 35(1), 68–71. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3566.68>
- Lim, L. M., Pharm, D., Ly, N., Anderson, D., Pharm, D., Yang, J. C., ... Pharm, D. (2010). Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy*, 30(12), 1279–1291. <https://doi.org/10.1592/phco.30.12.1279.Resurgence>
- Lingscheid, T., Tobudic, S., Poepl, W., Mitteregger, D., & Burgmann, H. (2013). In vitro activity of doripenem plus fosfomycin against drug-resistant clinical blood isolates. *Pharmacology*, 91(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1159/000348572>
- Livermore, D. M., Warner, M., Mushtaq, S., Doumith, M., Zhang, J., & Woodford, N. (2011). What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of

chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012>

Livorsi, D. J., Chorazy, M. L., Schweizer, M. L., Balkenende, E. C., Blevins, A. E., Nair, R., ... Perencevich, E. N. (2018). A systematic review of the epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the United States. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(55), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0346-9>

Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 1), S28–S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>

Lucas, E., Ito, R., Mustapha, M., McElheny, C., Mettus, R., Bowler, S., ... Doi, Y. (2018). Frequency and Mechanisms of Spontaneous Fosfomycin Nonsusceptibility Observed upon Disk Diffusion Testing of Escherichia coli. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.01368-17>

Martin, A., Fahrbach, K., Zhao, Q., & Lodise, T. (2018). Association between carbapenem resistance and mortality among adult, hospitalized patients with serious infections due to enterobacteriaceae: Results of a systematic literature review and meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7), 1–9. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy150>

Matzi, V., Lindenmann, J., Porubsky, C., Kugler, S. A., Maier, A., Dittrich, P., ... Joukhadar, C. (2010). Extracellular concentrations of fosfomycin in lung tissue of septic patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), 995–998. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq070>

Michalopoulos, A. S., Livaditis, I. G., & Gougoutas, V. (2011). The revival of fosfomycin. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(11), e732–e739.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.07.007>

- Mihailescu, R., Tabin, F., Corvec, S., Oliva, A., Betrisey, B., Borens, O., & Trampuz, A. (2014). High Activity of Fosfomycin and Rifampin against Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm In Vitro and in an Experimental Foreign-Body Infection Model, *58*(5), 2547–2553. <https://doi.org/10.1128/AAC.02420-12>
- Morikawa, K., Oseko, F., & Morikawa, S. (1993). Immunosuppressive Activity of Fosfomycin on Human T-Lymphocyte Function In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(12), 2684–2687.
- Morril, H., Pogue, J., Kaye, K., & LaPlante, K. (2016). Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Oxford University Press on Behalf of the Infectious Disease Society of America*. <https://doi.org/10.1093/o>
- Morris, D., Boyle, F., Morris, C., Condon, I., Delannoy-Vieillard, A. S., Power, L., ... Cormican, M. (2012). Inter-hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(10), 2367–2372. <https://doi.org/10.1093/jac/dks239>
- Múñez, E., Ramos, A., & Fernández, A. (2019). Fosfomycin in antimicrobial stewardship programs. *Official Journal of the Spanish Society of Chemotherapy*, *32*, 62–66.
- Muñoz-Price, S., Kumaradamy, K., Hayden, M., Gniadkowski, M., Garau, J., Cornaglia, G., ... Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.*, *13*(9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).Clinical
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica* (Seven). España: Elsevier Saunders.

- Musmade, D., Poonam, P., Sunil, A., & Agasti, W. (2013). MUR-A: A CRITICAL TARGET BEHIND NEW ANTIBACTERIAL DRUG DISCOVERY. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 220–225.
- Neuner, E. A., Sekeres, J., Hall, G. S., & van Duin, D. (2012). Experience with Fosfomycin for Treatment of Urinary Tract Infections Due to Multidrug-Resistant Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5744–5748. <https://doi.org/10.1128/aac.00402-12>
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791–1798.
- Okada, N., Nishio, M., & Danbara, H. (2003). Intracellular Activity of Fosfomycin against Two Distinct Enteropathogenic Bacteria , Salmonella enterica and Listeria monocytogenes , Alive inside Host Cells. *Chemotherapy*, 8641, 49–55. <https://doi.org/10.1159/000069787>
- OMS. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. *Resistencia a Los Antimicrobianos*, 99. Retrieved from <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/es/%0Afile:///home/emmanuel/Zotero/storage/XYISDBQL/es.html>
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2018). Resistencia a los Antibióticos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>
- OPS. (2015). PLAN DE ACCIÓN SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). Short report colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiology and Infection*, *144*(14), 2967–2970. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Pachón-Ibáñez, M. E., Ribes, S., Domínguez, M. Á., Fernández, R., Tubau, F., Ariza, J., ... Cabellos, C. (2011). Efficacy of fosfomycin and its combination with linezolid, vancomycin and imipenem in an experimental peritonitis model caused by a *Staphylococcus aureus* strain with reduced susceptibility to vancomycin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *30*(1), 89–95. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1058-0>
- Palacios-Baena, Z. R., Oteo, J., Conejo, C., Larrosa, M. N., Bou, G., Fernández-Martínez, M., ... Rodríguez-Baño, J. (2015). Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *Journal of Infection*, *72*(2), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.10.008>
- Parker, S., Lipman, J., Koulenti, D., Dimopoulos, G., & Roberts, J. A. (2013). What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *42*(4), 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.018>
- Patel, B., Patel, K., Shetty, A., Soman, R., & Rodrigues, C. (2017). Fosfomycin susceptibility in urinary tract enterobacteriaceae. *Journal of Association of Physicians of India*, *65*(September), 14–16.
- Perdigão-Neto, L. V., Oliveira, M., Rizek, C. F., Carrilho, C., Costa, S. F., & Levin, A. S. (2014). Susceptibility of multiresistant gram-negative bacteria to fosfomycin and performance of different susceptibility testing methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(3), 1763–1767. <https://doi.org/10.1128/AAC.02048-13>

- Pérez, P., Galán, F., Gutiérrez, D., & Guerrero, I. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine (Spain)*, 11(55), 3276–3282. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70768-1)
- Pfausler, B., Spiss, H., Dittrich, P., Zeitlinger, M., Schmutzhard, E., & Joukhadar, C. (2004). Concentrations of fosfomicin in the cerebrospinal fluid of neurointensive care patients with ventriculostomy-associated ventriculitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 848–852. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh158>
- Pogue, J. M., Marchaim, D., Abreu-Lanfranco, O., Sunkara, B., Mynatt, R. P., Zhao, J. J., ... Lephart, P. R. (2013). Fosfomicin activity versus carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and vancomycin-resistant Enterococcus, Detroit, 2008-10. *The Journal of Antibiotics*, 66, 625–627. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.56>
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). (2016). Protocolo de vigilancia y control de microorganismos multirresistentes o de especial relevancia clínico-epidemiológica (Protocolo-MMR).
- Rodríguez-Baño, J., Cisneros, J. M., Cobos-Trigueros, N., Fresco, G., Navarro-San Francisco, C., Gudiol, C., ... Bou, G. (2015). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(5), 338–341. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.015>
- Rodríguez, G. (2016). *Descripción de casos de infección por Enterobacterias productoras de carbapenemasas en un periodo de 3 años (2013 a 2015) en un Hospital Universitario de tercer nivel*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/53185/7/gabrielrodriguez2016.pdf>

- Rojas, L. J., Mojica, M. F., Blanco, V. M., Correa, A., Montealegre, M. C., De La Cadena, E., ... Villegas, M. V. (2013). Emergence of Klebsiella pneumoniae Coharboring KPC and VIM Carbapenemases in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 1101–1102. <https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12>
- Romero, D., Reyes, J., Quezada, V., Satán, C., Cevallos, N., Barrera, S., ... Villacís, J. (2017). First case of New Delhi metallo- β -lactamase in Klebsiella pneumoniae from Ecuador: An update for South America. *International Journal of Infectious Diseases*, (65), 119–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.012>
- Rosso-Fernández, C., Sojo-Dorado, J., Barriga, A., Lavín-Alconero, L., Palacios, Z., López-Hernández, I., ... FOREST Study Group. (2015). Fosfomycin versus meropenem in bacteraemic urinary tract infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli (FOREST): study protocol for an investigator-driven randomised controlled trial. *BMJ Open*, (March 2014), 1–10. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007363>
- Roussos, N., Karageorgopoulos, D. E., Samonis, G., & Falagas, M. E. (2009). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(6), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.08.013>
- Ryan, K., & Ray, G. (2011). *Sherris: Microbiología Médica*. Mc Graw Hill. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Salgado, P., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2015). Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. *Revista Española de Quimioterapia de Quimioterapia*, 28, 12–15.

