



**Análisis de costo-efectividad de una prueba rápida para la detección del efecto inoculo a Cefazolina en *Staphylococcus aureus* Susceptible a Metilina (Rapid - MSSA-CzIE) causante de bacteriemia en Colombia**

Lina Paola Carvajal Ortiz

Universidad El Bosque  
Facultad de Medicina, Doctorado en Salud Pública  
Bogotá D.C, Colombia  
Abril de 2023

**Análisis de costo-efectividad de una prueba rápida para la detección del efecto inoculo a Cefazolina en *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina (Rapid - MSSA-CzIE) causante de bacteriemia en Colombia**

Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de:  
Doctor en Salud Pública

Directoras:  
PhD Jinnethe Reyes  
PhD Alexandra Porras

Grupo de Investigación: Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA)  
Universidad El Bosque

Universidad El Bosque  
Facultad de Medicina, Doctorado en Salud Pública  
Bogotá D.C, Colombia  
Abril de 2023

## Dedicatoria

A Dios quien ha sido el artífice y el constructor de este sueño.  
*“Él es mi fuerza y mi escudo; mi corazón en él confía;  
de él recibo ayuda” (Salmos 28:7)*

*A mi esposo Oscar Gil y mis hijas María Lucia y María José  
son mi motivación, mi apoyo y mi fortaleza.*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por ser el artífice de este sueño, por guiarme, fortalecerme y acompañarme en cada etapa de este proceso. De la misma manera quiero agradecer a mi esposo Oscar Gil por su amor y apoyo incondicional y a mis hijas María Lucía y María José, por su generosidad y con amor darme de su tiempo para culminar esta etapa. A mi mamá Judith Ortiz por sus enseñanzas y sus abrazos llenos de amor y fortaleza que me ayudaron a levantarme una y otra vez, a mi Papá que es ejemplo de disciplina y perseverancia, a mis hermanos, a mis suegros Rita y Hans por cuidar de mis hijas y estar siempre dispuestos a ayudarme.

Al Dr. Cesar Arias por darme la oportunidad de hacer parte de la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana UGRA y estoy inmensamente agradecida con las personas que colaboraron en esta investigación Sandra Rincón, Lorena Díaz, Sara Gómez, Betsy Castro, Aura María Echeverry, Rafael Ríos y Diana Panesso, Gracias infinitas por todo el conocimiento, las experiencias y el apoyo. Quiero agradecer a mis tutoras la Dra. Alexandra Porras por apoyarme en mi formación académica, pero sobre todo dándome la oportunidad de conocerla y aprender el valor de la honestidad y la excelencia. Por otro lado, y de manera especial quiero la Dra. Jinnethe Reyes por creer en mí y darme la oportunidad de formar parte de su grupo, además por ayudarme en este proceso a sacar el potencial que no sabía que tenía, gracias por cada consejo y cada palabra de fortaleza y aliento. Por último, quiero expresar mi más sincero sentimiento de gratitud al Dr. Miguel Otero por toda su confianza, apoyo incondicional en todos los procesos administrativos y académicos que permitieron la financiación de mi formación doctoral.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque, con financiación de la Vicerrectoría de Investigaciones de dicha institución y Minciencias (Contrato 779-2018 Cod 130880764150).

¡Muchas Gracias!

## RESUMEN

La Resistencia Antimicrobiana (RAM) constituye un riesgo y una amenaza a la salud pública mundial, debido a que los tratamientos tradicionales se vuelven ineficaces y la transmisión de infecciones es persistente. Además, el aumento de la gravedad o la duración de las infecciones conllevan a pérdidas de productividad y la reducción de la calidad de vida. *S. aureus*, es una bacteria que hace parte del microbiota normal del ser humano, colonizando entre 20-30% de la población humana de forma asintomática. Sin embargo, este microorganismo también actúa como patógeno causando una amplia gama de infecciones, como infecciones de piel y tejidos blandos, óseas, articulares, en implantes, neumonía, bacteriemia y diversas enfermedades por toxinas, como el síndrome de shock tóxico. Las infecciones por *S. aureus* susceptible a la meticilina (MSSA) representan una carga significativa para el sistema de salud, debido a las altas tasas de mortalidad. En Colombia, la prevalencia de infecciones complicadas causadas por MSSA esta alrededor del 70%. La cefazolina se ha convertido en una terapia importante para las infecciones por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina.(MSSA) debido a su buena tolerabilidad, menores efectos adversos y menor costo a diferencia de la isoxazilpenicilinas. Sin embargo, una preocupación importante para el tratamiento con cefazolina, es el efecto del inóculo de cefazolina (CzIE), un fenómeno aparentemente mediado por las betalactamasas estafilocócicas.

Este efecto del inóculo de cefazolina (CzIE) se ha asociado con fallas terapéuticas y mortalidad en infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA). A pesar que este fenómeno fue descrito hace muchos años, no se conoce claramente su mecanismo, los pocos estudios realizados sugieren que este puede ser multifactorial y adicionalmente no se dispone de una prueba de diagnóstico para detectar el CzIE. La única técnica con la que se detecta el CzIE es por microdilución en caldo con alto inóculo ( $10^7$ UFC/mL) es muy dispendioso, requiere de mucha experiencia para su lectura y adicionalmente el resultado toma 3-4 días. El impacto de esta resistencia no solo afecta a la población con respecto a la salud sino también económicamente. Según el reporte del World Bank Group, para 2050 en un escenario donde la RAM tuviese bajo impacto probablemente el producto interno (PIB) caería en un 1,1% y en el escenario de un alto impacto de la RAM el mundo perderá el 3,8% de PIB anual, con un déficit anual de \$ 3,4 billones de USD para 2030. Esto sin contar que en las evaluaciones económicas de los antimicrobianos y las intervenciones como los diagnósticos, no se contemplan costos indirectos como pérdida de la productividad debido al exceso de morbilidad y mortalidad prematura(111,112).

En este estudio se desarrollaron 3 objetivos con el fin de aportar nuevo conocimiento al mecanismo del CzIE, desarrollar una prueba diagnóstica rápida y posteriormente realizar una estimación de costo efectividad de la prueba rápida al permitir recuperar la cefazolina como antibiótico de primera elección. Primero se caracterizó el efecto inóculo a cefazolina en MSSA causantes de bacteriemias en Colombia y Latino América. Se incluyó una colección de 690 MSSA causantes de bacteriemia, se determinó las CIM de cefazolina mediante microdilución en caldo, en inóculo estándar y alto. Se realizó la secuenciación del genoma completo para clasificar la betalactamasa en cada aislamiento en función de la secuencia completa de BlaZ. Se usaron los esquemas clásicos para la clasificación de betalactamasas y se comparó con los alotipos de BlaZ encontrados en secuencias únicas usando la información genómica. Se realizaron análisis filogenéticos basados en las secuencias de BlaZ y core-genome. La prevalencia global de la CzIE fue del 40%. Entre 641 genomas, BlaZ tipo C fue la betalactamasa más predominante (37 %), seguida Blaz tipo A (33 %). Se encontraron 29 alotipos y 43 sustituciones diferentes en BlaZ. Un solo alotipo, denominado BlaZ-2, mostró una asociación

sólida y estadísticamente significativa con el CzIE. Otros dos alotipos (BlaZ-3 y BlaZ-5) se asociaron con la falta de CzIE. Tres sustituciones de aminoácidos (A9V, E112A y G145E) mostraron una asociación estadísticamente significativa con el CzIE. ( $P = <0,01$ ). CC30 fue el clon predominante entre los aislamientos que muestran CzIE. Este primer estudio proporcionó un enfoque novedoso para la clasificación de las betalactamasas estafilocócicas con el potencial de identificar con mayor precisión las cepas MSSA que tienen CzIE.

Segundo se desarrolló y validó una prueba rápida diagnóstica para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en aislamientos clínicos de MSSA, esta prueba colorimétrica toma alrededor de 3 horas para detectar la actividad de la betalactamasa BlaZ en sobrenadantes después de la inducción de ampicilina. La prueba se validó utilizando 689 aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo recuperados de Latino América y Estados Unidos. Todos los aislamientos se sometieron a secuenciación del genoma. Un total de 257 (37,3 %) de los aislamientos de MSSA presentaron CzIE por el método estándar de referencia. La sensibilidad y especificidad global de la prueba colorimétrica fue de 82,5% y 88,9%, respectivamente. La sensibilidad en los MSSA que tenían BlaZ tipo A (la enzima más eficaz contra la cefazolina) fue del 92,7 % con una especificidad del 87,8 %. El rendimiento de la prueba fue menor frente a las enzimas tipo B y C (sensibilidades del 53,3 % y 72,3 %, respectivamente). Cuando el valor de referencia se fijó en  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ , la sensibilidad para los aislamientos que portaban enzimas tipo A fue del 98,2 %. La especificidad fue del 100 % para MSSA sin BlaZ. El valor predictivo negativo general osciló entre el 81,4 % y el 95,6 % en los países de Latino América utilizando las tasas de prevalencia publicadas del CzIE. Los aislamientos de MSSA de los Estados Unidos fueron genéticamente diversos, sin diferencias genómicas distintivas de los MSSA latinoamericanos. Este segundo estudio desarrolló una prueba novedosa que puede identificar fácilmente la mayoría de los aislamientos de MSSA que tienen CzIE y a diferencia de la determinación de la CIM con inóculo alto, la prueba rápida es económica, factible y fácil de realizar.

Tercero, para el análisis de costo- efectividad, se realizó una revisión integrativa donde se establecieron supuestos ( datos de los temas de interés de la bibliografía, debido a que en la información de los entes oficiales nacionales había subregistro) en temas como prevalencia de bacteriemias por MSSA en pacientes adultos en Colombia, pruebas de detección del efecto inoculo a cefazolina en laboratorio clínico, mortalidad por bacteriemia, sepsis o infecciones de sangre en Colombia, mortalidad por bacteriemia por MSSA en Colombia y efectos adversos de la cefazolina y las isoxazilpenicilinas. Se calculó la letalidad de la bacteriemia por MSSA, posteriormente se realizó el costo de bacteriemia por el ISS 2001 y por el SOAT 2023 tarifados al 30%, 50%, 100% y 200%, en tres escenarios diferentes bacteriemia no complicada, bacteriemia persistente y shock séptico. Y cada uno se evaluó con tratamiento con oxacilina y con cefazolina. Se realizó el cálculo del costo de la prueba rápida y el antibiograma. Posteriormente se calculó la Razón Incremental de Costo Efectividad (RICE) y se modeló un árbol de decisiones el cual contempla los síntomas de la bacteriemia, el uso de la prueba rápida y los desenlaces de realizarla o no.

La letalidad de la bacteriemia por MSSA dio como resultado 30%, lo que quiere decir que de los 87.851 casos de bacteriemias por MSSA, se mueren 26.355 personas, este porcentaje es alto a los que se han reportado en el mundo, para esta infección en Australia por ejemplo se ha reportado una letalidad que oscila entre el 10% y el 30%. El análisis de costos económicos de una hospitalización según el ISS 2001 con tratamiento a oxacilina, en los tres escenarios de bacteriemia podría costar desde 7.344.355 COP hasta 225.726 COP. Mientras que los costos de hospitalización de los tipos de bacteriemia con tratamiento con cefazolina, donde los valores disminuyen de manera importante en comparación con el tratamiento con oxacilina oscila entre 3.444.375 COP hasta 208.176.345 COP. Por otro lado, al analizar los costos de los 3 escenarios de bacteriemias con el Manual del

SOAT 2023, el costo aumenta dramáticamente con respecto al Manual ISS 2001, tanto en tratamiento con oxacilina como cefazolina. Con el manual del SOAT 2023, cualquier bacteriemia tratada con oxacilina 18.440.680 COP 353.845.768 COP, mientras que los costos con tratamiento con cefazolina podrían tener un costo entre 14.540.700 COP hasta 346.045.808 COP. Cabe resaltar que, dentro del análisis tarifario con el manual del SOAT, también se observó una diferencia en el costo de todos los escenarios analizados entre oxacilina y cefazolina, mostrando que el tratamiento con cefazolina tiene un costo mucho menor que el tratamiento con oxacilina.

El valor de la prueba rápida fue de \$156.335 y el antibiograma puede llegar a costar hasta \$120.600 dependiendo el manual tarifario. Cuando se realizó el RICE con un ISS- 2001-30% el valor que se tendría que invertir para la prueba rápida es de COP 137.468.141. Por otro lado, el RICE de los costos de hospitalización de bacteriemia vs la prueba rápida y se encontró al implementar esta nueva tecnología para el sistema de salud dependiendo del tarifario puede tener un ahorro de hasta COP 25.018.702.745 hasta COP 88.103.018.109. Sin embargo, la prueba rápida no solo ahorraría dinero en hospitalización sino en los efectos adversos también tiene un alto impacto en ahorro al recuperar la cefazolina, por ejemplo, en nefrotoxicidad la disminución usando cefazolina sería del 5% y en dinero de COP 107.580.421.803 hasta COP 378.842.977.870. también se analizó falla de tratamiento, mortalidad a los 30 días y enfermedad hepática.

En conclusión, la prueba rápida a cefazolina CzIE es una herramienta diagnóstica valiosa para recuperar la cefazolina para el tratamiento de infecciones de alto inoculo bacteriano y de esta manera disminuir los costos en hospitalización y por consecuencia de los efectos adversos, Además de mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes disminuyendo la posibilidad que tengan una comorbilidad por consecuencia de administración de antibiótico.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, MSSA, Cefazolina, Costo-Efectividad, Colombia

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción .....	15
Planteamiento del problema .....	15
Justificación .....	18
Marco conceptual .....	20
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente y susceptible a meticilina (MRSA-MSSA) .....	20
1.3.2 Tratamiento antibiótico para infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina MSSA.....	21
1.3.3 Estudios comparativos de efectividad de cefazolina en comparación con penicilinas en bacteriemia por MSSA.....	21
1.3.4 Estudio de los mecanismos asociados al efecto inóculo en MSSA.....	22
1.3.5 Estudios de prevalencia de efecto inoculo a cefazolina (czie) en MSSA .....	23
1.3.6 Pruebas rápidas diagnósticas.....	25
1.3.6.1 Estimaciones de exactitud y validez de las pruebas diagnósticas .....	26
1.3.7 Economía en salud .....	26
1.3.8 Tipos de análisis económicos .....	27
1.3.9 Costos económicos por staphylococcus aureus.....	27
2. Objetivos .....	29
2.1 Objetivo general.....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
3. Capítulo I.....	30
3.1 Materiales y métodos.....	31
3.1.1 Aislamientos bacterianos.....	31
3.1.2 Evaluación del efecto del inóculo de cefazolina (czie) por concentración inhibitoria mínima (CIM).....	31
3.1.3 Secuenciación, ensamblaje y análisis filogenético del genoma. ....	31
3.1.4 Definición del alotipo blaZ. ....	32
3.1.5 Asociación de alotipos blaZ y alelos de blaZ con el efecto de alto inóculo a cefazolina (CzIE). .....	32
3.2 Resultados .....	32
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> susceptibles a meticilina mssa causantes de bacteriemia en américa latina exhibieron una alta frecuencia del efecto del inóculo de cefazolina (CzIE). ....	32
3.2.2 Los tipos de betalactamasa blaZ A y C fueron los más predominantes asociados con CzIE en mssa causante de bacteriemia en Latino América. ....	33