- Salles, M., Zurita, J., Mejía, C., & Villegas, M. (2013). Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*, *141*(12), 2459–2472. <https://doi.org/10.1017/S095026881300191X>
- Samonis, G., Maraki, S., Karageorgopoulos, D. E., Vouloumanou, E. K., & Falagas, M. E. (2012). Synergy of fosfomicin with carbapenems , colistin , netilmicin , and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* , *Escherichia coli* , and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *30*, 89–95. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1360-5>
- Sauermann, R., Marsik, C., Steiner, I., Seir, K., Cvitko, T., Zeitlinger, M., ... Joukhadar, C. (2007). Immunomodulatory Effects of Fosfomicin in Experimental Human Endotoxemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(5), 1879–1881. <https://doi.org/10.1128/AAC.00914-06>
- Schintler, M. V., Traunmüller, F., Metzler, J., Kreuzwirt, G., Spindel, S., Mauric, O., ... Joukhadar, C. (2009). High fosfomicin concentrations in bone and peripheral soft tissue in diabetic patients presenting with bacterial foot infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(3), 574–578. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp230>
- SEIMC. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Sheu, C. C., Chang, Y. T., Lin, S. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2019). Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
- Souli, M., Galani, I., Boukovalas, S., Gourgoulis, M. G., Chryssouli, Z., Kanellakopoulou, K.,

- ... Giamarellou, H. (2011). In Vitro Interactions of Antimicrobial Combinations with Fosfomycin against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Protection of Resistance Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2395–2397. <https://doi.org/10.1128/AAC.01086-10>
- Sun, C., Falagas, M. E., Wang, R., Karageorgopoulos, D. E., Yu, X., Liu, Y., ... Liu, Z. (2011). In vitro activity of minocycline combined with fosfomycin against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics*, 64(8), 559–562. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.52>
- Tang, H., Chen, C., Cheng, K., Wu, K., Lin, Y., Zhang, C., ... Chuang, Y. (2013). In Vitro Efficacies and Resistance Profiles of Rifampin-Based Combination Regimens for Biofilm-Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5717–5720. <https://doi.org/10.1128/aac.01236-13>
- Tang, H., Chen, C., Zhang, C., Su, B., Li, C., Weng, T., ... Chuang, Y. (2013). In vitro efficacy of fosfomycin-based combinations against clinical vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.012>
- Tängdén, T., Hickman, R., Forsberg, P., Lagerbäck, P., Giske, C., & Cars, O. (2014). Evaluation of Double and Triple Antibiotic Combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (January), 1–19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00741-13>
- Tille, P. (2014). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Elsevier.
- Tobudic, S., Matzneller, P., Stoiser, B., Wenisch, M., Zeitlinger, M., Vychytil, A., & Jaeger, W. (2012). Pharmacokinetics of Intraperitoneal and Intravenous Fosfomycin in Automated Peritoneal Dialysis Patients without Peritonitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 7000–7005. <https://doi.org/10.1128/AAC.01812-12>

- Chemotherapy*, 56(7), 3992–3995. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-12>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Nine). Editorial Médica Panamericana.
- Toye, B., Krajden, S., Fuksa, M., Low, D. E., & Pillai, D. R. (2009). Carbapenem resistance in Canada. *Canadian Medical Association or Its Licensors*, 180(12), 1225–1226. <https://doi.org/10.1503/cmaj.090167>
- Trapnell, B. C., Mccolley, S. A., Kissner, D. G., Rolfe, M. W., Rosen, J. M., Mckevitt, M., ... Geller, D. E. (2008). Fosfomycin / Tobramycin for Inhalation in Patients with Cystic Fibrosis with Pseudomonas Airway Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(4), 171–178. <https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0924OC>
- Traunmller, F., Popovic, M., Konz, K. H., Vavken, P., Leithner, A., & Joukhadar, C. (2011). A reappraisal of current dosing strategies for intravenous fosfomycin in children and neonates. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(8), 493–503. <https://doi.org/10.2165/11592670-000000000-00000>
- Tuon, F. F., Rocha, J. L., Formighieri, M. S., Sfair, S., Bertoldi, M. B., Palmeiro, J. K., & Dalla Costa, L. M. (2013). Fosfomycin susceptibility of isolates with blaKPC-2 from Brazil. *Journal of Infection*, 247–249. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.04.017>
- Valour, F., Trouillet, S., & Laurent, F. (2015). Antimicrobial activity against intra-osteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.04359-14>
- Van Duin, D., Lok, J. J., Earley, M., Cober, E., Richter, S. S., Perez, F., ... Evans, S. (2018). Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 66(2), 163–

171. <https://doi.org/10.1093/cid/cix783>

Villegas, M. V., Pallares, C., Escandón, K., Hernández, C., Correa, A., Álvarez, C., ... Guzmán-Blanco, M. (2016). Characterization and Clinical Impact of Bloodstream Infection Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Seven Latin American Countries. *PLOS ONE*, *11*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154092>

Wachino, J. I., Yamane, K., Suzuki, S., Kimura, K., & Arakawa, Y. (2010). Prevalence of fosfomicin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomicin-modifying enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(7), 3061–3064. <https://doi.org/10.1128/AAC.01834-09>

Wei, Z. Q., Du, X. X., Yu, Y. S., Shen, P., Chen, Y. G., & Li, L. J. (2007). Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(2), 763–765. <https://doi.org/10.1128/AAC.01053-06>

Wind, C., Vries, H., & van Dam, A. (2015). International Journal of Antimicrobial Agents Determination of in vitro synergy for dual antimicrobial therapy against resistant *Neisseria gonorrhoeae* using Etest and agar dilution. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *45*, 305–308. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.10.020>.

Winn, Allen, Janda, Koneman, & Procop. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Xu-Hong, Y., Falagas, M. E., Dong, W., Karageorgopoulos, D. E., De-Feng, L., & Rui, W. (2014). In vitro activity of fosfomicin in combination with linezolid against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics*, *67*(5),

369–371. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.5>

Zurita, J. (2012). *Resistencia bacteriana en el Ecuador* (Primera). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Zurita, J., Parra, H., & Cartelle, M. (2010). First case of NDM-1 producing *Providencia rettgeri* in Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.003>.

ANEXO 1: Autorización INSPI

Pontificia Universidad
Católica del Ecuador
Facultad de Medicina,
Carrera de Bioquímica Clínica



Quito 30 de agosto de 2018

Dra. Mayra Beatriz Wilca Pumagualli
Coordinadora
Zonal 9 del Instituto de Investigación en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"
INSPI - LIP

De mi consideración. –


Por medio de la presente solicito a usted autorice la realización del proyecto de investigación en colaboración con el Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, el cual será realizado por el estudiante:

- Srta. Katherine Estefanía Mariño Brito con CI: 171712038-8, preplan para el Trabajo de Titulación intitulado: "Evaluación de la actividad in vitro de Fosfomicina por el método de dilución en agar, microdilución y difusión en disco, en cepas de enterobacterias obtenidas de aislados clínicos remitidos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Quito, en el periodo 2017-2018"

El trabajo se realizará con aislados de *enterobacterias* provenientes de aislados clínicos; que son remitidos al INSPI. La relación entre el instituto y el tesista no implica un vínculo laboral y es netamente de formación académica sin remuneración alguna.

Por lo anteriormente señalado solicito a usted su colaboración para que los estudiantes realicen el trabajo de titulación y el oficio correspondiente a este pedido. Seguro de contar con su colaboración a esta actividad académica de beneficio para la comunidad y de relevancia científica para las dos instituciones anticipo mi agradecimiento.