3.2.3 Identificación de alotipos de BlaZ y asociación con CzIE.....	34
3.2.4 Tres cambios de aminoácidos en la secuencia de BlaZ se relacionaron con el efecto inoculo CzIE. ....	37
3.2.5 asociación de linaje genético CC30 con los aislamientos de MSSA que exhibieron CzIE.....	37
3.3 Discusión .....	39
3.4 Conclusiones .....	40
4. Capitulo II.....	41
4.1 Materiales y métodos.....	41
4.1.1 Aislamientos bacterianos.....	41
4.1.2 Tipificación de betalactamasa y análisis filogenético .....	42
4.1.3 Determinación del efecto del inóculo de cefazolina.....	42
4.1.4 Prueba colorimétrica rápida para detectar el CzIE. ....	42
4.1.5 Análisis estadístico .....	43
4.2 Resultados.....	43
4.2.1 Desarrollo y validación de la prueba rápida CzIE.....	43
4.2.3 Descripción de la precisión diagnóstica de la prueba rápida czie varía según el tipo de betalactamasa. ....	45
4.2.4 Correlación entre la prueba rápida del CzIE. y las CIM de cefazolina en inóculo alto (CIM-AI). ....	47
4.2.5 Valores predictivos positivos y negativos de la prueba rápida para la detección del CzIE. ....	48
4.2.6 Análisis filogenéticos de MSSA de EE.UU y el CzIE.....	50
4.3 Discusión .....	50
4.4 Conclusiones .....	52
5. Capitulo III.....	54
5.1 Materiales y métodos.....	55
5.1.1 Tipo de estudio .....	55
5.1.2 Revisión integrativa .....	55
5.1.4.2 Número de casos por bacteriemia.....	57
5.1.5 Análisis de costos económicos.....	57
5.1.6 Análisis de costo efectividad.....	58
5.1.6.1 El impacto en costos de la prueba rápida.....	58
5.1.6.2 Análisis de rice de los costos del tratamiento con cefazolina vs isoxazilpenicilinas y la efectividad relacionada con diferentes desenlaces clínicos .....	58
5.1.7 Árbol de decisiones .....	59

5.2 Resultados ..... 59

5.2.1 Letalidad de bacteriemia por *staphylococcus aureus* susceptible a meticilina (MSSA). ..... 59

5.2.2 Análisis de costos económicos ..... 59

5.2.3 Costo de la prueba rápida para efecto inoculo a cefazolina y del antibiograma convencional.  
..... 61

5.2.4 Análisis de costo efectividad..... 62

5.2.4.1 Razón incremental de costo efectividad (RICE) ..... 62

5.2.4.2 RICE eventos adversos de isoxazilpenicilinas vs cefazolina..... 63

5.2.5 Árbol de decisiones ..... 67

5.5 Discusión ..... 67

5.6 Conclusiones ..... 69

6. Conclusiones generales ..... 70

7. Recomendaciones ..... 73

8. Bibliografía ..... 74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> . Alotipos BlaZ en <i>S. aureus</i> sensible a la meticilina (MSSA) de hospitales de Latino América.....	36
<b>Figura 2</b> . Valores de CIM a cefazolina con CzIE en alotipos relevantes de BlaZ.....	37
<b>Figura 3</b> . Árbol filogenético de <i>S. aureus</i> sensible a la meticilina MSSA con alotipos blaZ de hospitales de Latino américa. ....	38
<b>Figura 4</b> Metodología de la prueba rápida CzIE .....	43
<b>Figura 5</b> . Tipos de BlaZ en aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo recuperados de hospitales latinoamericanos y EE.UU.....	46
<b>Figura 6</b> Curva característica operativa del receptor (ROC) y área bajo la curva ROC (AUC) para evaluar el rendimiento diagnóstico de la prueba rápida CzIE.. ....	47
<b>Figura 7</b> Árbol filogenético de máxima verosimilitud del core genoma de aislamientos de MSSA de Latino América y EE. UU. ....	50

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de la frecuencia de MSSA causantes de bacteriemia con Efecto inoculo a Cefazolina (CzIE) en países de Latino América .....	33
<b>Tabla 2.</b> CIM (ug/mL) a inóculo alto e inóculo estándar a Cefazolina según tipo BlaZ en MSSA de Latinoamérica .....	34
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento diagnóstico de la prueba rápida para la detección de la CzIE en MSSA recuperado de hospitales de países de Latinoamérica y EE.UU. ....	44
<b>Tabla 4.</b> Rendimiento Diagnóstico de la prueba rápida estratificado por tipo de Betalactamasa ...	46
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento de la prueba rápida CzIE según tipo de betalactamasa y CIM de inóculo alto .....	48
<b>Tabla 6.</b> Resultados de Valores Predictivos Positivos y Negativos teniendo en cuenta prevalencias reportadas en cada país .....	49
<b>Tabla 7.</b> Estrategia PICO .....	56
<b>Tabla 8.</b> Casos por septicemia CIE-10.....	57
<b>Tabla 9.</b> Letalidad de bacteriemia por MSSA.....	59
<b>Tabla 10.</b> Costos de una bacteriemia según el ISS 2001 con tratamiento con Oxacilina.....	60
<b>Tabla 11.</b> Costos de una bacteriemia según el ISS 2001 con tratamiento con.....	60
<b>Tabla 12.</b> Costos de una bacteriemia según el SOAT en tratamiento con Oxacilina.....	61
<b>Tabla 13.</b> Costos de una bacteriemia según el SOAT en tratamiento con Cefazolina .....	61
<b>Tabla 14.</b> Costos de la Prueba rápida para la detección de CzIE.....	61
<b>Tabla 15.</b> Costos del antibiograma.....	62
<b>Tabla 16.</b> RICE Prueba rápida CzIE vs Antibiograma.....	62
<b>Tabla 17.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs la prueba rápida CzIE .....	63
<b>Tabla 18.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs la prueba rápida CzIE .....	63
<b>Tabla 19.</b> Costos de hospitalización por shock séptico vs la prueba rápida CzIE .....	63
<b>Tabla 20.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Nefrotoxicidad .....	64
<b>Tabla 21.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Nefrotoxicidad.....	64
<b>Tabla 22.</b> Costos de hospitalización por shock séptico vs Nefrotoxicidad .....	64
<b>Tabla 23.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Falla de tratamiento .....	65
<b>Tabla 24.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Falla de tratamiento .....	65
<b>Tabla 25.</b> Costos de hospitalización por shock séptico vs Falla de tratamiento .....	65
<b>Tabla 26.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Enfermedades hepáticas .	65
<b>Tabla 27.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Enfermedades hepáticas .....	66
<b>Tabla 28.</b> Costos de hospitalización por shock séptico vs Enfermedades hepáticas .....	66
<b>Tabla 29.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Mortalidad a los 30 días ...	66
<b>Tabla 30.</b> Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Mortalidad a los 30 días.....	66
<b>Tabla 31.</b> Costos de hospitalización por shock séptico vs Mortalidad a los 30 días.....	67

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIÓN EN EVENTOS

A continuación, se relacionan las publicaciones y trabajos presentados en congresos:

### Publicaciones:

- Rincon S, **Carvajal LP**, Gomez-Villegas SI, Echeverri AM, Rios R, Dinh A, Pedroza C, Ordoñez KM, Nannini E, Sun Z, Fowler VG, Murray BE, Miller WR, Palzkill T, Diaz L, Arias CA, Reyes J. A Test for the Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2021 Mar 19;59(4):e01938-20. doi: 10.1128/JCM.01938-20. Print 2021 Mar 19. PMID: 33536292
- **Carvajal LP**, Rincon S, Echeverri AM, Porras J, Rios R, Ordoñez KM, Seas C, Gomez-Villegas SI, Diaz L, Arias CA, Reyes J. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal  $\beta$ -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Apr 21;64(5):e02511-19. doi: 10.1128/AAC.02511-19. Print 2020 Apr 21. PMID: 32071048
- Miller WR, Seas C, **Carvajal LP**, Diaz L, Echeverri AM, Ferro C, Rios R, Porras P, Luna C, Gotuzzo E, Munita JM, Nannini E, Carcamo C, Reyes J, Arias CA. The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased Mortality in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Open Forum Infect Dis. 2018 May 23;5(6):ofy123. doi: 10.1093/ofid/ofy123. eCollection 2018 Jun 1. PMID: 29977970

### Presentaciones en congresos:

#### Nacionales:

- XIII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y III Encuentro Latinoamericano de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Asociación Colombiana de Infectología ACIN, Agosto 2022 Cali (2 ponencias). i) Ponencia “Validación de la Prueba Rápida para el Efecto Inóculo a Cefazolina en *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina en un Laboratorio Clínico de un Hospital en Colombia. ii) Ponencia “Caracterización genómica y epidemiología del efecto del inóculo de cefazolina (EICz) en *S. aureus*-susceptible-meticilina (MSSA) de infecciones severas en pacientes en Colombia”.
- XXVIII Congreso institucional de Investigaciones de la Universidad El Bosque, Bogotá, Noviembre 2023 modalidad virtual. i) Ponencia “Aplicación de la Inteligencia Artificial Machine Learning en la predicción del efecto inóculo a Cefazolina en SASM”.
- 

#### Internacionales:

- European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases ECCMID, en Amsterdam, Holanda (Europa) Abril 2019. Asistencia presencial. Presentación Poster” Cefazolin high inoculum effect in methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* from bacteraemic patients in Colombia”
- IDweek 2019, (organizado por The Infectious Diseases Society of America (IDSA) evento presencial USA , Washington, DC (USA) Octubre 2019. Presentación Poster

“A New Rapid Test for Detection of The Cefazolin Inoculum Effect (CIE) in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)”.

- IDweek 2020 (organizado por The Infectious Diseases Society of America (IDSA) evento virtual USA , Octubre 2020. Presentación Oral abstract “Regulation of the staphylococcal  $\beta$ -lactamase plays a major role in the cefazolin inoculum effect.
- IDweek 2021 (evento organizado por IDSA, The Infectious Diseases Society of America (IDSA) Sept 2021 San Diego, CA (USA) evento virtual (2 presentaciones): i) Presentación virtual oral poster “Machine-Learning Approach to Predict the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*” ii) Presentación en modalidad oral abstract virtual “Polymorphisms in Key Regulatory Regions of the bla Operon Correlate with the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)”.
- IDweek 2022 (organizado por The Infectious Diseases Society of America (IDSA) Oct. 2023 en Washington D.C (USA). Presentación oral “Validation of a Nitrocefin-based Rapid Test for the Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Pediatric Patients with Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Acute Osteomyelitis”.
- 6th Annual Texas Medical Center Antimicrobial Resistance and Stewardship Conference, Enero, 2023 Houston, Texas, USA. Organizado por Gulf Coast Consortia - Antimicrobial Resistance Consortium. i) Presentación presencial poster “Validation of a Rapid Nitrocefin-Based Test For The Detection of the Cefazolin Inoculum Effect (CzIE) in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in a Colombian Clinical Laboratory” ii) Presentación presencial poster “Regulation of Bla Operon is Associated with the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*” presentado en la modalidad de poster .
- 5th Annual Texas Medical Center Antimicrobial Resistance and Stewardship Conference, Enero 2022 evento virtual Houston, Texas (USA) organizado por Gulf Coast Consortia - Antimicrobial Resistance Consortium. Presentación poster oral “Genomic Characterization and Epidemiology of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-susceptible *S. aureus* from severe infections in patients in hospitals in Colombia”.
- 4th Annual Texas Medical Center Antimicrobial Resistance and Stewardship Conference, Enero , 2021 evento virtual Houston, Texas (USA) organizado por Gulf Coast Consortia - Antimicrobial Resistance Consortium. i) Poster virtual." Diagnostic Performance of Rapid Test for Detection of Cefazolin Inoculum Effect (CzIE) in Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* recovered from bacteremia in Latin-American hospitals” ii) Presentación poster y rapid fire (presentación oral rápida) virtuales “Amino Acid substitutions in key regions of BlaI and BlaR correlate with the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)”. iii) Presentación poster “The Cefazolin Inoculum Effect in *Staphylococcus aureus* bacteremia is associated with poor clinical outcomes: results from a prospective Latin-American bacteremia study”.
- ASM Microbe 2021-World Microbe Forum evento virtual. Poster interactivo “The Cefazolin Inoculum Effect (CzIE) Is Associated with BlaZ Regulation and Not Enzyme Kinetic Differences in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA)”.

## INTRODUCCIÓN

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es “el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible” (1). En consecuencia, la RAM, constituye un riesgo y una amenaza a la salud pública mundial, debido a que los tratamientos tradicionales se vuelven ineficaces y la transmisión de infecciones es persistente. Además, el aumento de la gravedad o la duración de las infecciones conllevan a pérdidas de productividad, y la reducción de la calidad de vida (2). Este problema no solo afecta la salud humana sino también la salud animal, la agricultura, el medio ambiente y la economía (3).

Se estima que para el año 2050, las muertes humanas atribuibles a RAM serán aproximadamente de 10 millones por año, superando las muertes causadas por cáncer, cólera, diabetes, entre otros (4) Además, el aumento de los costos de los tratamientos y la atención de la salud también han impactado la economía global. Se estima que para el año 2050 habrá una reducción entre el 2% y el 3,5% del producto interno bruto (PIB) mundial, lo que costaría al mundo hasta 100 billones de dólares (5) debido a los efectos de la RAM. Es así que la RAM es un problema que ha ido en aumento en hospitales, comunidades y centros de atención en salud en el mundo, y teniendo en cuenta esto, la Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas designó un grupo de seis patógenos bacterianos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacterales*. como el grupo “ESCAPE”, haciendo referencia a este grupo de bacterias contra las cuales se necesitan nuevas opciones terapéuticas debido a que escapan al tratamiento convencional y han desarrollado resistencia a varios antibióticos(6).

Dentro de estos patógenos se encuentra *S. aureus*, bacteria que también hace parte del microbiota normal del ser humano, colonizando entre 20-30% de la población humana de forma asintomática. Sin embargo, este microorganismo también actúa como patógeno causando una amplia gama de infecciones, como infecciones de piel y tejidos blandos, óseas, articulares, en implantes, neumonía, bacteriemia y diversas enfermedades por toxinas, como el síndrome de shock tóxico (5). Además, es la causa de un elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad tanto en niños como adultos que oscila entre el 9.6 y el 36% (7–10) en. También, el *S. aureus* es el principal causante de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) y el más común en infecciones de piel y tejidos blandos que requieren visitas a los servicios de emergencia en los Estados Unidos(11). En Colombia, según el informe de resultados de vigilancia por laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a Atención en Salud (IAAS) reportado en 2019, *S. aureus* fue el cuarto microorganismo causante de infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos UCI y el tercero en infecciones que causan hospitalización (12).

Es importante mencionar que la mayoría de estudios en *S. aureus* se han centrado en el *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) particularmente en su impacto, desenlaces clínicos, y los costos de las infecciones (13,14). Sin embargo, las infecciones por *S. aureus* susceptible a la metilina (MSSA) representan una carga significativa para el sistema de salud, debido a las altas tasas de mortalidad que son de aproximadamente de 27.3% (15). Es así como por ejemplo la prevalencia de la mortalidad asociada con la endocarditis infecciosa por MSSA en los últimos 20 años, ha sido aproximadamente del 23% según la base de datos en el proyecto de Colaboración Internacional sobre Endocarditis (ICE) en Estados Unidos (16). En Colombia, el cambio de la prevalencia de infecciones complicadas causadas por MRSA comparado con MSSA ha sido dramático, es así que en el año 2009, en bacteriemia fue de 45% vs 55%, respectivamente (17), mientras que en el año

2017 fue de 22% vs 78%, respectivamente. (18). Por su parte, en el informe de resultados de vigilancia por el laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a Atención en Salud (IAAS) reportado por el Instituto Nacional de Salud (INAS) en el año 2019, evidenció que el porcentaje de MRSA causante de infecciones en UCI y hospitalización fue de 30% al 40% respectivamente (12), lo que indica que aproximadamente 60 a 70% de estas infecciones son causadas por MSSA, demostrando así que en nuestro país este microorganismo es el mayor causante de infecciones relacionadas.