Atentamente Septiembre 2018 - Marzo 2019


Dr. Francisco Pérez Pazmiño
Decano de la Facultad de Medicina



31-08-18
14:23




Av. 12 de Octubre 1076 y Ramón Roca
Apartado postal 17-01-2184
Telf.: (593) 2 299 17 00
Quito - Ecuador www.puce.edu.ec

Recibido 06-sep-2018
GIDI - EPISIG



ANEXO 2: Acuerdo de entendimiento para la dirección de tesis en el laboratorio de referencia RAM-Q INSPI.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	<p>ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS</p>		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	<p>Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9</p>	<p>Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación</p>	Fecha Aprobación:	30/07/2018

Intervienen en la celebración, por una parte, la Coordinación Zonal 9 - INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, INSPI – “DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ”, en lo sucesivo denominado “INSPI”, representado por el Ing. **FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO**, en su carácter de **RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS CZ9** y, por la otra parte, **KATHERINE ESTEFANÍA MARIÑO BRITO**, estudiante de la **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR** en lo sucesivo denominada/o “**TESISTA**”, declarando que es su voluntad de suscribir el presente documento al tenor de las siguientes cláusulas:


PRIMERA. ANTECEDENTES

- I. Con fecha 20 de Noviembre del 2016, el INSPI y la Pontificia Universidad Católica del Ecuador suscribieron un Convenio Marco, cuyos objetos consisten en establecer un marco general referencial a fin de que las partes puedan promover la colaboración en intercambio científico, la transferencia de tecnología y del conocimiento para el desarrollo de habilidades y destrezas en el campo de salud humana; la realización de investigaciones conjuntas; el intercambio de información científico-técnica y de personal especializado, procurando la complementación de acciones conjuntas en áreas de competencia de ambas partes, con una vigencia de 5 años, contados a partir de la fecha de su firma.
- II. En la Cláusula tercera se estableció que las partes podrán celebrar Acuerdos de Entendimiento con el objetivo de dejar constancia expresa de la voluntad de establecer Colaboración Académica-Científica.

SEGUNDA. OBJETIVOS.

El Presente acuerdo tiene los siguientes objetivos:

- Formalizar el vínculo entre el TESISTA e INSPI, por el cual se manifiesta que, el Ing. **FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO, RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS CZ9** se compromete a dirigir el trabajo de tesis de **KATHERINE ESTEFANÍA MARIÑO BRITO, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA, FACULTAD DE MEDICINA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**, para la obtención del título de **BIOQUÍMICA CLÍNICA**, que se realizará bajo la responsabilidad conjunta.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018

TERCERA. COMPROMISO DE LAS PARTES.

DEL INSPI


El Ing. **FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO, RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS CZ9**, tendrá las siguientes obligaciones:

- ✓ Dar un trato respetuoso y cordial al TESISTA;
- ✓ Informar al estudiante sobre los Reglamentos y Lineamientos para vinculación académica, así como de las políticas internas y demás información necesaria que tenga que conocer para desarrollar debida y plenamente las actividades que le sean asignadas;
- ✓ Aceptar la designación como Director/Tutor con el fin de que el Tesista pueda cumplir a cabalidad sus actividades asignadas y desarrollar eficazmente sus destrezas y aptitudes;
- ✓ Coordinar con el tutor académico de la **PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR** el control, seguimiento y evaluación de las actividades del TESISTA;
- ✓ Brindar las facilidades para el correcto desempeño de la investigación del TESISTA, conforme la planificación de actividades;
- ✓ Elaborar y entregar, al finalizar la investigación, el certificado del ejercicio de las actividades, una vez que se haya receptado el ejemplar digital de tesis concluida en formato PDF.
- ✓ Revisar y avalar el registro de las actividades del TESISTA.

DEL TESISTA

Son compromisos del TESISTA:

- ✓ Presentar la solicitud, dirigida a la máxima autoridad de la Coordinación Zonal, para que El Ing. **FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO, RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS CZ9** dirija su trabajo de tesis para la obtención de **BIOQUÍMICA CLÍNICA**.
- ✓ Acogerse por escrito a las condiciones establecidas en los lineamientos dando énfasis a clasificación descrita por los lineamientos regidos por el INSPI (Tesis con sus propias temas/ Tesis de colaboración);

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018

- ✓ Entregar el Acuerdo de Entendimiento, firmado por el Tutor del INSPI y por el TESISTA.
- ✓ Enviar propuesta de investigación bajo el formato establecido en el INSPI.
- ✓ Entregar informes periódicos de avances de la investigación y un informe final;
- ✓ Comunicar de toda situación o evento que afecte el desarrollo de sus actividades a ambas instituciones.
- ✓ Entregar ejemplar digital de tesis concluida en formato PDF.

Las partes se comprometen a establecer mecanismos para garantizar la ejecución, control, seguimiento y evaluación de los objetos descritos en este Acuerdo de Entendimiento.

CUARTA. RELACIÓN LABORAL.


Por la naturaleza de esta vinculación, no se generan derechos ni obligaciones laborales o administrativas, no se crea ningún tipo de estabilidad laboral, y se manifiesta que el "TESISTA" no es sujeto de indemnización alguna y no ingresa a la carrera de servicio público.

Es facultad del INSPI, según capacidad y disponibilidad presupuestaria, otorgar remuneraciones y/o reconocimientos monetarios honorarios extraordinarios al "TESISTA", salvo disposición contraria establecida por la ley.

Sin embargo, aun cuando el TESISTA no mantiene ningún vínculo laboral con la institución, tiene la obligación de cumplir cabalmente con lo establecido en el Reglamento Interno Vigente del INSPI, el Código de Ética Institucional, las Políticas Internas así como debe sujetarse a las normas y políticas, incluyendo a las políticas de bioseguridad del laboratorio que lo acoge.

QUINTA. DURACIÓN.

El presente instrumento entrará en vigor a partir de la fecha de su firma y tendrá una duración de 6 meses, prorrogable, según evaluación y aprobación de ambas partes, previa evaluación de los resultados obtenidos y mediante acuerdo por escrito.

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018

SEXTA. PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD.

Todos los datos ya sean oral, impresa, contenida en medios electrónicos o electromagnéticos, propiedad de las partes o de sus unidades, se deberán mantener en sigilo, protección y reserva, sin divulgación a terceros, y sólo serán accesibles cuando la tesis sea publicada.

Las partes convienen que las publicaciones, así como la difusión de los resultados derivados se realizarán de común acuerdo a los lineamientos de vinculación académica del "INSPI"

Las partes convienen de manera expresa que los trabajos que se deriven de la ejecución del presente Acuerdo de Entendimiento que sean susceptibles de protección intelectual, corresponderán a la parte cuyo personal haya realizado el trabajo objeto de protección, dándole el debido reconocimiento a quienes hayan intervenido en la realización del mismo.


En caso de trabajos generados y de los cuales no sea posible determinar el grado de participación del INSPI y el TESISISTA, la titularidad de los derechos corresponderá a los dos en partes iguales, otorgando el debido reconocimiento a quienes hayan intervenido en la realización del mismo.

Queda expresamente entendido, que el TESISISTA podrá utilizar en sus tareas académicas, los resultados obtenidos de las actividades amparadas por el presente instrumento.

SEPTIMA. AUTORÍAS:

En el caso se decida preparar una publicación de cualquier índole usando los datos de estos proyectos, los investigadores involucrados se comprometen a regirse a las líneas guía del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE). Las líneas guía del ICMJE indican que la autoría se defina siguiendo las siguientes 4 condiciones (ICMJE, 2015):

1. Contribución substancial a la concepción o diseño del estudio; o la adquisición, análisis o interpretación de los datos del estudio,

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquierdo Pérez	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018

2. Elaboración del borrador del manuscrito o revisión crítica del contenido intelectual del mismo,
3. Aprobación final de la versión que será publicada,
4. Estar de acuerdo con ser responsable (poder rendir cuentas) del contenido y todos los aspectos del estudio y del artículo, asegurando que cualquier pregunta o duda sobre la precisión del estudio sean investigadas y resueltas de forma apropiada.


Los autores deberán cumplir con las 4 condiciones, donde en representación del INSPI El **Ing. FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO** en su calidad de **RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS CZ9**, y (los demás delegados que intervengan en el proceso de elaboración del trabajo de tesis), serán coautores de la publicación.

Otras personas que contribuyen al trabajo, como por ejemplo proveedores de reactivos esenciales o recopilación de datos, también se los podrá incluir en la autoría siempre cuando cumplan con las condiciones 2, 3 y 4. Personas que no cumplan con los 4 criterios deberán figurar solamente en los agradecimientos

OCTAVA. TERMINACIÓN.

Se dará por terminado el presente acuerdo por las siguientes causales:

- Por el cumplimiento del plazo y objeto del presente documento;
- Por mutuo acuerdo de las partes;
- Por decisión unilateral del INSPI, a razón de que el TESISTA incurra en: faltas de Conducta/ incumplimiento e inobservancia de lo establecido en los Lineamientos y Reglamentos del INSPI; realización de actividades indebidas como: hacer mal uso de los bienes de la institución, realizar actividades no acordadas, realizar actos de proselitismo político dentro de la institución;
- Por abandono de estudios, sin comunicar de forma escrita su voluntad, mientras el mencionado se encuentre realizando sus actividades.