Respecto al tratamiento, las infecciones por MSSA en primera instancia se tratan preferiblemente con antibióticos como penicilina semisintética o penicilinas anti-estafilocócicas como nafcilina, oxacilina, y dicloxacilina. En pacientes alérgicos a penicilina, la opción son las cefalosporinas de primera generación como cefalexina intravenosa y cefazolina (19). La cefazolina se ha considerado una alternativa terapéutica en infecciones severas por MSSA (20,21). y varios estudios comparativos han sugerido que la cefazolina tiene una eficacia clínica similar a las penicilinas anti-estafilocócicas. En un estudio comparativo realizado en Maryland Medical Center entre 2003-2007 Schweizer y col. evaluaron la eficacia entre nafcilina o cefazolina comparado a vancomicina en pacientes con bacteriemia por MSSA, y encontraron que cuando los pacientes recibían nafcilina o cefazolina tenían menos probabilidad de sufrir enfermedad renal y someterse a hemodiálisis, menos probabilidad de tener catéter intravenoso central, y menores puntuaciones de comorbilidad y severidad en comparación a los pacientes que recibían vancomicina (  $p < 0.05$ ). Además, cuando evaluaron la mortalidad intrahospitalaria a los 30 días, encontraron que en los pacientes que recibieron solo vancomicina la mortalidad fue de 20%, mientras que cuando recibieron únicamente nafcilina o cefazolina fue de 3%. Estos resultados sugirieron que nafcilina y cefazolina presentan una menor tasa de eventos adversos, mayor facilidad de administración, menores costos y lo más importante, disminución de la mortalidad (22–25).

Desafortunadamente, a pesar de que la nafcilina es el tratamiento de primera línea recomendado para infecciones por MSSA, posee desventajas como su dosificación frecuente y alto costo. En consecuencia, su uso conlleva a un menor beneficio tanto en el tratamiento de los pacientes como en la carga económica de los sistemas de salud. En contraste, la cefazolina causa menos efectos adversos como la nefrotoxicidad, además posee un mejor régimen de dosificación (26,27), mejor tolerabilidad (28), y es más económica. Adicionalmente, la cefazolina se usa en la profilaxis quirúrgica en pacientes sometidos a cirugías limpias, incluyendo cardiovasculares y ortopédicas(29–31). Así, estos antecedentes han soportado la selección de cefazolina como agente preferido para la terapia de primera línea en infecciones graves por MSSA. En Colombia, la cefazolina se usa frecuentemente en profilaxis y también como primera línea de terapia para infecciones graves causadas por MSSA (9,10).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, la efectividad terapéutica de cefazolina puede verse afectada debido a la capacidad de algunas cepas de MSSA de producir grandes cantidades de betalactamasas particulares (32,33) en infecciones donde existen altas densidades bacterianas o altos inóculos bacterianos como en bacteriemia, endocarditis, osteomielitis y abscesos profundos (34,35). En estas circunstancias, puede producirse una degradación de la cefazolina, lo que conduce a una disminución de las concentraciones del antibiótico en el sitio de la infección, con el potencial de producir fallas terapéuticas(34–36). De hecho, la degradación de la cefazolina se ha asociado con fallas clínicas en infecciones que cursan con alto inóculo por cepas de *S. aureus* que producen un tipo específico de betalactamasa tipo A (36). Este fenómeno de resistencia se denomina “Efecto Inóculo a Cefazolina (CzIE)” que se ha definido como un aumento significativo en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cefazolina cuando el tamaño del inóculo bacteriano se incrementa a  $10^7$  UFC/mL (en lugar del inóculo estándar de  $10^5$  UFC/mL) en la prueba de susceptibilidad in vitro (35–37). De esta manera, el CzIE se ha asociado a fallas terapéuticas en el tratamiento con cefazolina

en infecciones severas por MSSA, e inclusive se ha evidenciado un incremento en la mortalidad (32,38,39).

En Latinoamérica, este fenómeno se reconoció en 2013 en aislamientos clínicos de MSSA de bacteriemia y osteomielitis recuperados de hospitales de América del Sur (Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú) (40). En este estudio, se encontró que el 36% de los MSSA evaluados presentaron el CzIE. De hecho, 34% de los MSSA provenientes de sangre presentaron el CzIE y notablemente, el 60% de los MSSA de osteomielitis, presentaron este fenotipo en Colombia (40). Estos hallazgos demuestran que en nuestro país también está presente este fenómeno de resistencia en un porcentaje importante y que es posible que contribuya a las fallas de tratamiento. Además, en otro estudio realizado en pacientes de Argentina en 2018, en el que se evaluaron 89 aislamientos de MSSA causantes de bacteriemia provenientes de 77 pacientes, se detectó que el 51% de los MSSA tuvieron CzIE y este fenotipo se asoció con un aumento de la mortalidad a los 30 días (39). Es pertinente anotar que en Argentina, las cefalosporinas se usan como terapia de primera línea y definitiva en el tratamiento de infecciones por MSSA, ya que no están disponibles las penicilinas anti- estafilocócicas (39).

El CzIE ha representado un reto por varios años, debido a que las pruebas de susceptibilidad estándar de laboratorio no lo detectan, ya que estas pruebas se realizan con un inóculo bacteriano de 105 UFC/mL. Además, el mecanismo molecular implicado en el desarrollo del CzIE en *S. aureus* no está elucidado, aunque la Betalactamasa estafilocócica (BlaZ) de los tipos A y C han sido asociados a aislamientos clínicos de MSSA que presentan este fenotipo. Asimismo, dada la carencia de estudios de prevalencia de este fenómeno, no se han postulado el desarrollo de metodologías microbiológicas o moleculares para su diagnóstico rápido.

En cuanto al mecanismo genético del CzIE se han obtenido avances relevantes por medio de la utilización de la secuenciación completa del genoma bacteriano de aislamientos de MSSA que presentan el fenotipo contribuyendo así en el conocimiento de tipos de betalactamasa más asociados (39,40). Sin embargo, no se han elucidado más características o rasgos genéticos de este mecanismo de resistencia y menos aún se han explorado herramientas de diagnóstico rápido o herramientas de tamizaje microbiológico avalado para la detección de MSSA que presenten efecto inóculo a cefazolina en laboratorios de microbiología clínicos hospitalarios. En este aspecto la única forma de detectar el CzIE es mediante la realización de la prueba de susceptibilidad empleando alto inóculo bacteriano, metodología que es dispendiosa, costosa, requiere mucho tiempo su realización, además de experticia, y no se puede realizar de rutina en laboratorios de microbiología clínica. Para empeorar el panorama, a pesar de saber que las fallas en el tratamiento con cefalosporinas ocasionan largas estancias hospitalarias, cambios de tratamientos, reingresos al hospital y falla terapéutica (39–41), no existen estudios en nuestro país que analicen los costos económicos que implica la resistencia a antibióticos en MSSA. Adicionalmente, varios estudios plantean que las infecciones del torrente sanguíneo (que es una de las infecciones más frecuentes causadas por MSSA) es una de las infecciones que más costos económicos demanda al sistema de salud (41,42). Por tal razón, es importante conocer la estimación de los costos de las infecciones causadas por MSSA, pues permitirá un conocimiento más amplio de implicaciones económicas en los organismos de salud y orientará de forma importante a los tomadores de decisiones en el desarrollo y ejecución de medidas para su prevención y control.

Es importante mencionar que la magnitud del problema y el impacto de la RAM a nivel mundial en la salud humana y en los costos del sector de la salud es amplio y todavía en gran parte desconocido (43). MSSA es un microorganismo que representa un problema de Salud Pública y más en países en vía de desarrollo como lo es Colombia, en donde este patógeno es una causa frecuente de infecciones asociadas a la atención en salud y comunitarias (44). Por lo tanto, es de vital importancia

preservar la eficacia de opciones terapéuticas efectivas y económicas como la cefazolina. En este contexto, es importante conocer a nivel genético características asociadas al desarrollo del CzIE y es pertinente el desarrollo de una prueba rápida que permita el diagnóstico temprano del CzIE que como se ha mencionado es un fenómeno de resistencia bacteriana asociado a fallas terapéuticas e incremento en la mortalidad, que no es detectado en el laboratorio clínico. Esto tendrá grandes repercusiones no solo en la selección adecuada y oportuna del tratamiento con antibióticos (cefazolina vs penicilinas antiestafilococcicas) en infecciones invasivas causadas por MSSA, sino también en la formulación de ajustes en la terapia, en la prevención de recaídas de la infección, y en la reducción de costos en los recursos hospitalarios, lo que tendrá un impacto positivo en la esperanza y la calidad de vida de los pacientes. También a raíz de esta prueba se podrán estimar los costos económicos actuales y la efectividad en los pacientes en una hospitalización por bacteriemia y compararlo el impacto tanto económico como de efectividad ante una potencial implementación de esta nueva prueba diagnóstica por medio de un análisis de costo efectividad.

## JUSTIFICACIÓN

La RAM es una realidad que está en aumento en el mundo, amenazando la capacidad de tratamiento de las enfermedades infecciosas que pueden ser mortales. La morbilidad y la mortalidad asociadas con las infecciones severas causadas por *S. aureus* son numerosas y considerables (45). Diversos estudios reportan que la letalidad de infecciones causadas por MRSA es mayor a la observada en MSSA (46,47). No obstante, en un estudio realizado por Seas y Col en 2018, en el que evaluaron el resultado clínico de la bacteriemia por *S. aureus* en hospitales de Latinoamérica, encontraron que la letalidad por MRSA y MSSA fue similar en el análisis multivariado (48). También describieron que los desenlaces y evolución clínica de los pacientes con infecciones por MSSA, fueron iguales o más complicadas que las causadas por MRSA (48).

Por otro lado, el tratamiento antibiótico de primera línea para MSSA son las penicilinas antiestafilocócicas (nafcilina o la oxacilina), pero el costo de estos medicamentos y el programa de dosificación frecuente es poco beneficioso para los pacientes y el sistema de salud. Así la cefazolina ha emergido como una alternativa terapéutica, ya que este antibiótico presenta menos efectos adversos como la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, tiene una mejor dosificación (49), desenlaces clínicos similares a las penicilinas antiestafilocócicas, y además es considerablemente más económica, (25,26,50,51) lo cual es una excelente alternativa para los sistemas de salud.

Para ilustrar esto, en el Hospital General de Massachusetts (HGM) en USA, Youngster y col. en el programa de terapia antimicrobiana parenteral ambulatoria evaluaron una cohorte de pacientes con infección por MSSA 119 que fueron tratados con cefazolina y 366 con nafcilina(28). Así, en una clínica ambulatoria como el HGM que trata aproximadamente 100 pacientes por año empleando cualquiera de los dos antibióticos durante una mediana de 28 días, los investigadores estimaron que los costos del tratamiento de los 100 pacientes con nafcilina incrementan a \$ 475.776 USD, comparado al costo del tratamiento con cefazolina de \$ 73.584 USD, indicando así un ahorro potencial de \$ 402.192 USD. por año Además consideraron que el costo podría ser mucho más alto con nafcilina teniendo en cuenta el reingreso por efectos adversos (52). De forma similar en otro estudio realizado en Henry Ford Meath System en Michigan, USA, por Flynt et al. mostraron que el costo del uso de cefazolina en pacientes con bacteriemia por MSSA que presentaron afectación renal fue menor (\$75 USD), al compararlo con el empleo de nafcilina (\$ 2.271USD). Además, identificaron una probabilidad del 96% de éxito clínico y una estimación costo total de \$ 16,059 USD, cuando se utiliza cefazolina en comparación con el 83% de éxito y \$ 28.195 USD cuando se usa nafcilina (26).

Por otra parte, reconociendo la problemática de la resistencia antimicrobiana en el mundo, sería de gran valor disponer de un antibiótico para el tratamiento de infecciones por MSSA, que sea efectivo y económico. Así, la efectividad terapéutica de cefazolina puede verse afectada en infecciones severas con presencia de una alta concentración bacteriana como endocarditis, bacteriemia u osteomielitis, posiblemente a causa del efecto inóculo a cefazolina (CzIE) (39). El CzIE no es un mecanismo de resistencia observado recientemente, ya que desde el inicio el uso comercial de Cefazolina en USA en 1971 se documentó que algunas cepas clínicas de MSSA productoras de betalactamasa podían hidrolizar fácilmente esta cefalosporina(37,52–54). Posteriormente, se describieron casos de endocarditis por MSSA que fallaron en la terapia con cefazolina (35,52,53), y luego se asociaron con la presencia de CzIE (21). Posteriormente, diversos estudios buscaron dar explicación al mecanismo involucrado en el efecto CzIE observado en cepas de MSSA, mediante la tipificación enzimática beta-lactamasas estafilocócicas (BlaZ) ((32,40,55) Las enzimas BlaZ poseen un sitio activo de serina que hacen parte de la clase molecular de Ambler tipo A (9) y se clasificaron inicialmente en cuatro serotipos diferentes (A, B, C y D), que realmente difieren solo en algunos aminoácidos (56). Además, a partir de estudios de cinética enzimática, se encontró que estas enzimas difieren en sus perfiles hidrolíticos frente a betalactámicos, así BlaZ tipo A pareció ser más eficiente en la hidrólisis de cefazolina, mientras que el sustrato preferido para BlaZ tipo C, fue cefalotina (12). En Colombia las prevalencias estimadas del CzIE en MSSA clínicos correspondieron a 36% en bacteriemia y 50% en Osteomielitis, resaltando la presencia de este fenómeno en hospitales de nuestro país (40).

Adicionalmente se ha sugerido una asociación de este fenotipo con la severidad de infecciones por MSSA. En un estudio que investigó la epidemiología e impacto del CzIE en MSSA de osteomielitis hematógenas en pacientes pediátricos de dos hospitales en USA (Texas Children Hospital y St. Louis Children Hospital) entre 2011- 2018, estudiaron 50 casos de infecciones por MSSA, de los cuales el 14,4% exhibieron efecto inóculo a cefazolina (CIE). El 4% y el 76% de los pacientes recibieron cefalosporinas de primera generación como terapia empírica y definitiva, respectivamente. Los MSSA que presentaron CzIE fueron frecuentemente resistentes a la clindamicina, presentaron *agr* III y se asociaron con el desarrollo de osteomielitis crónica. Además, se observó que los pacientes con cepas presentando CzIE tenían mayor frecuencia de progresión a la osteomielitis crónica que pacientes con MSSA sin el CzIE, independiente del tratamiento ( uso de cefalosporina de 1ra generación o sin el uso de estos antibióticos) (57).

Respecto al tratamiento, a pesar que las isoxazolil penicilinas son los agentes de primera línea recomendados para tratamiento de infecciones por MSSA, una serie de estudios retrospectivos realizados en los últimos años sugieren que la cefazolina tiene una eficacia similar a las isoxazolil penicilinas, presenta menos eventos adversos, mejor dosificación y menor mortalidad (20,38,58–60). Este cambio en el paradigma del tratamiento, sugiere que el desarrollo de CzIE en MSSA puede volverse clínicamente relevante. En un estudio prospectivo, Miller y col. evaluaron específicamente el papel del CzIE en los desenlaces clínicos de pacientes con bacteriemia por MSSA en Argentina, en donde las isoxazolil penicilinas no están disponibles y las infecciones por este microorganismo se tratan principalmente con cefalosporinas. En este estudio, el CzIE se asoció con un aumento de la mortalidad a los 30 días (RR 2,65; IC del 95%: 1,10 a 6,42; p = 0,03) (39). Sorprendentemente, el 54% de los aislamientos recuperados de 77 pacientes incluidos en este estudio exhibieron el CzIE (39).