 <p>INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</p>	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
	Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018

NOVENA. RESPONSABLES.

Son responsables de promover y cumplir las condiciones del presente acuerdo:

➤ **Por el INSPI :**

Nombre del Tutor: Ing. **FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO**

Cargo: Responsable del Laboratorio de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos CZ9

Dirección: Iquique N14-285 y Yaguachi

Teléfono: 2509625

E-mail: fvillavicencio@inspi. gob.ec

➤ **Por el TESISISTA:**

Nombre del Tesisista: **KATHERINE ESTEFANÍA MARIÑO BRITO**

Facultad / Carrera: Facultad de Medicina, Carrera de Bioquímica Clínica

Dirección: Avenida 12 de Octubre 1076, Vicente Ramón Roca, Quito

Teléfono: 2991700 Ext. 1645

E-mail: kmarino343@puce.edu.ec

DECIMA. COMUNICACIONES.


Para efecto de las comunicaciones que se necesiten entre las partes, se establecen las siguientes direcciones:

INSPI: Iquique N14-285 y Yaguachi. Áreas Técnicas

TESISTA: Laboratorio de Referencia de Resistencia a los Antimicrobianos

DÉCIMA PRIMERA. CONTROVERSAS

Por ser este un Acuerdo, las eventuales controversias o reclamaciones que pudieran surgir de la interpretación y aplicación del mismo, sus posteriores enmiendas, o cualquier cuestión no acordada

 INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA <small>Dr. Leopoldo Izquieta Pérez</small>	ACUERDO DE ENTENDIMIENTO PARA LA DIRECCIÓN DE TESIS		Código:	F-I+D+i-003
			Edición:	02
Macro-Proceso: Coordinación Zonal 9	Proceso Interno: Gestión de Investigación, Desarrollo e Innovación	Fecha Aprobación:	30/07/2018	

Por ser este un Acuerdo, las eventuales controversias o reclamaciones que pudieran surgir de la interpretación y aplicación del mismo, sus posteriores enmiendas, o cualquier cuestión no acordada relacionada con su contenido, será resuelta en forma directa y amigable por las partes, en el plazo de quince (15) días, contados a partir de la notificación de la contraparte.

De no mediar acuerdo alguno y persistir las divergencias, las partes convienen someter las controversias al procedimiento de Mediación en el Centro de Mediación de la Procuraduría General del Estado.

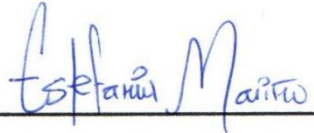
DÉCIMA SEGUNDA. ACEPTACIÓN

Las Partes declaran estar de acuerdo con el contenido de todas y cada una de las cláusulas materia del presente instrumento, por así convenir a sus respectivos intereses, indicando que en su celebración no existe mala fe, o cualquier otro motivo que vicie su consentimiento, por lo que las aceptan y se ratifican en cada una de ellas, y para constancia de lo estipulado firman en unidad de acto en CUATRO (4) ejemplares del mismo contenido, y tenor, en la Ciudad de Quito a los 22 días del mes de octubre del 2018.



Ing. FERNANDO XAVIER
VILLAVICENCIO ZAMBRANO

**RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE
REFERENCIA DE RESISTENCIA A LOS
ANTIMICROBIANOS CZ9**



KATHERINE ESTEFANÍA MARIÑO BRITO



**FACULTAD DE MEDICINA, CARRERA DE
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL
ECUADOR**

ANEXO 3: Acuerdo de confidencialidad

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA INSPI
DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ

COORDINACIÓN ZONAL 9 INSPI

  EL GOBIERNO DE TODOS

Quito a los 22 días, del mes de Octubre de 2018...

Yo Estefanía Moreno servidor de la Coordinación Zonal 9 del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, con el cargo actual de Asista en la Unidad/Gestión Vigilancia Epidemiológica - RAI bajo la modalidad de (contrato/nombramiento) Asista suscribo el presente Acuerdo de Confidencialidad de la Información, aceptando que

ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD

1. Me comprometo a guardar prudencia y reserva en los asuntos institucionales y en los que atañen a mis funciones, a fin de precautelar la buena imagen de la Coordinación Zonal 9- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, por lo que, he sido informado y acepto en atención a la naturaleza de la información que recibiré, generaré y que estará bajo mi responsabilidad, el compromiso por los riesgos que el mal uso y/o divulgación de la misma implican para la "INSTITUCIÓN", mantendré en forma estrictamente reservada y confidencial toda información relevante que se me proporcione o que tenga acceso en función de las actividades a cumplir; por lo tanto, es necesario el abstenerse de usar, disponer, divulgar y/o publicar por cualquier medio, oral o escrito, y en general, aprovecharse de ella en cualquier otra forma para efectos ajenos a los intereses de la Institución y del País.
2. Entiendo que toda la información no pública relacionada con las personas y entidades públicas tiene el carácter de confidencial, por tanto, están sujetas a reserva de mi parte y sólo puedo utilizarla para los fines que mis responsabilidades como funcionario de la Coordinación Zonal 9- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez lo requiera.
3. Entiendo que el incumplimiento de cualquiera de las obligaciones que constan en el presente documento, intencionadamente o por negligencia, podrían implicar, las sanciones disciplinarias correspondientes por parte de la Coordinación Zonal 9 del INSPI, las Leyes vigentes (LOSNCPI) y demás normativa vigente especifiquen.
4. Tengo claro que el artículo 178 del Código Orgánico Integral Penal establece que: "La persona que, sin contar con el consentimiento o la autorización legal, acceda, intercepte, examine, retenga, grabe, reproduzca, difunda o publique datos personales, mensajes de datos, voz, audio y vídeo, objetos postales, información contenida en soportes informáticos, comunicaciones privadas o reservadas de otra persona por cualquier medio, será sancionada con pena privativa de libertad de uno a tres años...";
5. Conozco que el artículo 190 ibidem señala que: "La persona que utilice fraudulentamente un sistema informático o redes electrónicas y de telecomunicaciones para facilitar la apropiación de un bien ajeno o que procure la transferencia no consentida de bienes, valores o derechos en perjuicio de esta o de una tercera, en beneficio suyo o de otra persona alterando, manipulando o modificando el funcionamiento de redes electrónicas, programas, sistemas informáticos, telemáticos y equipos terminales de telecomunicaciones, será sancionada con pena privativa de libertad de uno a tres años(...)"

Iquique N° 14-285 y Yaguachi
Teléfono: 0225680411 - 0225527115 - 022565858
www.investigacion.salud.gob.ec



6. Me comprometo a cumplir con el Reglamento de Información Confidencial en el Sistema Nacional de Salud, establecido mediante Acuerdo Ministerial 5216 - Registro Oficial Suplemento 427, del 29 de enero de 2015.

Firma del servidor

Katherine Esquivel Marín

Nombres Completos: Katherine Esquivel Marín Brito
CI: 171712038-8

ANEXO 4: Carta de aprobación CEISH - USFQ.

2018-249E



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGVS-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 23 de octubre de 2018

Señorita
Katherine Estefanía Mariño Brito
Investigadora Principal
Facultad de Medicina Carrera de Bioquímica Clínica-PUCE
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación **“Evaluación de la actividad in vitro de Fosfomicina por el método de dilución en agar y difusión en disco en cepas de Enterobacterias resistentes a carbapenémicos obtenidas de aislados clínicos remitidos al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Quito, periodo 2017-2018”**, ha sido aprobada el día de hoy como un estudio *exento*, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes y/o los riesgos son razonables en relación a los beneficios anticipados del estudio.
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 1 de octubre 21, 2018 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 9 páginas;
- Solicitud de no aplicación al consentimiento informado por escrito, 2 página;
- Hoja de vida de la investigadora principal, 3 páginas.

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador
comitebioetica@usfq.edu.ec
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

2018-249E

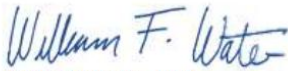
Esta aprobación tiene una duración de **un año (365 días)** transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2018-249E**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
2. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
3. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



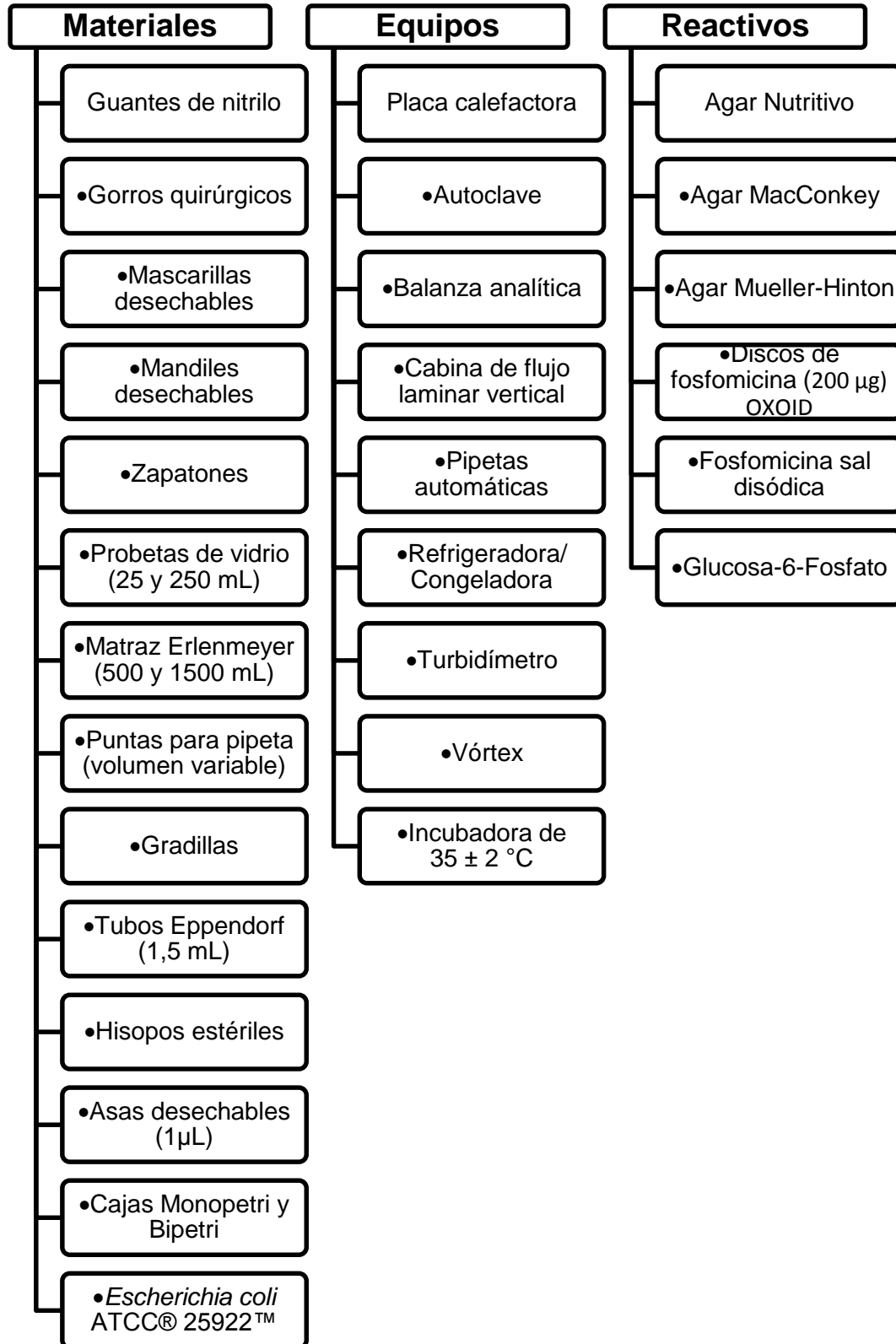
William Waters, PhD

Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ
cc. Archivo general, Archivo protocolo



Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador
comitebioetica@usfq.edu.ec
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

ANEXO 5: Materiales, equipos y reactivos



ANEXO 6: Anonimización de datos

Los datos fueron registrados en una hoja electrónica sin la posibilidad de identificación, se utilizó un código en sustitución de los identificadores y se creó una lista que conectó el código y el identificador, la cual, fue archivada en un procesador con clave de acceso y será eliminada 7 años posterior a la información de resultados.

ANEXO 7: Recuperación de cepas conservadas

Cada cepa que se encuentra preservada en crio tubos con caldo BHI+ Glicerol al 20%, fue sembrada mediante la técnica de estriado por agotamiento en los medios Agar Nutritivo y en Agar selectivo y diferencial MacConkey Lactosa, ambos marca Oxoid, a 37 ± 5 °C durante 24 horas en aerobiosis.

ANEXO 8: Protocolo difusión en disco (CLSI M02)

1. Preparación de cajas con agar Mueller-Hinton

- CLSI recomienda el uso de agar Mueller-Hinton para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

2. Preparación del inóculo bacteriano

- La suspensión se preparará a partir de colonias aisladas en una placa de agar incubada de 18 a 24 horas.
- La concentración idónea es de 0.5 en escala McFarland del microorganismo a evaluar.

3. Inoculación del microorganismo

- Realizar la inoculación dentro de 15 minutos tras la preparación de la suspensión.
- Se introduce en la suspensión ajustada un hisopo de algodón estéril. Se homogeniza y se presiona firmemente en la pared interior del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Inocular uniformemente toda la superficie de la caja con agar Mueller-Hinton.

4. Aplicación de disco antibiótico (fosfomicina 200 µg marca OXOID)

- Colocar con una pinza el disco antimicrobiano en la superficie del agar previamente inoculado.

5. Incubación

- Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a 35 ± 2 ° C durante 16 a 18 horas.

6. Interpretación de resultados

- Medir el diámetro del halo de inhibición e interpretar la susceptibilidad según los puntos de corte establecidos por CLSI-M100 (2018).

7. Registro de resultados

- Registrar los resultados en la plantilla propuesta en el (**Anexo 9.3**) de acuerdo a la numeración.

ANEXO 9: Protocolo dilución en agar (CLSI M07)

1. Preparación del antibiótico

- Preparar una solución madre de fosfomicina a una concentración de 51200 µg/mL **(Anexo 9.1)**.
- Preparar la solución de trabajo de fosfomicina a una concentración de 10240 µg/mL para llevar a cabo las 5 diluciones requeridas: (5120, 2560, 1280, 640 y 320) µg/mL **(Anexo 9.1)**.

2. Preparación de cajas para dilución en agar

- Mezclar en un recipiente estéril 1 mL de cada dilución con 29 mL de agar Mueller Hinton; suplementar la mezcla con 25 mg/L de G-6-P (Glucosa-6-fosfato). Las concentraciones finales de antibiótico son: 256, 128, 64, 32, y 16 µg/mL. **(Anexo 9.2)**.
- Verter la mezcla en cajas monopetri estériles, previamente rotuladas. Permitir que el agar se solidifique a temperatura ambiente.

3. Preparación del inóculo bacteriano

- Realizar una suspensión con una concentración de 0.5 en escala McFarland del microorganismo a evaluar.

4. Inoculación del microorganismo

- Asegurarse que la superficie del agar se encuentre seca antes de inocular el microorganismo.
- Se requiere un inóculo de 10^4 UFC por lugar. Las suspensiones ajustadas al estándar de 0.5 McFarland contienen aproximadamente $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL.
- Cuando se usan replicadores de 3 mm que depositan de 1-3 µL, se debe realizar una dilución 1:10 a la suspensión 0.5 McFarland con caldo o solución salina estéril

para obtener una concentración de 10^7 UFC. El inóculo final en el agar será de aproximadamente 10^4 UFC por lugar.

- Si se utiliza replicadores de 1 mm de diámetro que depositan 0.1 a 0.2 μL , no se requiere diluir la suspensión inicial.
- Las suspensiones deben ser inoculadas dentro de los 15 minutos de preparación.
- Utilizar la plantilla propuesta para la inoculación de los microorganismos (Ver **Figura 15**).
- Permitir que todas las cajas inoculadas se mantengan a temperatura ambiente, hasta que cada inóculo sea absorbido por el agar.
- Invertir las cajas e incubar a 35 ± 2 °C durante 16 a 20 horas.

5. Interpretación de resultados

- Para interpretar el punto final, utilizar la plantilla propuesta para la lectura de resultados (Ver **Figura 15**).
- Registre la CMI como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento. No tomar en cuenta la presencia de una sola colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo.
- Interpretar la susceptibilidad según los puntos de corte establecidos por CLSI-M100 (2018).

6. Registro de resultados

- Registrar los resultados en la plantilla propuesta en el (**Anexo 9.3**) de acuerdo a la numeración.