En cuanto a la detección microbiológica del fenotipo, el CzIE es un mecanismo de resistencia en *S. aureus* que no es posible detectarlo en el escenario clínico, pues no existen pruebas de diagnósticas disponibles para la rutina de un laboratorio de microbiología en un hospital. Las pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo que son empleadas para la detección de CzIE son dispendiosas de realizar y se necesita de experticia para interpretar su resultado, y recursos razón

por la cual no se realizan en los laboratorios clínicos (40). En este panorama, la disponibilidad de una prueba de diagnóstica rápida para detectar el CzIE en aislamientos clínicos de MSSA de pacientes con infecciones severas constituirá una herramienta invaluable en la toma de decisiones terapéuticas oportunas que beneficiarían los desenlaces clínicos del paciente, además, se evitarían las recaídas, así como también, se ahorrarían costos en las entidades hospitalarias.

Por lo expuesto anteriormente, se evidencia que estamos frente a uno de los múltiples casos de resistencia a antibióticos, en un patógeno de gran relevancia en infecciones asociadas al cuidado de la salud, y en consecuencia representa una problemática tanto clínica como de salud pública. Para abordar esta situación es importante buscar alternativas que sean efectivas para el tratamiento del paciente y también razonables en los costos económicos. Los sistemas de salud de todo el mundo han estado considerando planes o proyectos para invertir los limitados recursos disponibles (61). Además, la investigación médica continúa creando nuevas alternativas de tratamiento, pero las limitaciones presupuestarias hacen imposible implementar estos programas en toda la población(62) especialmente en países como el nuestro. En este contexto, para la toma de decisiones relevantes, tanto el sector público como el privado reconocen la importancia de las evaluaciones económicas para asegurar el uso efectivo y adecuado de los recursos disponibles (63), por lo cual se debe tomar decisiones sobre qué procedimientos favorecer, qué tecnologías nuevas adoptar o qué fármacos y recursos elegir para incluir en los planes médicos (64).

Ya que la cefazolina es un antibiótico que se ha convertido en terapia de primera línea en infecciones por MSSA, se debe dirigir esfuerzos para salvaguardar el antibiótico en la práctica clínica. En este contexto, es necesario la realización de este estudio para determinar la prevalencia del CzIE en hospitales Colombianos y los mecanismos de resistencia implicados, así, como el desarrollo de una prueba diagnóstica rápida para su detección lo cual permitirá detectar oportunamente el CzIE en hospitales colombianos, Adicionalmente se realizará un análisis de costo efectividad para evaluar el potencial de una prueba rápida diagnóstica de este mecanismo de resistencia y la posibilidad que sea contemplada su implementación en los laboratorios clínicos de nuestro país. En consecuencia, se espera que los resultados obtenidos aporten conocimiento al impacto en la economía y el aporte a la salud del paciente en cuenta a la optimización del tratamiento para los pacientes, lo cual influiría en menos tiempos de hospitalización, menos reingresos o posible fracaso de tratamiento, incluso en la disminución de la mortalidad.

## **MARCO CONCEPTUAL**

### **1.3.1. *Staphylococcus aureus* Resistente y Susceptible a Meticilina (MRSA-MSSA)**

*Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra como parte del microbiota normal en la nariz, piel, garganta, tracto gastrointestinal y vagina. Sin embargo, este microorganismo también se comporta como patógeno oportunista en humanos y su transmisión puede ocurrir por contacto directo con piel o contacto con objetos contaminados (65). La versatilidad que tiene *S. aureus* como patógeno se debe a la gran variedad de factores de virulencia que posee, muchos de los cuales se encuentran codificados en elementos móviles como plásmidos o fagos y pueden ser transmitidos de una cepa a otra por transferencia horizontal de genes, por transducción o conjugación (66). El éxito de este microorganismo está ligado a la formación de biopelículas, la expresión de proteínas ancladas a membrana, la producción de una gran variedad de péptidos que inhiben el sistema inmune innato y otros factores empleados para evadir la defensa del hospedero (67). Es así, que este microorganismo es uno de los patógenos con mayor relevancia en infecciones hospitalarias y comunitarias, causando una gran variedad de infecciones en humanos, siendo el principal agente causante de bacteriemias, endocarditis, infecciones osteoarticulares, pleuropulmonares, de piel y tejidos blandos, así como también de infecciones asociadas a dispositivos médicos (68). Las

infecciones del torrente sanguíneo (BSI) son una de las complicaciones potencialmente mortales causadas por *S. aureus*, con una incidencia estimada de 80 a 190 casos / 100.000 habitantes por año en los países desarrollados (69,70). En Estados Unidos y Francia, se estima que 600.000 y 125.000 casos de BSIs por *S. aureus* se producen por año, respectivamente (69,70). Además, otra de las infecciones causadas por *S. aureus* que requieren asistencia a los servicios de emergencia, en los Estados Unidos es la infección de tejidos blandos (71).

En cuanto a la resistencia, el *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) es el patógeno que ha planteado importantes desafíos terapéuticos (72). Aunque inicialmente se identificó como un patógeno nosocomial importante, MRSA ahora es endémico en la comunidad (73,74). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que 80,461 infecciones invasivas por MRSA y 11,285 muertes relacionadas ocurrieron en los Estados Unidos en 2011 (75). Por su parte, las infecciones causadas por *S. aureus* susceptible a la metilicina (MSSA) son también de gran relevancia, causando infecciones invasivas con una significativa morbimortalidad, siendo importante resaltar que en la actualidad las infecciones por MSSA sobrepasan las causadas por MRSA (76,77). En Latino América se ha reportado que las prevalencias de MSSA causantes de bacteriemia son altas en países como Argentina, Ecuador y Colombia con una distribución del 60%, 71% y 78%, respectivamente (78). En Colombia, según un informe de resultados de la vigilancia realizada por el laboratorio de referencia de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a Atención en Salud (IAAS) del INS reportado en 2019, donde recolectaron aislamientos de 25 Laboratorios de Salud Pública Departamentales y Distritales (LSDP), se evidenció que el porcentaje de MSSA causante de infecciones en UCI y Hospitalización fue entre el 60- 70% (12).

### **1.3.2 Tratamiento antibiótico para infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* Sensible a metilicina MSSA**

Las opciones terapéuticas en infecciones por *Staphylococcus aureus* susceptible a metilicina (MSSA) son las penicilinas anti-estafilocócicas como nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina o flucloxacilina (51). Sin embargo, la cefazolina que es una cefalosporina de primera generación es alternativa terapéutica para el tratamiento de bacteriemia por MSSA (71). También, es recomendada para el tratamiento de pacientes con endocarditis que presentan hipersensibilidad a la penicilina (alergias no mediadas por IgE) (79). Además, es empleada frecuentemente debido a que posee un mejor esquema de dosificación y mejor tolerancia (22). Cefazolina es utilizada además como agente profiláctico en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos contaminantes. También, es eficaz en pacientes quirúrgicos en los que la infección en el lugar de la intervención constituya un grave riesgo como en cirugías a corazón abierto y artroplastia protésica entre otros(80,81).

### **1.3.3 Estudios comparativos de efectividad de cefazolina en comparación con penicilinas en bacteriemia por MSSA**

Cefazolina presenta ventajas comparada a las penicilinas semisintéticas como lo son: esquemas de dosificación más convenientes, mejor tolerabilidad, menores volúmenes de dilución y bajo contenido en sodio, además de un menor costo(25,50,82). También, cefazolina puede ser administrada en bolo por inyección directa y rápida, mientras que las penicilinas deben suministrarse lentamente en infusiones intravenosas debido al potencial de extravasación (51). Además, se ha descrito que el tratamiento con cefazolina presenta un impacto limitado en la microflora intestinal (83). Por estas razones los clínicos consideran el uso de cefazolina como agente de primera línea en el tratamiento de infecciones severas por *S. aureus*. A pesar que las penicilinas anti- estafilococales (nafcilina y oxacilina) son los antibióticos de primera línea para el tratamiento de infecciones como bacteriemia por MSSA, varios estudios han descrito que el tratamiento con cefazolina está asociado con menor mortalidad en comparación con estas penicilinas. (50,82). Adicionalmente programas de

optimización de antimicrobianos o “antimicrobial stewardship” en entidades clínicas han instaurado el uso de cefazolina como parte de iniciativas para el mejoramiento de costos hospitalarios (58). A continuación, se describen algunos estudios más relevantes que comparan la efectividad del tratamiento de penicilinas anti-estafilocócicas vs cefazolina:

MacDanel y col, en un estudio de cohorte retrospectivo realizado en un periodo de 2003- 2010 en Estados Unidos, incluyeron infecciones de 3.167 pacientes admitidos en 119 centros hospitalarios para veteranos. En este estudio reportaron que el tratamiento con cefazolina fue asociado a un menor riesgo de mortalidad (37% a los 30 días y 23% a los 90 días) en comparación al tratamiento de pacientes que recibieron nafcilina u oxacilina (22). Un resultado similar con respecto a la mortalidad lo reportó Pollet y col en un estudio de cohorte retrospectiva realizado en un hospital de San Francisco USA, que incluyó 100 pacientes con bacteriemia por MSSA, en el que encontraron una reducción de 60% en probabilidad ajustada en la mortalidad a los 90 días en pacientes tratados con cefazolina comparado a aquellos tratados con nafcilina (59). Por otro lado, en Chicago, USA, Rao y col realizaron un estudio retrospectivo en una cohorte de pacientes con bacteriemias causada por MSSA tratados con cefazolina u oxacilina en dos centros hospitalarios en el periodo 2010-2013. En este estudio describieron 161 pacientes y el tratamiento con cefazolina causó resultados similares a oxacilina en términos de curación clínica, duración de la bacteriemia y falla terapéutica. Esto sugirió que cefazolina puede ser una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de bacteriemia profundas causadas por MSSA (84). Adicionalmente, Li y cols., realizaron un estudio retrospectivo en el periodo 2008-2012 incluyendo bacteriemias complicadas por MSSA en dos centros hospitalarios de tercer nivel en Texas, USA, en los que se instauró el tratamiento de elección con cefazolina para infecciones por MSSA desde el año 2003. A partir de una población de 93 pacientes describieron que cefazolina presentó tasas similares de cura clínica al final de la terapia comparado con oxacilina (95% vs 88%,  $p=0.25$ ). Además, la falla terapéutica fue mayor en el grupo tratado con oxacilina que en el grupo tratado con cefazolina (47% vs 24%  $p=0.04$ ). Otro resultado relevante de este estudio fue que la cefazolina fue mejor tolerada y presentó menor tasa de interrupción en el tratamiento (58).

Adicionalmente, en Canadá un estudio retrospectivo multicéntrico realizado por Bai y col, en seis hospitales que incluyó 354 pacientes con bacteriemia tratados con cefazolina en el periodo 2007-2017, no se encontraron diferencias clínicas en términos de mortalidad al comparar el tratamiento de cefazolina vs cloxacilina. Además, encontraron que la cefazolina no fue inferior a la cloxacilina en el tratamiento de bacteriemias por MSSA en este hospital. De esta manera, los autores propusieron el uso de cefazolina en el tratamiento de bacteriemia por MSSA (85). En Asia, en un estudio de cohorte prospectiva observacional realizado en 480 casos de bacteriemia por MSSA en 10 hospitales de Corea del Sur realizado entre 2013-2015, Lee S y cols describieron que la falla terapéutica con cefazolina fue baja en el grupo tratado con nafcilina (30.4%) vs (49.4%) en el grupo tratado con cefazolina ( $p=0.015$ ). En este estudio, se determinó que la presencia de CzIE en MSSA que fue encontrado en 22% de los aislamientos, se asoció con falla terapéutica y hubo incremento en la mortalidad (50).

#### **1.3.4 Estudio de los mecanismos asociados al efecto inóculo en MSSA**

El mecanismo de resistencia mediada por la betalactamasa estafilocócica BlaZ en *Staphylococcus aureus* consiste en la producción de una enzima que inactiva el antibiótico debido a que causa la hidrólisis del anillo beta-lactámico. Además del gen BlaZ, los genes que codifican para blaR y blaI que codifican para la una proteína integral de membrana que participa en la transducción de la señal y para el represor, respectivamente, son importantes en la regulación y producción de la enzima. También, la producción de BlaZ es inducible requiriendo la presencia del antibiótico (27).

Por otra parte, ensayos inmunológicos y de afinidad con sustratos específicos permitieron la descripción de cuatro tipos de BlaZ (A, B, C y D) en *S. aureus*, Estos estudios lograron determinar que algunos tipos de betalactamasas pueden hidrolizar cefalosporinas específicas, es así que BlaZ tipo A hidroliza eficientemente la cefazolina, mientras que BlaZ tipo C parece tener una hidrolisis más eficiente de la cefalotina (81–83). En la actualidad cerca del 90% de aislamientos clínicos de *S. aureus* poseen el gen BlaZ que codifica para la betalactamasa estafilocócica (27).

En cuanto a estudios que han evaluado los tipos de BlaZ en aislamientos clínicos de MSSA que presentaron efecto inóculo a cefazolina, la mayoría indican que BlaZ tipo A parece ser la enzima más prevalente. Además, polimorfismos específicos en las posiciones 226 y 229 del gen que codifica para la betalactamasa tipo A que resultaron en cambios de aminoácidos que fueron significativamente asociados con CzIE fueron descritos en un estudio de realizado en Corea del Sur (84). Adicionalmente, la Betalactamasa tipo C también ha sido descrita frecuentemente en aislamientos con CzIE (32,40).

### **1.3.5 Estudios de prevalencia de Efecto Inoculo a Cefazolina (CzIE) en MSSA**

El CzIE se define como un incremento significativo de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a cefazolina en la prueba de susceptibilidad in vitro cuando se incrementa el inóculo bacteriano a 107UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml), comparado a la CIM observada al emplear el inóculo estándar de 105 UFC/ml (51). En infecciones con alta carga bacteriana la betalactamasa de *S. aureus* hidroliza eficientemente la cefazolina superando su efecto antibacteriano y afectando así su efectividad en el sitio de infección. De esta manera, se ha sugerido que el efecto inóculo podría tener implicaciones clínicas en infecciones por *S. aureus* que cursan con altos inóculos bacterianos como endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, neumonía y grandes abscesos no drenados(35,86). Además, la falla terapéutica a cefazolina se ha descrito en pacientes con endocarditis por *S. aureus* susceptible a metilicina que demostraron CzIE (20,33,48). En uno de estos estudios, en un paciente con endocarditis que presentó falla terapéutica a cefazolina, se recuperó un aislamiento de MSSA denominada como TX0117 productor de una betalactamasa tipo A. Este aislamiento clínico de MSSA demostró CzIE cuando se realizó la prueba de susceptibilidad in vitro por microdilución en caldo empleando diferentes concentraciones de inóculo (87). Posteriormente, esta cepa de *S. aureus* TX0117 ha sido empleada como el control positivo en diversos estudios de CzIE (32,39,71). También, se ha postulado que la presencia de altas concentraciones de *S. aureus* productor de betalactamasa tipo A en vegetaciones pueden hidrolizar la cefazolina, posiblemente conduciendo a una falla terapéutica (35). Además, se ha descrito que cerca del 50% de la betalactamasa puede ser excretada desde las células bacterianas y la concentración de esta enzima dentro de las vegetaciones puede alcanzar proporciones considerables (88).

Respecto a prevalencia de efecto inóculo a cefazolina en MSSA se han realizado pocos estudios, y particularmente en ciertas regiones geográficas incluyendo hospitales de USA, Corea, Japón y Sudamérica. Más recientemente en Canadá (89). Estos estudios han descrito que el CzIE se ha asociado particularmente a los tipos de betalactamasa A y C (24,35,38,40,85,88,90–95). En Estados Unidos, en uno de los primeros estudios de prevalencia realizados, Nannini y col describieron 19% de prevalencia de CzIE en 98 MSSA recolectados de vigilancias multicéntricas en Estados Unidos a partir de infecciones de tejidos blandos, neumonía adquirida en hospital, endocarditis y bacteriemia. El CzIE se asoció principalmente al tipo de betalactamasa tipo A. Adicionalmente, al analizar cepas de MSSA de un grupo de pacientes en hemodiálisis con bacteriemia describieron que el CzIE estuvo asociado a falla terapéutica en el tratamiento con cefazolina (32). En un segundo estudio Livorsi y col, incluyeron 5 hospitales de Emory incluyendo centros hospitalarios pediátricos, comunitarios de veteranos y de tercer nivel en Atlanta. En este estudio, evaluaron 185 MSSA recuperados de bacteriemia en el periodo de un año (2010), donde encontraron una prevalencia de 27% de CzIE y los tipos de betalactamasa A y C fueron los más frecuentes en MSSA con este

fenotipo (95). En un tercer estudio realizado en Chicago, Wang y col, estudiaron 269 aislamientos de MSSA recolectados de diversas fuentes clínicas (heridas, abscesos, esputo, aspirado traqueal, sangre y otros fluidos) de 4 hospitales en el periodo 2014-2015 y la prevalencia de efecto inoculo a cefazolina fue 3% con asociación a betalactamasa tipo A(96). Más recientemente, Tanis y col en su estudio de prevalencia de CzIE en MSSA de Norteamérica, en el que incluyeron 6 laboratorios clínicos de USA y uno de Canadá, encontraron en 305 MSSA una prevalencia de CzIE de 18,6 % (rango 0 -27.9%). También reportaron que los tipos de betalactamasa más frecuentes en los MSSA con el fenotipo fueron tipo C (57%), seguido de tipo A (44%), así como los linajes genéticos más comunes en estos aislamientos correspondieron a el CC8 y CC30 (89).

En Corea del Sur, varios estudios han descrito prevalencias de CzIE en MSSA de entidades hospitalarias de este país. En un primer estudio, Lee et al, realizó un análisis retrospectivo en 113 pacientes con bacteriemia por *S. aureus* de tres hospitales en Seúl, en el periodo de 2004-2009 incluyendo el análisis de variables clínicas. Encontraron una prevalencia de 57.5% de CzIE asociado a betalactamasa tipo C. Este estudio describió que la bacteriemia persistente fue frecuente en el grupo con CzIE comparado con el grupo que no lo presentó (9% vs 0%,  $p=0.04$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la tasa de mortalidad o falla terapéutica a cefazolina (38). Un estudio que incluyó 146 MSSA recolectados de nueve centros hospitalarios de Corea (de segundo y tercer nivel en dos periodos 2004-2009 y 2008- 2013), describieron una prevalencia de CzIE de 11%. La betalactamasa tipo A fue el tipo predominante en los 16 MSSA que presentaron este fenotipo. Además, se encontró que el CzIE se asoció con alteración de la funcionabilidad del gen que codifica para un sistema regulatorio global en *S. aureus* el Agr (encontrado en 53.6%de los aislamientos) y a la presencia de las variantes de agr I y III en 25% y 75% de los aislamientos, respectivamente. Este estudio no encontró asociación entre mortalidad con CzIE, sin embargo, encontraron bacteriemia persistente en muchos de los pacientes a los cuales se les aisló MSSA que presentaron el fenotipo (48).También, en el estudio de cohorte prospectivo reportado por Chong y cols que incluyó 220 aislamientos de MSSA, encontró 13% de prevalencia de CzIE asociado en su mayoría a betalactamasa tipo A (79% de los MSSA con este tipo de BlaZ demostraron el fenotipo) y al linaje genético ST30 (encontrado en 55% de los aislamientos) (94).

Por su parte, en Japón, Saeki y col, estudiaron 52 aislamientos MSSA de pacientes con bacteriemia recuperados del Hospital Universitario de Sapporo durante tres años (enero 2012- diciembre 2014), y encontraron una prevalencia de CzIE de 5.8%, y BlaZ tipo C el más frecuente asociado al fenotipo (94). En Latinoamérica, Rincón y Col. realizaron la primera descripción de prevalencia de CzIE en MSSA recuperados de infecciones invasivas recolectados de vigilancias retrospectivas en hospitales de Suramérica, encontrando una prevalencia global de 36% (40). Por su parte, en Colombia las prevalencias encontradas de CzIE en el periodo 2001- 2002 fueron 45% y 57%, para aislamientos recuperados de bacteriemia y osteomielitis, respectivamente. Mientras que en los MSSA recuperados en el periodo 2006-2008, las prevalencias fueron de 31% y 63%, respectivamente, para aislamientos de sangre y osteomielitis. No obstante, en este estudio retrospectivo no se incluyeron variables clínicas (40).

Posteriormente, en un estudio prospectivo observacional realizado por nuestro grupo en 77 pacientes de hospitales de Argentina tratados por bacteriemia causada por MSSA en el que se incluyeron 89 aislamientos de MSSA, encontramos un alto porcentaje de CzIE de 54.5%. Notablemente, el CzIE fue asociado con incremento de la mortalidad a los 30 días (RR: 2.55, 95% intervalo de confianza CI=1.1-6.42  $P=0.03$ ) (39). También encontramos una heterogeneidad en los linajes genéticos correspondiendo a los complejos clonales CC5, CC8, CC30, indicando así que el CzIE no se asoció a una diseminación clonal específica. Es importante resaltar que, en Argentina, no hay disponibles isoxazolyl penicilinas y las infecciones por *S. aureus* son principalmente tratadas con cefalosporinas(39).

Respecto al mecanismo implicado en el desarrollo del CzIE en MSSA, se ha descrito particularmente en aislamientos que portan betalactamasas (BlaZ) de los tipos A y C. Sin embargo, aún no se ha elucidado el mecanismo genético involucrado en este fenotipo ya que se ha postulado que es multifactorial. Es así que entre los mecanismos que se han postulado se encuentran cambios en residuos de la betalactamasa, incremento en el número de copias del gen BlaZ, alteración en la expresión de BlaZ o genes reguladores (blaI, blaR), y además alteración de la funcionalidad del gen que codifica el gen regulador global de *S. aureus* Agr(92,93,95). En cuanto a las evidencias documentadas de la relación de la betalactamasa estafilocócica con el CzIE, es importante mencionar que un estudio demostró supresión del CzIE al realizar la inactivación del gen BlaZ o al suprimir su funcionalidad empleando inhibidores de la betalactamasa(39,97). También, algunos estudios han demostrado que el CzIE está presente en MSSA pertenecientes a diferentes linajes genéticos, indicando que posiblemente este fenotipo no se asocia a la diseminación de un clon genético de MSSA en particular (32,39,93).

En cuanto a la detección de este fenotipo en los hospitales, no hay una prueba diagnóstica que permita su detección en los laboratorios clínicos. La detección de CzIE se realiza en laboratorios de investigación mediante la determinación de la prueba de susceptibilidad a cefazolina por microdilución en caldo empleando inóculo bacteriano estándar (10<sup>5</sup> UFC/ml) y alto inóculo (10<sup>7</sup> UFC/ml) (32), siendo esta una prueba dispendiosa, que requiere experticia en su interpretación, y recursos, y en consecuencia no es posible realizarla de rutina en los laboratorios clínicos de entidades hospitalarias. En este contexto, el desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas que permitan detectar mayor actividad de betalactamasas específicas asociadas al CzIE y así identificar el fenotipo en aislamientos clínicos de MSSA en laboratorios clínicos en hospitales permitiría la selección adecuada del tratamiento con las penicilinas estafilocócicas o con cefazolina en infecciones severas por MSSA que cursan con altos inóculos bacterianos en un tiempo oportuno(86).

### **1.3.6 Pruebas Rápidas Diagnósticas**

En la actualidad, existe una necesidad insatisfecha de pruebas diagnósticas rápidas en el ámbito hospitalario tanto para identificación de patógenos como de sus mecanismos de resistencia a antimicrobianos de uso clínico, lo que permitiría reducir el uso indiscriminado de antibióticos. De esta manera la aplicación de pruebas rápidas permitiría identificar e iniciar el tratamiento antibiótico adecuado y en consecuencia minimizar el uso innecesario de estos agentes y controlar adecuadamente la diseminación de patógenos resistentes en el escenario clínico. También, la necesidad de la disponibilidad de estas pruebas se realiza por el lento desarrollo de nuevos antibióticos y por la rápida velocidad de la emergencia de mecanismos de resistencia a antibióticos en patógenos, lo que no alcanza a satisfacer la demanda de nuevos agentes para combatir eficazmente la RAM (98).

Sin embargo, recientemente pruebas rápidas que acortan los tiempos de identificación de mecanismos de resistencia a antibióticos en patógenos se han incorporado al flujo de trabajo de laboratorios clínicos en Europa y USA. Estas pruebas se basan en detección de actividad enzimática, crecimiento bacteriano, inmunoensayos, entre otros, así de esta manera, la detección de la presencia o actividad enzimática de proteínas responsables de resistencia antibióticos en patógenos representa una metodología de gran utilidad para la detección fenotípica rápida de la resistencia antimicrobiana. Estas metodologías novedosas para detección de mecanismos de resistencia son pruebas sencillas de realizar y brindan los resultados desde minutos a pocas horas, comparado al tiempo de obtención de resultados de las técnicas de susceptibilidad rutinarias manuales o automatizadas basadas en discos o dilución en caldo que brindan resultados en varios días. Por otra parte, en términos económicos la aplicación de estas pruebas rápidas permitiría la obtención de ahorro substancial global a través de la reducción de días de hospitalización, días de

incapacidad y recuperación de vidas de los pacientes (99). Estas pruebas rápidas para ser implementadas en el escenario clínico deben ser precisas y adecuadamente validadas. En general, los parámetros de rendimiento diagnóstico de cualquier técnica o prueba rápida novedosa que deben evaluarse son la sensibilidad, la especificidad y valores predictivo positivo y negativo.

### **1.3.6.1 Estimaciones de exactitud y validez de las pruebas diagnósticas**

Una prueba diagnóstica se valida mediante la comparación de los resultados frente a un estándar de oro o gold estándar que es la prueba de referencia disponible y ampliamente aceptada para establecer la presencia o ausencia de una condición de forma válida, además de servir como referencia de nuevas pruebas. Además, para estimar el rendimiento o desempeño de una prueba diagnóstica se realiza el cálculo de los índices de:

- Sensibilidad: Es la capacidad de una prueba de detectar una condición, es la proporción de verdaderos positivos, es decir individuos con una enfermedad que tienen un resultado positivo en la prueba.
- Especificidad: Es la capacidad de la prueba de detectar la ausencia de la condición, es la proporción de verdaderos negativos, es decir individuos sanos que tienen un resultado negativo en la prueba.
- Valor predictivo negativo: Es la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo en la prueba se encuentre realmente sano.
- Valor predictivo positivo: Es la probabilidad de padecer la condición o enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba.

La sensibilidad y especificidad son propiedades intrínsecas de una prueba diagnóstica, independientes de la prevalencia de la condición o enfermedad en la población a la cual se aplica. Por su parte los valores predictivos positivos y negativos son dependientes de la prevalencia de la condición.

Curva ROC y Área Bajo la curva: La curva ROC es una representación gráfica para evaluar la capacidad discriminativa de una prueba dicotómica, es una curva de probabilidad y constituye una herramienta estadística para determinar la exactitud diagnóstica de una prueba. Es una representación gráfica que se traza sobre un sistema de coordenadas en que la sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) se localiza en el eje y frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad) ubicados en el eje X. Además, el área bajo esta curva (AUC) representa la precisión global de una prueba, es la habilidad de una prueba de discriminar pacientes con la condición comparado a aquellos sin la condición y es una medida única e independiente de la prevalencia de la enfermedad en estudio. EL AUC con un valor cercano a 1,0 que indica una alta sensibilidad y especificidad (100,101).

### **1.3.7 Economía en Salud**

La economía de la salud como área aplicada, inició en 1963 con Kenneth Arrow premio nobel de economía quien realizó significativas contribuciones en la teoría de economía y política de la salud. Arrow postuló que teniendo en cuenta la incertidumbre de una enfermedad y lo eficaz que pudiese ser un tratamiento esto no garantiza una adecuada asignación de los recursos, a partir de lo cual propuso determinar a partir de la eficacia y del bienestar las posibilidades del mercado y del estado (102). La economía en salud ha tomado importancia en el sector sanitario debido a la importancia que le otorga dicho sector a la a la interrelación de los conceptos de salud y economía, pues no es posible una estabilidad política o de crecimiento económico sin que el bienestar se expanda a toda

sociedad, es decir, que la cobertura en salud y las oportunidades sociales sean iguales para todos (103). Los análisis económicos han logrado integrar las áreas económicas, sociales, de salud, epidemiológicas con la finalidad de estudiar los mecanismos y factores que determinan la producción, distribución, consumo y financiación de los servicios en salud (104). Adicionalmente, han permitido analizar procesos, costos de producción y evaluar en función de costos los resultados que se han obtenido, según el impacto que reflejan no solo en mortalidad y morbilidad sino también en calidad de vida (105).

Los análisis económicos tiene como objetivo mejorar la eficiencia de los procesos de distribución presupuestal entre los distintos niveles de atención en salud (106). Lo que la convierte en una herramienta valiosa para el uso óptimo de los recursos destinados a la atención de enfermedades y la promoción de la salud (107), la gestión sanitaria y la orientación de la toma de decisiones, para encontrar alternativas eficientes dentro del conjunto de actividades de servicios y diferentes tecnologías del sistema nacional de salud (82). Adicionalmente, contribuye en la búsqueda de alternativas de financiamiento de los sistemas de salud, en el análisis de las imperfecciones del mercado de los servicios de salud y en la valoración de las intervenciones (108).

### **1.3.8 Tipos de análisis económicos**

Existen diferentes tipos de análisis económicos siendo los más utilizados en el área de la salud: El análisis de minimización de costos, análisis de costo-beneficio, análisis de costo-efectividad y análisis de costo-utilidad (109). El análisis de costo-efectividad (ACE), se utiliza para realizar comparaciones de distintas alternativas de intervención terapéutica (109). ACE compara el costo y efecto clínico de dos o más intervenciones que pueden potencialmente competir entre sí y determina cuál de ellas es mejor desde dos puntos importantes para el sistema de salud el clínico y el económico (110). Los beneficios del ACE son expresados en porcentaje de curación, éxito del tratamiento en los pacientes o años de vida ganados, por otro lado, evidencia costos directos como tratamiento, equipos, transporte, entre otros (personal médico y el paciente), costos indirectos como pérdida de productividad e intangibles como reacciones adversas y dolor entre otros. Aunque los intangibles son difíciles de medir se consideran consecuencias de la intervención. Este análisis es muy valioso para argumentar la implementación de propuestas o programas novedosos en el sistema de salud (110).