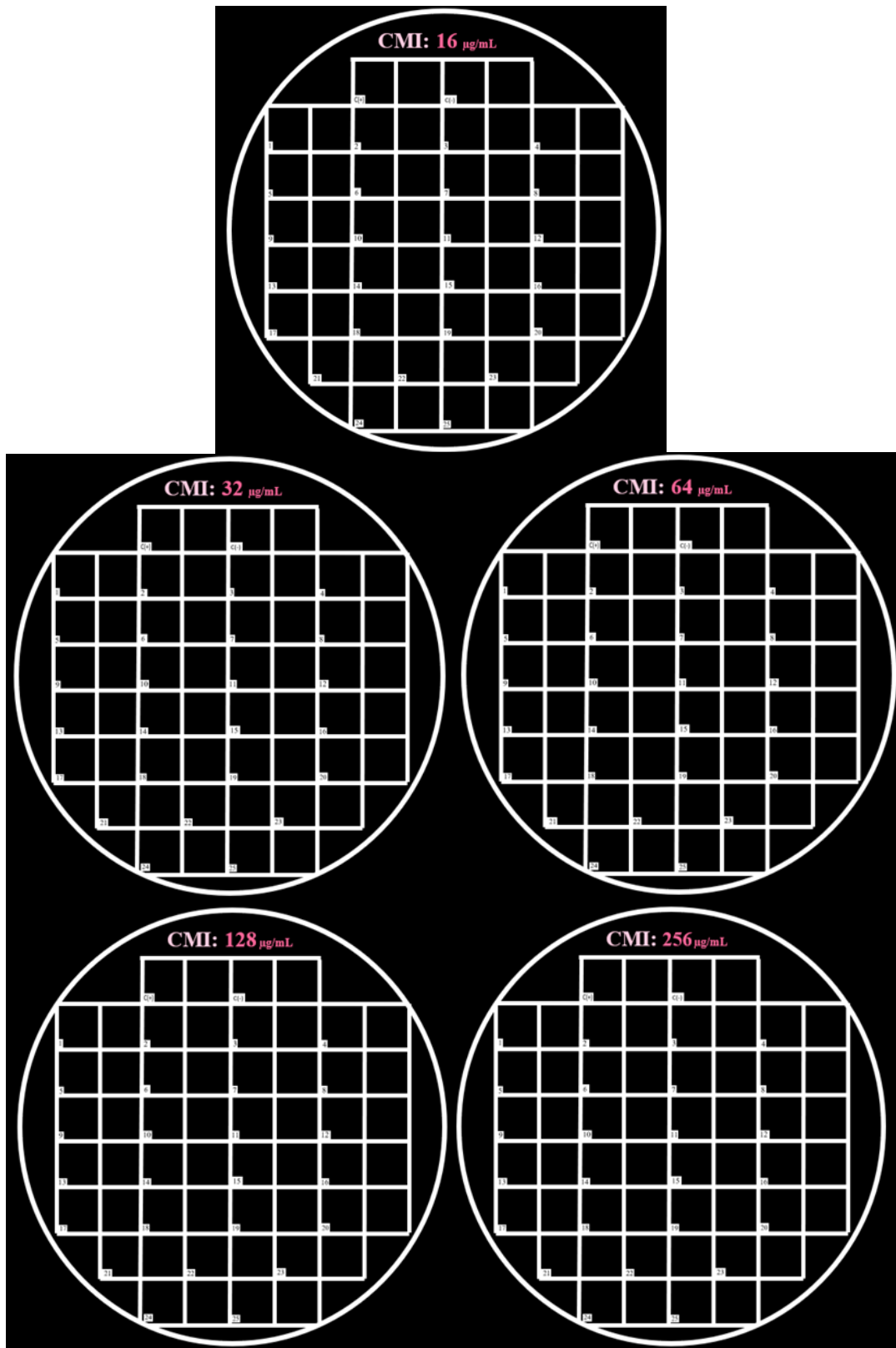


Figura 15. Plantilla para inoculación de muestras y lectura de resultados.

Autor: Mariño, E.

Anexo 9.1: Protocolo de preparación solución madre de fosfomicina sal disódica

DATOS ANTIBIÓTICO	
Lote: 097M4027V	Casa Comercial: SIGMA
Potencia: 981g/mg	Almacenamiento: 2-8°C
Solvente: Agua	Pureza: 98.1% (HPLC)
Fracción Activa: 100 %	Porcentaje de Agua: 0 %

9.1.1. Cálculo potencia

$$\text{Potencia} = \text{Pureza} \times \text{Fracción Activa} (1 - \% H_2O)$$

$$\text{Potencia} = 981 \times 1.0 (1 - 0)$$

$$\text{Potencia} = 981 \frac{\mu g}{mg}$$

9.1.2. Preparación solución madre (SM)

Volumen final: 5 mL

Concentración: 51200 $\mu g/mL$

$$\text{Peso Fosfomicina} = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu g}{mL} \right)}{\text{Potencia } \mu g/mg}$$

$$\text{Peso Fosfomicina} = \frac{5 \text{ ml} \times 51200 \frac{\mu g}{mL}}{981 \frac{\mu g}{mg}}$$

$$\text{Peso Fosfomicina} = 260.958 = 261 \text{ mg}$$

261 mg Fosfomicina en Polvo + 5000 μL de Agua Molecular

9.1.3. Preparación solución de trabajo (ST)

Volumen Final: 1100 μL

Concentración Final: 10240 $\mu\text{g/mL}$

A partir de una alícuota de la SM:

220 μL de SM + 880 μL de Agua molecular

(Almacenar -20°C)

Anexo 9.2: Protocolo de preparación de agar Mueller-Hinton y fosfomicina suplementado con 25 mg/L de G-6-P (Glucosa-6-fosfato).

Solución de Trabajo (ST): 10240 $\mu\text{g/mL}$

Preparación de diluciones (1 tubo): VF: 1000 μL

Tabla 4.

Preparación de diluciones

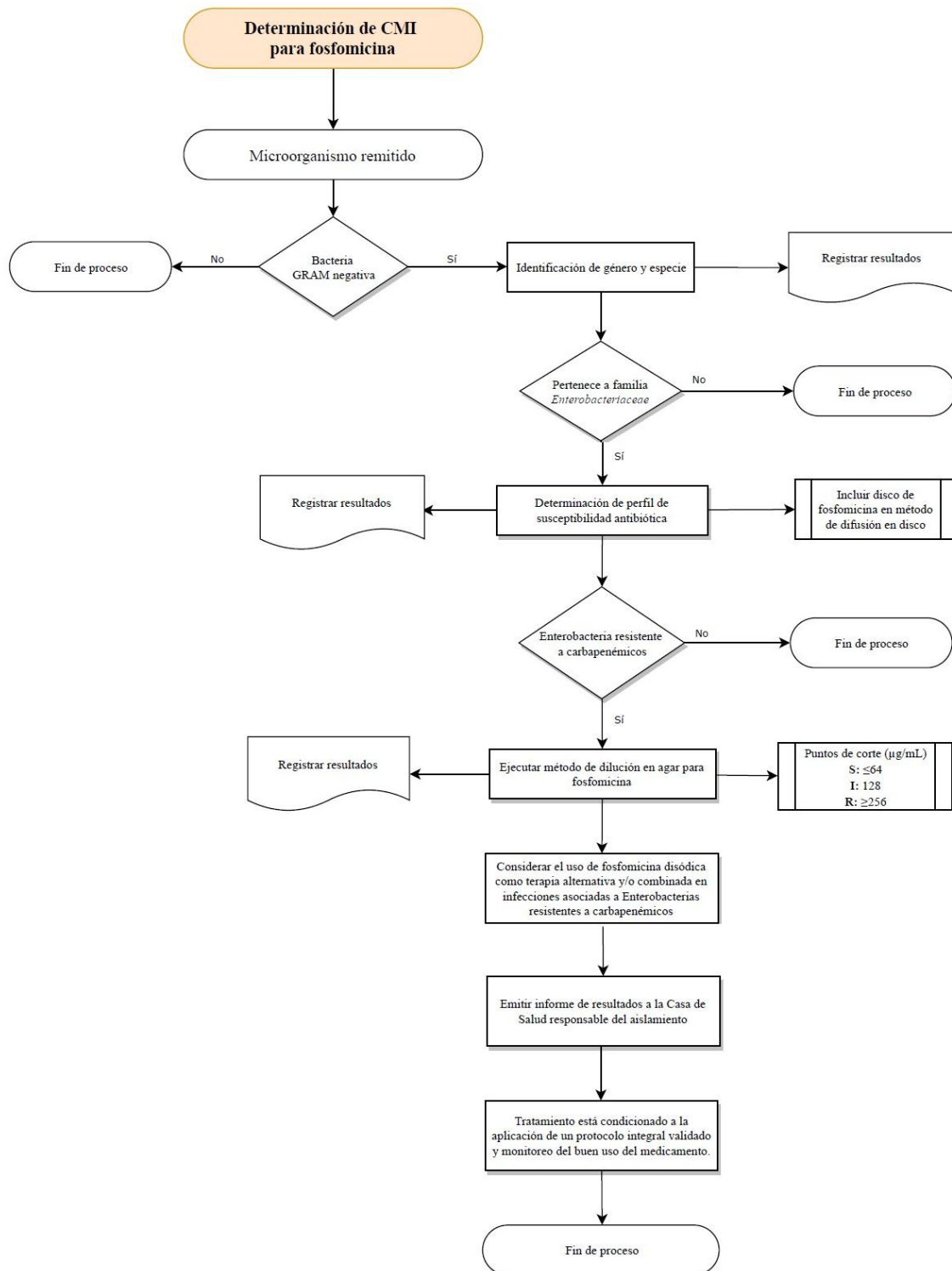
No.	Concentración solución ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen ST (μL)	Volumen Solvente (μL)	Concentración final (+ 19 mL MHA)
1	5120	500	500	256
2	2560	250	750	128
3	1280	125	875	64
4	640	62.5	937.5	32
5	320	31.25	968.75	16