### **1.3.9 Costos económicos por Staphylococcus aureus**

La aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) no solo representa una amenaza para la salud mundial, sino que incurre en altos costos económicos para la sociedad como medicamentos de segunda línea y larga estancia hospitalaria (111). Adicionalmente, en las evaluaciones económicas de los antimicrobianos y las intervenciones como los diagnósticos, los costos de la RAM no contemplan costos indirectos como pérdida de la productividad debido al exceso de morbilidad y mortalidad prematura (111, 112). El tratamiento antimicrobiano eficaz es parte de los "bienes comunes" mundiales, la contención de la RAM es un bien público, por lo tanto, si hay una contención exitosa de la RAM todos los países pueden disfrutar de los beneficios. Por el contrario, si no se controla la RAM todos los países se verán perjudicados (113). La contención de RAM es el bien público mundial que más responsabilidad requiere por parte de las autoridades públicas, porque la victoria sobre la RAM nunca es definitiva, ya que los patógenos evolucionan constantemente y eventualmente desarrollan resistencia a cualquier medicamento que descubramos. Sin embargo, con una administración cuidadosa, el poder de los antimicrobianos para salvar vidas puede ser extendido (113). Pero hasta la fecha, la acción sobre la RAM ha sido peligrosamente inadecuada, generando problemas económicos graves. Según el reporte del Word

Bank Group en el caso más optimista de impactos bajos de RAM, las simulaciones económicas encontraron que para 2050 probablemente el producto interno (PIB) caería en un 1,1% y en el escenario de un alto impacto de la RAM el mundo perderá el 3,8% de PIB anual para 2050, con un déficit anual de \$ 3,4 billones de USD para 2030 (4,113).. Por esta razón, es importante conocer los costos reales que provoca una infección por patógenos de gran relevancia como lo es *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* es un patógeno que es un problema de salud pública. Mientras que MRSA ha representado un problema en el escenario clínico, no solo por su virulencia sino por su multiresistencia a los antibióticos y el impacto económico que representa para el sistema de salud es alarmante, así, por ejemplo, infecciones por MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA) genera un costo entre 7.070 y 20.489 USD a los pacientes dependiendo de su grupo etario (89). En Estados Unidos, las infecciones por CA-MRSA imponen una carga anual de 1.4 billones a 13.8 billones de USD a la sociedad (114). Es por esta razón que diversos estudios se han enfocado en los estudios económicos de este patógeno (13,114,115). En Colombia, estudios de costos por *S. aureus* son escasos o no disponibles, lo que resalta la importancia de realizarlos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Determinar el costo-efectividad de la prueba rápida para detectar el efecto inoculo a Cefazolina de *Staphylococcus aureus* Susceptibles a Meticilina (MSSA) causante de bacteriemia en Colombia.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar el efecto inoculo a cefazolina en *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina MSSA causantes de bacteriemias en Colombia y América Latina.
- Desarrollar y validar una prueba rápida diagnóstica para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina MSSA.
- Realizar una estimación de costo-efectividad de la prueba rápida diagnóstica para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en MSSA clínicos.

### 3. CAPITULO I

#### **Caracterización del efecto inoculo a cefazolina en *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina (MSSA) causantes de bacteriemias en Colombia y América Latina**

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos responsables de una amplia variedad de infecciones en todo el mundo, incluidas infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, neumonía y osteomielitis, entre otras (68,116). Las infecciones graves causadas por estos patógenos se han asociado con resultados clínicos desfavorables y altas tasas de morbi-mortalidad (47). En la actualidad se reportan con más frecuencia las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA) que las causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en los centros de atención médica de los Estados Unidos (7,77,117). Además, en algunos países latinoamericanos, la prevalencia de MRSA ha disminuido considerablemente y las infecciones invasivas (ejemplo del torrente sanguíneo) causadas por MSSA parecen más comunes (18).

La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) recomienda los antibióticos betalactámicos como la piedra angular de la terapia para las infecciones causadas por MSSA (51,81). La cefazolina, una cefalosporina de primera generación, que se ha convertido en una opción de primera línea para estas infecciones, debido a que datos recientes sugieren una eficacia similar en comparación con las penicilinas antiestafilocócicas, pero con mayores beneficios como una mejor tolerabilidad, facilidad de administración y un mejor perfil de toxicidad (58,82,97). La cefazolina (en lugar de la oxacilina o sus derivados) se usa con frecuencia en América Latina como la 'terapia de elección' para el tratamiento de infecciones graves por MSSA, ya que las isoxazolil-penicilinas no están disponibles comercialmente en ciertos países (por ejemplo Argentina), así como también se considera que los derivados genéricos pueden ser clínicamente inferior al compuesto innovador (33) o también debido a un esquema de dosificación más favorable ya que la disponibilidad de sistemas ambulatorios eficientes para la administración intravenosa es limitada en algunos países de América Latina.

A medida que la cefazolina ha emergido como la terapia de primera línea para las infecciones graves por MSSA, han surgido preocupaciones sobre el impacto del efecto inóculo a cefazolina (CzIE) el cual podría limitar la eficacia terapéutica de la cefazolina en infecciones profundas por MSSA. El CzIE se define como un marcado aumento de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) a cefazolina cuando se utiliza un inóculo bacteriano alto ( $10^7$  UFC/mL), en comparación al inoculo estándar ( $10^5$  UFC/mL) (40,118). Este fenotipo se correlaciona con la presencia de tipos particulares de betalactamasas, aunque se desconoce su mecanismo (85). Este CzIE se ha asociado con fallas terapéuticas en pacientes con infecciones graves e invasivas por MSSA (24,35). En un estudio prospectivo de infecciones del torrente sanguíneo causado por MSSA, realizado en Argentina (un país donde las penicilinas antiestafilocócicas no están disponibles), la presencia de CzIE fue común en aproximadamente el 50% de los aislamientos, y se correlacionó con una mayor mortalidad en pacientes a los 30 días (39). De manera similar en un estudio de Corea del Sur, pacientes con bacteriemia por MSSA que presentaban el CzIE tuvieron mayor probabilidad de morir a los 30 días en comparación con los pacientes que carecían del CzIE (50).

En este estudio, se buscó caracterizar la frecuencia del efecto inoculo a Cefazolina (CzIE) en aislamientos de MSSA causantes de bacteriemia de diferentes hospitales en nueve países de América Latina, incluido Colombia. Para esto realizó la determinación del CIM a alto inoculo

bacteriano, así como la caracterización molecular de los aislamientos de MSSA y la tipificación de las enzimas betalactamasas. Además, utilizando un enfoque genómico, se buscó reevaluar la clasificación de las betalactamasas estafilocócicas en función de su impacto en el CzIE.

### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 Aislamientos bacterianos.**

Se incluyeron 641 aislamientos de MSSA de un estudio multicéntrico prospectivo de bacteriemia por *S. aureus* realizado en nueve países de Latino América (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú y Venezuela) entre 2010 y 2014 (18). También se incluyeron 49 aislamientos del torrente sanguíneo recolectados en un hospital de la ciudad de Pereira (centro de Colombia) entre 2018 y 2019. La identificación de especie *S. aureus* y la ausencia del gen *mecA* de todos los aislamientos se confirmó mediante ensayos de PCR multiplex (18).

#### **3.1.2 Evaluación del efecto del inóculo de cefazolina (CzIE) por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).**

Las CIM a cefazolina se determinaron con inóculos bacterianos estándar ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) y alto inóculo ( $5 \times 10^7$  UFC/mL) mediante el método de microdilución en caldo, como se ha descrito en estudios anteriores (35,40). La concentración máxima de antibiótico probada para cefazolina fue de 128 µg/ml. El CzIE se definió como un aumento en la CIM  $\geq 16$  µg/mL en el alto inóculo bacteriano. Todas las CIM se realizaron por triplicado, y tres investigadores independientes realizaron la interpretación de los resultados a las 24 horas. Se incluyeron 3 controles: 1) MSSA TX0117, productor de alto nivel de betalactamasa BlaZ tipo A, que exhibe CzIE ,2) MSSA ATCC 29213, productor de pequeñas cantidades de betalactamasa BlaZ tipo A, que no exhibe CzIE y 3. MSSA ATCC 25923, una cepa negativa para BlaZ que no presenta CzIE (35,40). Se calcularon la media geométrica (MG) de las CIM y se realizaron comparaciones por medio estadística no paramétrica mediante la prueba U de Mann-Whitney usando GraphPad Prism versión 8.2.0. Los valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### **3.1.3 Secuenciación, ensamblaje y análisis filogenético del genoma.**

El DNA genómico se obtuvo a partir de cultivos bacterianos de MSSA tratados con lisostafina a 37 °C durante 30 min, utilizando el kit de sangre y tejido DNAeasy (Qiagen). Las bibliotecas de DNA se prepararon con el kit de preparación de muestras de DNA NexteraXT y se secuenciaron en la plataforma Illumina HiSeq o MiSeq con lecturas de extremos emparejados de 150 pb o 300 pb, respectivamente. Las lecturas sin procesar se recortaron con Trimmomatic (119) especificando los adaptadores NexteraXT y los parámetros predeterminados para la plataforma Illumina. Los ensamblajes del genoma se realizaron con SPAdes v3.13 (120) y se anotaron con RAST (121). Se descartaron ensamblajes de genoma de baja calidad ( $n = 13$ ) por contaminación o baja cobertura. El análisis filogenético de los ensamblajes del genoma se realizó utilizando el core genome (genes ortólogos presentes en al menos el 95% de los genomas), obtenido con Roary (122). Los ortogrupos se alinearon individualmente con MUSCLE (123) y luego se concatenaron para obtener una matriz. El árbol se construyó usando RAXML(124) con un modelo de heterogeneidad GTR+ $\Gamma$ . Los árboles filogenéticos se trazaron usando iTOL (125). Para la identificación de linajes genéticos, el tipo de secuencia (ST) y el complejo clonal (CC) se asignaron en función de la base de datos MLST de *S. aureus* (<https://pubmlst.org/>).

### 3.1.4 Definición del alotipo BlaZ.

A partir de los genomas ensamblados, se extrajo la secuencia del operón BlaZ con BLASTN (122) y se realizaron búsquedas contra la secuencia de referencia del operón BlaZ de la cepa ATCC 29213 (No de acceso del NCBI LHUS02000010 complemento [4218 a 7297]). Los aislamientos con secuencias incompletas o secuencia faltante del operón BlaZ se evaluaron mediante el mapeo de las lecturas de secuenciación con la secuencia de referencia y la obtención de un consenso utilizando CLC Genomics Workbench v8.5. Se excluyeron 49 genomas y la muestra final utilizada en el análisis incluyó solo aislamientos con una secuencia BlaZ completa (n = 517). La tipificación inicial de BlaZ se realizó en función de los aminoácidos en las posiciones 128 y 216 (119 y 207 de la secuencia de la proteína BlaZ según nuestra numeración que incluyó el péptido señal (Fig. 1), para asignar los tipos de BlaZ en tipos A, B, C y D (123). Si uno de estos residuos no estuvo presente, se definía como no tipificable. Luego, se definió un alotipo BlaZ como cada secuencia única de aminoácidos encontrada entre los genomas evaluados. Se asignó un número de alelo (designado BlaZ-0) al primer alotipo utilizando la secuencia de aminoácidos de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 (n.º de acceso ODV53133.1). Posteriormente, a los cambios en la secuencia se les asignaron nuevos números comenzando con los alotipos más frecuentes entre los genomas muestreados. Luego, se construyó un árbol filogenético de BlaZ para identificar grupos entre los alotipos, y se realizó sobre una alineación de secuencias múltiples de los alotipos con MUSCLE (123). El árbol se generó con RAxML (120) utilizando la secuencia de proteínas de BlaZ y la determinación automática de la matriz de sustitución con un modelo de heterogeneidad.

### 3.1.5 Asociación de alotipos BlaZ y alelos de BlaZ con el efecto de alto inóculo a cefazolina (CzIE).

Se obtuvo la frecuencia de los MSSA que exhibían y carecían de CzIE para cada alotipo BlaZ y cada alelo BlaZ. Se realizó una alineación de secuencia múltiples con MUSCLE (123). Para cada sustitución de aminoácidos entre los alotipos y para cada cambio de nucleótidos entre los alelos, se obtuvo la frecuencia de los aislamientos que albergaban la sustitución y presentaban o carecían del CzIE. Se realizó una prueba Z para evaluar las diferencias en la proporción de cada sustitución de aminoácido o cambio de nucleótido, con una significancia estadística de  $P = \leq 0.01$ . La prueba se realizó utilizando el módulo de Python Stats models versión 0.8.0 (124).

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 *Staphylococcus aureus* Susceptibles a Meticilina MSSA causantes de bacteriemia en América Latina exhibieron una alta frecuencia del efecto del inóculo de cefazolina (CzIE).

La prevalencia del efecto del inóculo a cefazolina (CzIE) en los MSSA de Latino América, se realizó con 690 cepas de MSSA causantes de bacteriemia. El total de los aislamientos de MSSA fueron susceptibles a cefazolina en el inóculo estándar (CIM90: 1 µg/ml). Sin embargo, cuando se determinó la CIM a cefazolina utilizando un alto inóculo bacteriano, el 40% (n=278) de los MSSA presentaron CzIE con una CIM90  $\geq 128$  µg/ml ( $P = < 0,0001$ ). Brasil y Chile fueron los países con la frecuencia más baja de CzIE, con el 32%, mientras que Argentina, Colombia, Ecuador, Guatemala y Venezuela mostraron una frecuencia  $\geq 40\%$  (Tabla 1).

**Tabla 1. Distribución de la frecuencia de MSSA causantes de bacteriemia con Efecto inoculo a Cefazolina (CzIE) en países de Latino América**

País	No de aislamientos de MSSA	Frecuencia de CzIE	
		No de aislamientos (%) con CzIE	No de aislamientos (%) sin CzIE
Argentina	89 <sup>1</sup>	48 (54)	41 (46)
Colombia	196	78 (40)	118 (60)
Ecuador	72	30 (42)	42 (58)
Chile	88	28 (32)	60 (68)
Perú	69	26 (38)	43 (62)
Brasil	77	25 (32)	52 (68)
Guatemala	63	28 (44)	35 (56)
México	11	4 (36)	7 (64)
Venezuela	25	11 (44)	14 (56)
Total	690	278 (40)	412 (60)

<sup>1</sup>reportado previamente por Miller et al. (20)

### 3.2.2 Los tipos de Betalactamasa BlaZ A y C fueron los más predominantes asociados con CzIE en MSSA causante de bacteriemia en Latino América.

A los 690 MSSA se les realizó secuenciación de genoma completo y posteriormente, se realizó la clasificación inicial de las Betalactamasas utilizando la definición más utilizada la cual emplea el análisis de los residuos de aminoácidos en las posiciones 128 y 216 de la secuencia de la proteína BlaZ (126,127). 173 (19%) MSSA fueron excluidos del estudio por las siguientes razones: 49 MSSA no tenían BlaZ completo, albergaban un codón de parada prematuro en BlaZ produciendo una proteína no funcional o mostraban lecturas heterogéneas que sugerían una población diversa, 2 aislamientos se identificaron como especie *S. argenteus* y 122 MSSA no portaban el gen *blaZ*. Los 517 MSSA que corresponden al 81% del total de MSSA, presentaron la proteína BlaZ completa. El BlaZ tipo C fue la betalactamasa más predominante (37%), seguida de los tipos A y B con el 33% y 29%, respectivamente. Es de destacar que BlaZ tipo D fue la enzima menos frecuente, identificada solo en 5 MSSA.

La Tabla 2 muestra la correlación entre el tipo de betalactamasa y la presencia de CzIE en los 517 MSSA. Todos los aislamientos fueron susceptibles a cefazolina con el inóculo estándar (con CIM de  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ). De los 517 aislamientos 172 MSSA albergaban BlaZ tipo A y de estos el 78% es decir 134 MSSA presentaron CzIE. BlaZ tipo D a pesar de ser la betalactamasa en menos frecuente el 80% de los MSSA que portaban este tipo presentaron CzIE (Tabla 2). El tipo B se identificó en 149 MSSA y tuvo poca correlación con el CzIE, solo presente en el 10 % de los aislamientos (15/149) (Tabla 2). El tipo C se encontró en 190 MSSA y el CzIE se identificó en aproximadamente el 50 % de MSSA (Tabla 2). Se encontró un valor más alto y estadísticamente significativo en la media geométrica de la CIM de cefazolina (CIM-GM) en aislamientos que tenían BlaZ tipo A frente a aislamientos con BlaZ tipo C (CIM -GM de 56,82  $\mu\text{g/ml}$  frente a 34,06  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente;  $P=0,0002$ ). Además, los 15 aislamientos que albergaban BlaZ tipo B y exhibían CzIE presentaron CIM a cefazolina más altas (CIM-GM de 73,52  $\mu\text{g/ml}$ ) en comparación con los tipos A y C. (Tabla 2).

**Tabla 2. CIM (ug/mL) a inóculo alto e inóculo estándar a Cefazolina según tipo BlaZ en MSSA de Latinoamérica**

Tipo de BlaZ (No de aislamientos)	Parámetro	Presencia de CzIE			Ausencia de CzIE		
		No Aislamientos (%)	SI	AI	No aislamientos (%)	SI	AI
Tipo A (n=172)	GM CIM	134 (78%)	0.85	56.82 <sup>a</sup>	38 (22%)	0.72	4.51
	Rango		0.25-2	16-≥128		0.5-2	0.5-8
	CIM <sub>90</sub>		1	≥128		1	8
	CIM <sub>50</sub>		1	64		0.5	4
Tipo B (n=149)	GM CIM	15 (10%)	1.04	73, 52a	134 (90%)	0.76	1.36
	Rango		0.5-8	16-≥128		0.25-4	0.25-8
	CIM <sub>90</sub>		2	≥128		1	4
	CIM <sub>50</sub>		1	≥128		1	1
Tipo C (n=190)	GM CIM	100 (53%)	0.91	34.06 <sup>a</sup>	90 (47%)	0.73	3.61
	Rango		0.5-4	16-≥128		0.25-2	0.5-8
	CIM <sub>90</sub>		2	≥128		1	8
	CIM <sub>50</sub>		1	32		1	4
Tipo D (n=5)	GM CIM	4 (80%)	0.70	32 <sup>b</sup>	1 (20%)	1	4
	Rango		0.5-1	16-≥128		-	-
	CIM <sub>90</sub>		1	≥128		-	-
	CIM <sub>50</sub>		0.5	16		-	-
No tipificable (n=1)	CIM	-	-	-	1	1	2

GM CIM, media geométrica de la CIM a cefazolina; SI, Inoculo estándar 10<sup>5</sup> UFC/mL; AI, Alto inoculo 10<sup>7</sup> UFC/mL; <sup>a</sup>P = <0.0001 por prueba Mann Whitney U; <sup>b</sup>P = 0.0286 por prueba Mann Whitney U.

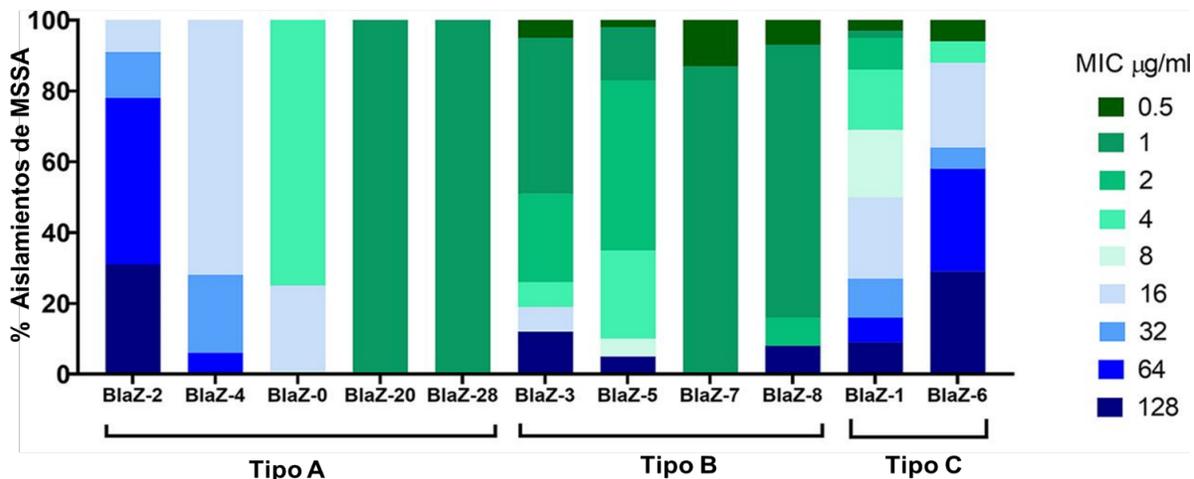
### 3.2.3 Identificación de alotipos de BlaZ y asociación con CzIE.

Se identificaron 29 alotipos y por medio del árbol filogenético de máxima similitud se clasificaron en dos grupos principales (Figura 1). El primer grupo albergaba 19 alotipos distribuidos de la siguiente manera: 11 alotipos pertenecían al tipo de BlaZ A, 6 alotipos se correlacionaron con el BlaZ tipo C, 1 alotipo se correlacionó con BlaZ tipo B y 1 alotipo con BlaZ tipo D y El segundo grupo presento 10 alotipos de los cuales 8 alotipos pertenecían al tipo B (Figura1).

Entre los alotipos identificados, se encontraron 43 sustituciones diferentes en la secuencia de aminoácidos de BlaZ, entre los MSSA que presentaban CzIE vs los aislamientos que carecían de CzIE (Figura 1). Los alotipos más frecuentes fueron BlaZ-1 (n=163) y BlaZ-2 (n = 100). Los MSSA con alotipo BlaZ-1 presentaban BlaZ tipo C y los MSSA con alotipo BlaZ-2 exhibieron BlaZ tipo A. Estos alotipos mostraron aproximadamente un 50 % y un 96 % de correlación con el CzIE, respectivamente. De hecho, BlaZ-2 mostró una alta y clara asociación con CzIE. Por otro lado, los alotipos BlaZ-3 y BlaZ-5 (ambos BlaZ tipo B, pero no relacionados filogenéticamente) se asociaron

altamente con la ausencia de CzIE. Adicionalmente, se realizó la asociación de estos alotipos con la CIM a cefazolina en alto inculo y se evidencio que los aislamientos con CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g}/\text{MI}$  presentaban los alotipos BlaZ-1 y BlaZ-2 en un 31 % y 75 %, respectivamente (Figura 2).





**Figura 2. Valores de CIM a cefazolina con CzIE en alotipos relevantes de BlaZ**

Distribución de los valores de CIM de cefazolina con inóculo alto en alotipos relevantes de BlaZ de los tipos A, B y C. Los colores azules representan valores de CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  usando un inóculo bacteriano alto (el tono más oscuro del color azul muestra un valor de CIM más alto). Los tonos de verde representan CIM susceptibles ( $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), los tonos más oscuros representan valores de CIM inferiores).

### 3.2.4 Tres cambios de aminoácidos en la secuencia de BlaZ se relacionaron con el efecto inóculo CzIE.

Se realizó la alineación de las 517 secuencias de BlaZ, para poder encontrar algún cambio de aminoácidos en estas secuencias, se incluyeron las secuencias de dos cepas de MSSA bien caracterizadas que tienen betalactamasa tipo A: la ATCC 29213 que no tiene efecto inóculo y la cepa TX0117 que presenta CzIE, estas cepas en las pruebas microbiológicas de susceptibilidad son usadas como los controles negativo y positivo respectivamente para CzIE (113).

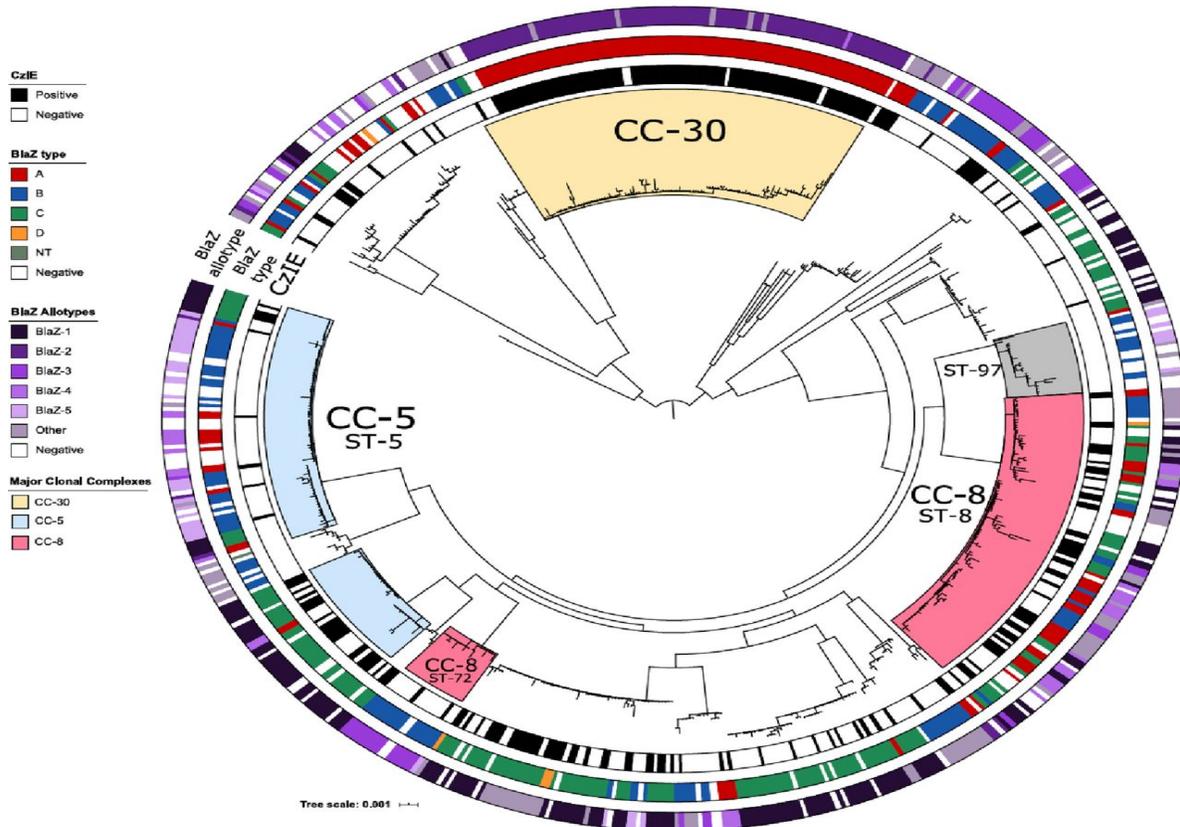
Los resultados de la alineación identificaron tres sustituciones de aminoácidos A9V, E112A y G145E que tuvieron una asociación estadísticamente significativa con el CzIE ( $P = <0,01$ ) (Figura 1). El primer cambio fue una alanina en la posición 9 por una valina (A9V) este cambio estuvo ubicado en el péptido señal y presente en 216 genomas de MSSA que exhibían CzIE, en comparación con 131 genomas que carecían del fenotipo. El segundo cambio fue un ácido glutámico en la posición 12 por una alanina (E112A) se detectó en 115 genomas MSSA que presentaban CzIE, en comparación con solo 5 genomas sin CzIE. Finalmente, la tercera sustitución una glicina en la posición 145 por un ácido glutámico (G145E) se identificó en 237 aislamientos de MSSA con CzIE frente a 125 que carecían de este fenotipo. Es de destacar que la presencia de un residuo de lisina (L) en la posición 119 de BlaZ se correlacionó de forma negativa con el CzIE, con 135 aislamientos que carecían de CzIE en comparación con 15 aislamientos que presentaban CzIE (Figura 1).

### 3.2.5 Asociación de linaje genético CC30 con los aislamientos de MSSA que exhibieron CzIE.

Se encontraron diversos linajes genéticos entre 641 aislamientos de MSSA analizados. Se identificaron 8 complejos clonales (CC1, CC5, CC8, CC15, CC22, CC30, CC45 y CC97) representando el 79% de los genomas (Figura 3). El CC8 se exhibió en 110 (17%) MSSA,

CC5 estuvo en 103 (16%) de las cepas, el CC30 lo presentaron 97(15%) MSSA y el CC1: 92 (14 %) MSSA, estos fueron los linajes genéticos más comunes sin una agrupación geográfica específica.

Analizando los aislamientos MSSA que exhibieron el CzIE que fueron 253 los complejos clonales se agruparon en siete grupos: el CC1 (n = 34), el CC5 (n = 28), el CC8 (n = 44), el CC15 (n = 8), el CC22 (n = 1), el CC30 (n = 89), y el CC45 (n = 9). Notablemente, el CC30 fue el clon predominante entre los MSSA que presentaron el CzIE, con 35 % de 253 aislamientos pertenecientes a la secuencia tipo 30 (ST30). Además, BlaZ-2 (el alotipo altamente asociado con el CzIE) fue el alotipo más frecuente entre los aislamientos del linaje CC30 que presentaban el CzIE (94% de los aislamientos; 84 de 89) (Figura 2 y Figura 3). Mientras que los MSSA que carecían del CzIE se agruparon en seis linajes genéticos (complejos clonales CC), el CC1 (n = 58), el CC5 (n = 75), el CC8 (n = 66), el CC15 (n = 29), el CC45 (n = 28) y el CC97 (n = 23). Es de destacar que el CC 97 se encontró exclusivamente en aislamientos que carecían de CzIE (Figura 2 y Figura 3) con 52 % (12 de 23) aislamientos que carecía del gen BlaZ (83 % de los aislamientos CC97 se agruparon en el ST97).



**Figura 3. Árbol filogenético de *S. aureus* sensible a la meticilina MSSA con alotipos blaZ de hospitales de Latinoamérica.**

Árbol filogenético de máxima verosimilitud con raíces medias del genoma central de 641 aislamientos de MSSA. Las sombras amarillas, rojas y azules sobre las ramas del árbol muestran los complejos clonales (CC) más frecuentes y la sombra gris muestra el CC97 dentro de la muestra. El anillo interior muestra los aislamientos con y sin el CzIE. El anillo

central muestra la caracterización típica de BlaZ. El anillo exterior muestra los alotipos de BlaZ para cada aislamiento.