Anexo 9.3: Plantilla para recolección de resultados

No.	Código	FOT (DD) (≥ 16 ; 13-15; ≤ 12)	FOT (CMI) (≤ 64 ; 128; ≥ 256)
C (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
C (+)	<i>Acinetobacter baumannii</i>		
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			

Autor: Mariño, E.

ANEXO 10: Algoritmo de evaluación y pertinencia de reporte de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos.



Autor: Mariño, E.

ANEXO 11: Cálculo índice kappa

Tabla 5.

Resultados de los métodos de difusión en disco y dilución en agar de fosfomicina en enterobacterias resistentes a carbapenémicos (ERC).

Índice Kappa		Dilución en agar (DA)			TOTAL (DD)
		S	I	R	
Difusión en disco (DD)	S	119	3	0	122
	I	0	1	3	4
	R	0	0	24	24
TOTAL (DA)		119	4	27	150

Concordancia:

$$\% \text{ concordancia} = \frac{119 + 1 + 24}{150} \times 100\% = 96 \%$$

Concordancia debida al azar:

$$S = \frac{119 \times 122}{150} = 96,79$$

$$I = \frac{4 \times 4}{150} = 0,11$$

$$R = \frac{27 \times 24}{150} = 4,32$$

$$\% \text{ concordancia debida al azar} = \frac{96,79 + 0,11 + 4,32}{150} \times 100\% = 67,48$$

$$\mathbf{Kappa (K)} = \frac{96 - 67,48}{100 - 67,48} = 0,88$$

ANEXO 12: Imágenes



Figura 16. Elaboración de medios de cultivo.

Autor: Mariño, E.

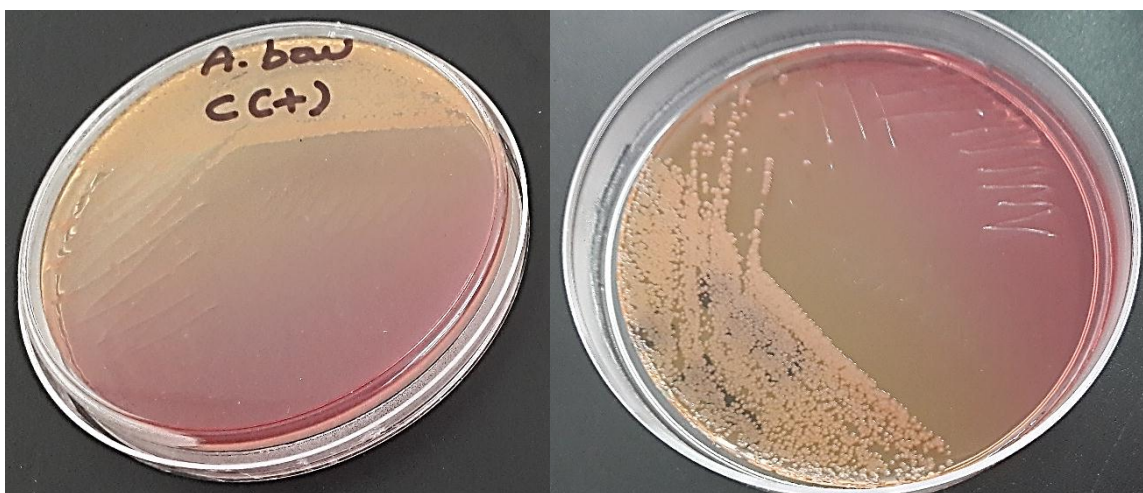


Figura 17. *Acinetobacter baumannii*, control positivo.

Autor: Mariño, E.



Figura 18. *Escherichia coli* ATCC 25922, control negativo.

Autor: Mariño, E.



Figura 19. Procesamiento de muestras.

Autor: Mariño, E.

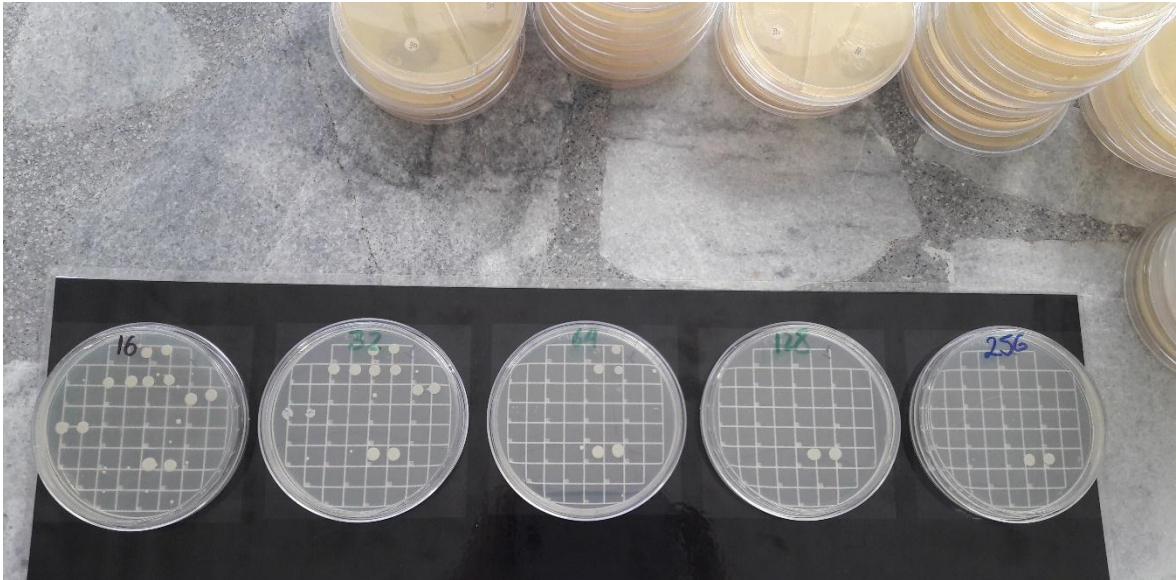


Figura 20. Lectura de resultados dilución en agar (1)

Autor: Mariño, E.

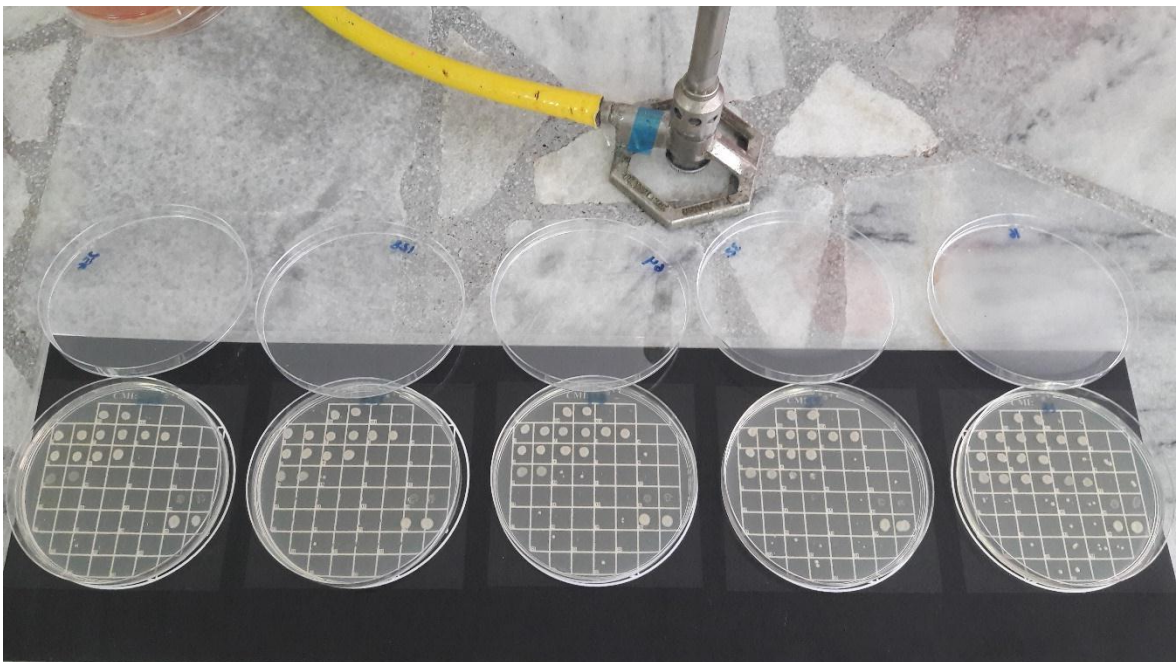


Figura 21. Lectura de resultados dilución en agar (2)

Autor: Mariño, E.

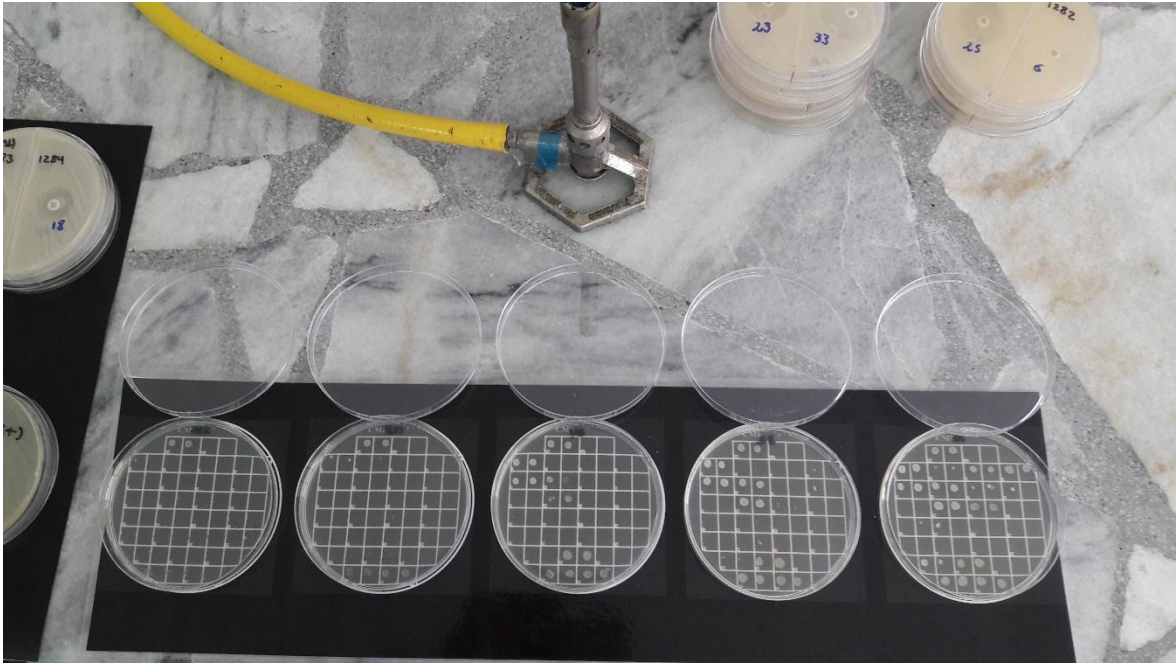


Figura 22. Lectura de resultados dilución en agar (3)

Autor: Mariño, E.

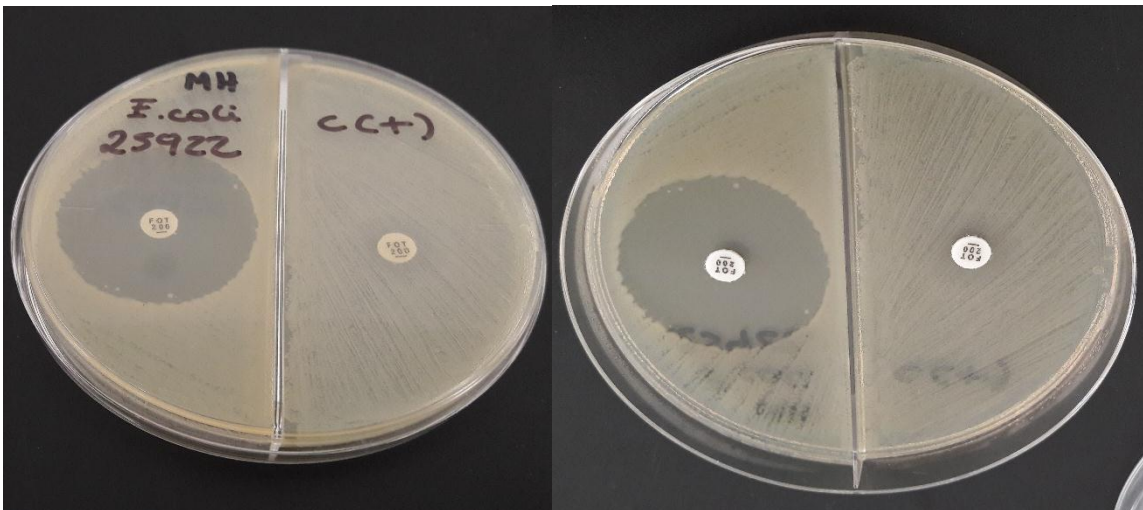


Figura 23. Lectura de halos de inhibición de controles.
Izq: *E. coli* ATCC 25922; Der: *A. baumannii*.

Autor: Mariño, E.

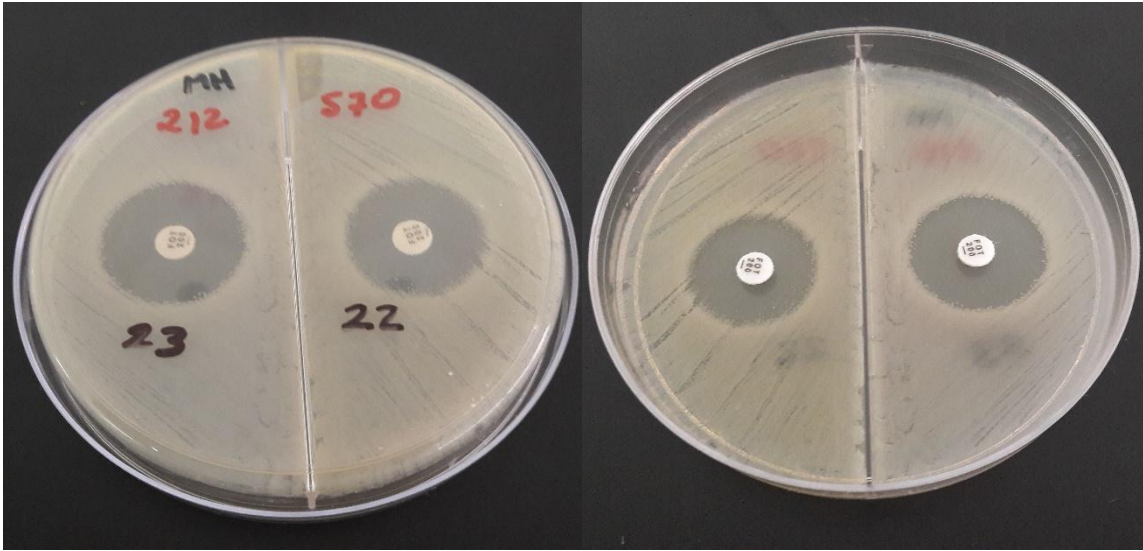


Figura 24. Lectura de halos de inhibición de muestras

Autor: Mariño, E.