### 3.3 DISCUSIÓN

Este estudio se reporta que existe una alta prevalencia del 40% de CzIE en MSSA de Latino América. Es de destacar que la frecuencia más alta se registró en Argentina con un 54% (38), un país donde las cefalosporinas se usan como terapia de primera línea para las infecciones por MSSA y las isoxazolilpenicilinas no están disponibles (39). Por su parte en Colombia la prevalencia encontrada fue del (40%) un porcentaje realmente alto, teniendo en cuenta que la cefazolina está disponible y se usa para infecciones bacterianas profundas como infecciones de piel y tejidos blandos y bacteriemias entre otras (128,129) y además se utiliza de profilaxis en pre y post operatorios tanto en adultos como en niños (130). Es importante mencionar que debido a que los aislamientos recolectados solo representan unos pocos hospitales en cada país, no se pueden generalizar los hallazgos encontrados en este estudio a toda la región. Sin embargo, estudios previos (39), que incluyen más hospitales de cuatro países de América Latina e infecciones distintas a bacteriemia, son consistentes con los resultados de este trabajo. La frecuencia de CzIE en Latino América fue considerablemente mayor que lo reportado en otros países como Estados Unidos(19%) (32,94,131), Corea del Sur (11%-57%) (50,114,132) y Japón (57%) (133) y Canadá (23%) (89), aunque en estos reportes se han evaluado un número limitado de aislamientos.

A partir del enfoque genómico, los resultados de este estudio proporcionan nuevos conocimientos sobre la clasificación de las betalactamasas estafilocócicas en relación con el CzIE. La clasificación original de las betalactamasas se basó inicialmente en metodologías serológicas, que agruparon las enzimas en cuatro categorías distintas (BlaZ tipo A, B, C y D) (127). Luego, los estudios bioquímicos y de secuenciación (123,128–132) apoyaron aún más esta clasificación, que continúa siendo ampliamente utilizada. En el enfoque molecular para clasificar las betalactamasas (BlaZ) de *S. aureus* inicialmente se realizó la caracterización a partir de los dos residuos de aminoácidos 128 y 216 (correspondientes a los residuos 217 y 220 en la Figura 1). Sin embargo, esta clasificación no mostro una asociación con el CzIE, debido a que estos residuos solo abarcan características cinéticas enzimáticas, ignorando las regiones reguladoras y de procesamiento dentro de BlaZ es decir, que no contempla la secuencia del péptido señal, que se ha demostrado que es importante para la liberación de BlaZ en el medio extracelular (134,135). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se utilizó el gran conjunto de aislamientos de este estudio, y se realizó un nuevo análisis de la secuencia completa de BlaZ incluyendo el péptido señal y a raíz de este análisis se identificaron residuos diferentes a los reportados, como asociados estadísticamente con el CzIE, lo que sugiere que otros factores además de las propiedades cinéticas pueden tener un papel fundamental en este fenotipo.

En cuanto a los análisis filo genómicos realizados, se encontraron tres hallazgos importantes. En primer lugar, se encontró una marcada diversidad en BlaZ en aislamientos clínicos de MSSA que no se había evidenciado mediante la clasificación basada en serotipos, usando este nuevo enfoque se logró identificar alotipos BlaZ específicos asociados con la presencia o ausencia de CzIE. De hecho, el BlaZ-2 fue el alotipo dominante que mostró una clara asociación con CzIE. Por el contrario, BlaZ-3 fue el alotipo más abundante asociado con la ausencia de CzIE. También, aunque las asociaciones fueron estadísticamente significativas, la presencia de estos alotipos en cepas con y sin el

fenotipo confirma que otros factores además de la actividad enzimática, juegan un papel importante en el desarrollo del CzIE.

En segundo lugar, se logró identificar residuos de aminoácidos particulares que estaban significativamente asociados con el CzIE. Las sustituciones E112A y G145E se encontraron fuertemente asociadas con alotipos que exhibían el CzIE. Curiosamente, ninguna de estas sustituciones de aminoácidos se encuentra en el sitio activo de la enzima, por lo que se desconoce el efecto funcional de estos cambios. Mientras que la sustitución A9V se localizó en el péptido señal, lo que sugiere que el procesamiento de la enzima también podría desempeñar un papel importante en el desarrollo del CzIE. En un estudio realizado por East y Col, se demostró que la sustitución de un solo aminoácido (serina por prolina) en la posición 22 de BlaZ en el péptido señal resultó en cambios en la escisión de la enzima unida a la membrana, lo que aumentó la liberación de BlaZ en el medio extracelular (136), lo que podría afectar el fenotipo.

Tercero, este estudio encontró que el CC30 es el linaje predominante en los MSSA que presentan el CzIE, y adicionalmente este linaje alberga la mayoría de los aislamientos que tienen el alotipo BlaZ-2 (del BlaZ tipo A). Dos estudios de hospitales de Corea del Sur informaron una asociación similar entre el clon ST30 y aislamientos con BlaZ tipo A que presentaban el CzIE (50,132). Es de destacar que la cepa *S. aureus*. TX0117 un aislamiento clínico completamente caracterizado que posee BlaZ tipo A y fue recuperado de un paciente que presentó falla terapéutica a la cefazolina y que presenta CzIE, también pertenece al clon ST30 (19). El linaje CC30 se ha asociado también con infecciones graves y persistentes, y también con una reducción de la patogenia en modelos animales, lo que está relacionado con mutaciones adquiridas en reguladores bacterianos y genes de virulencia (134). Adicionalmente, análisis genómicos de aislamientos clínicos representativos de *S. aureus* del clon CC30, identificaron un polimorfismo (C55R) en la histidina quinasa del sistema de quórum sensing del gen accesorio (Agr), cambio que fue adquirido por aislamientos contemporáneos de este clon durante la evolución (134). Curiosamente, se describió previamente una asociación entre la disfunción del sistema quórum sensing Agr y el CzIE (87). Por lo tanto, es tentador especular que este linaje alberga atributos genómicos únicos que pueden contribuir al desarrollo de CzIE.

### **3.4 CONCLUSIONES**

Este análisis elucidó un enfoque diferente y novedoso para la clasificación de las betalactamasas estafilocócicas basados en el estudio de la betalactamasa completa (incluido el péptido señal) en una amplia colección de aislamientos clínicos de MSSA en una región donde el CzIE es frecuente. Además, la secuenciación de genoma completo resultó ser una herramienta valiosa para el estudio de la base genética del CzIE pues, los resultados demuestran que el uso de una clasificación basada en alotipos de BlaZ que podría predecir con mayor precisión el CzIE entre los aislamientos clínicos de MSSA.

## 4. CAPITULO II

### **Desarrollo y validación de una prueba rápida diagnóstica para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* susceptibles a meticilina (MSSA).**

La carga clínica de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA) ha sido relevante y significativa (78,137,138), en algunas partes del mundo, la incidencia de las infecciones invasivas causadas por MSSA es más alta que la causada por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (77). La cefazolina, es una cefalosporina de primera generación, que es utilizada por muchos clínicos como la terapia para las infecciones por MSSA porque varios estudios han sugerido que es más segura, más fácil de administrar y tan efectiva como las penicilinas antiestafilocócicas (ASP) (19,26,28,51,59,84,85,97). Además, en algunas regiones del mundo es el único antibiótico que está disponible de forma rutinaria para tratar infecciones invasivas por MSSA (39).

El efecto del inóculo a cefazolina (CzIE) se caracteriza por un marcado aumento en la CIM cuando se utiliza un alto inóculo bacteriano de  $10^7$  UFC /mL. El CzIE se ha asociado con fallas terapéuticas y aumento de la mortalidad en infecciones profundas (33,38,139) y su frecuencia varía en MSSA causantes de infecciones profundas en Asia la frecuencia oscila entre 13% al 20 % (94,130,140), 3% al 27% en Estados Unidos (32,94,131), 23% en Canadá (89) y del 30% a 54 % en MSSA de América Latina (34,50,139). En el mecanismo de acción del CzIE están involucradas betalactamasas estafilocócicas (BlaZ), enzimas que pertenecen a la clase molecular A y se han clasificado en cuatro tipos (A, B, C y D) (134). Los tipos A y C de BlaZ han sido los tipos más comunes asociados con CzIE (32,39,50,93,94,96,133,139). El método estándar de Oro o "Gold standard" para la identificación de CzIE es la determinación de CIM de cefazolina a alto inóculo (CIM AI)  $10^7$  UFC /mL por microdilución en caldo (32). Sin embargo, este procedimiento es técnicamente dispendioso y requiere de experticia incluso en laboratorios de referencia, lo que hace que sea difícil implementar esta técnica en laboratorios clínicos (40). La nitrocefina es una cefalosporina cromogénica sin propiedades antimicrobianas que se utiliza ampliamente para la detección fenotípica de betalactamasas en microorganismos de importancia clínica (140). La enzima BlaZ causa hidrólisis del anillo betalactámico de la nitrocefina, lo que da como resultado un cambio de color característico (de amarillo a rojo) (141). En este estudio se desarrolló una nueva prueba rápida colorimétrica que utiliza la nitrocefina para detectar las cepas que muestran el CzIE, esta nueva prueba se validó en una cohorte de aislamientos de MSSA causante de infecciones en sangre, la mayoría de aislamientos fueron de hospitales de Latinoamérica.

#### **4.1 MATERIALES Y METÓDOS**

##### **4.1.1 Aislamientos bacterianos**

Para este estudio se incluyeron dos grupos de aislamientos de MSSA, el primer grupo fueron 640 MSSA recolectados como parte de un estudio de vigilancia multicéntrica de bacteriemia en hospitales de nueve países de América Latina de 2011 a 2014 (78) y de aislamientos más recientes de 2018 a 2019 de un hospital en Pereira, Colombia (18,139). El segundo grupo incluyó 49 aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo recuperados de Estados Unidos de la Universidad de Duke y del estudio de cohorte de la Colaboración Internacional sobre Endocarditis [ICE]) (35,70).

#### 4.1.2 Tipificación de betalactamasa y análisis filogenético

La tipificación de la betalactamasa estafilocócica se realizó a través de la secuenciación del genoma completo usando BLASTX de la secuencia de BlaZ de los aislamientos frente a BlaZ de *S. aureus* ATCC 29213 (acceso GenBank ODV53133.1). La clasificación de BlaZ se realizó teniendo en cuenta los residuos de aminoácidos en las posiciones 128 y 216 de la secuencia de la proteína (126,142). Los tipos de secuencia (ST) y los complejos clonales (CC) se asignaron de acuerdo con la base de datos PubMLST (143). La relación genética entre los aislamientos se realizó mediante un análisis filogenético del genoma central. El genoma central se definió utilizando Roary v3.13.0, seleccionando los ortogrupos en el 95% de los genomas analizados (122). Las secuencias de nucleótidos ortólogas, definidas por Roary, se alinearon con el algoritmo MUSCLE y se concatenaron para construir una matriz filogenética (123). La filogenia se reconstruyó con RAXML v8.2.11 utilizando GTRGAMMA y 100 réplicas de arranque rápido (120). La visualización y anotación de árboles se realizó con la herramienta en línea llamada Interactive Tree of Life v5.5.1 (<https://itol.embl.de>) (125).

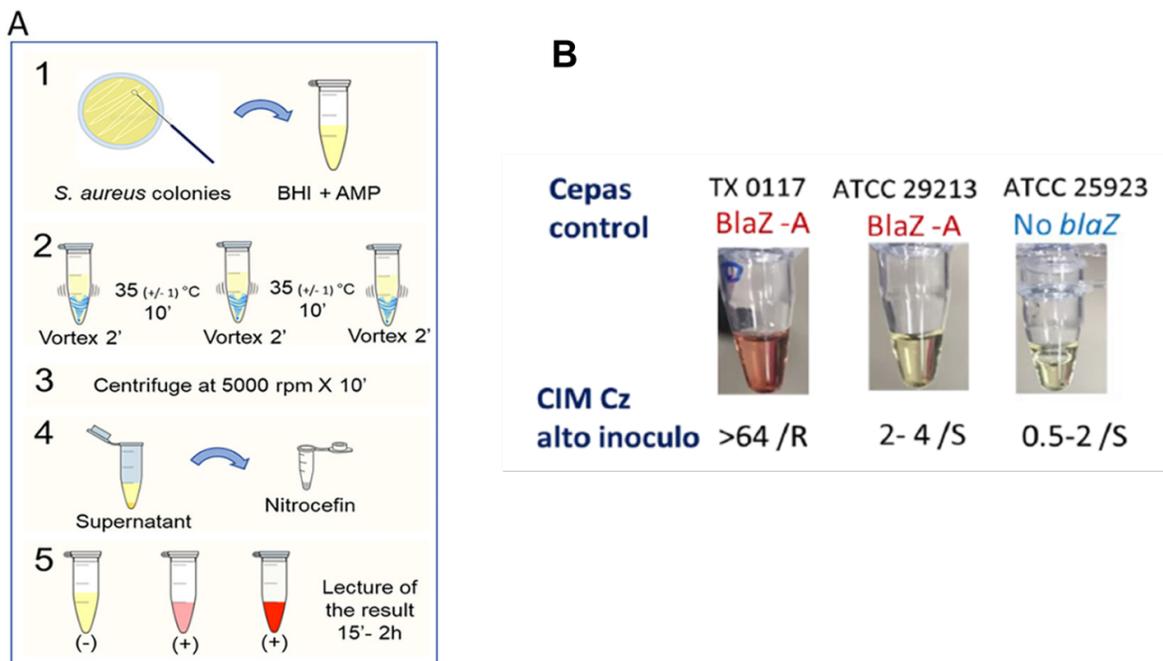
#### 4.1.3 Determinación del efecto del inóculo de cefazolina.

El efecto inóculo a cefazolina (CzIE) se evaluó mediante microdilución en caldo utilizando inóculos bacterianos estándar (IE)  $5 \times 10^5$  UFC/mL y alto inóculo (AI)  $5 \times 10^7$  UFC/mL (40,144). La determinación de la CIM a cefazolina se realizó por triplicado y fueron interpretadas por tres investigadores independientes. Los controles incluidos fueron *S. aureus* TX0117, cepa que alberga un tipo A BlaZ y exhibe el CzIE. Esta cepa se recuperó de un paciente con endocarditis y falla cefazolina (35). También, la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 alberga el BlaZ tipo A, pero no presenta el CzIE y se usa ampliamente de control de calidad para pruebas de susceptibilidad y, por último, se incluyó una cepa MSSA que no posee BlaZ la ATCC 25923. El CzIE se definió como la presencia de una CIM de  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  al evaluar el inóculo alto y de  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  al evaluar el inóculo estándar (32).

#### 4.1.4 Prueba colorimétrica rápida para detectar el CzIE.

La nitrocefina se preparó como solución madre a una concentración de 5 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y luego se diluyó a 400  $\mu\text{M}$  en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 0,1 M, pH 7,0. La solución se conservó en un tubo envuelto en papel aluminio a 4°C. Los aislamientos de MSSA se cultivaron en agar de infusión de cerebro y corazón (BHI) (Oxoid Limited, Reino Unido). Se incubación durante 18 a 24 horas a 37 °C, se seleccionaron colonias morfológicamente similares con un asa estéril calibrada de 1  $\mu\text{l}$ . El asa se inoculó en un tubo de 2 ml que contenía 1 mL de caldo BHI con 150  $\mu\text{g/ml}$  ampicilina. La suspensión se agitó vigorosamente durante 2 minutos para asegurar la homogeneización y se incubó a  $35 \pm 1$  °C durante 10 minutos. Después de la incubación, la suspensión se agitó nuevamente durante 2 minutos, luego, se llevó a cabo un segundo paso de incubación de 10 minutos a  $35 \pm 1$ °C seguido de vortex (2 minutos). Posteriormente, la solución se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, Luego, se transfirieron 25  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a un tubo de 0,2 ml que contenía 25  $\mu\text{l}$  de solución de nitrocefina a 400  $\mu\text{M}$  recién preparada (Figura 4A). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente (15 a 25 °C, una media de 22 °C) y se protegieron de la luz, seguido de una inspección visual para observar el cambio de color a los 15, 30, 45 minutos, 1 hora y 2 horas. Un resultado positivo se interpretó como cualquier cambio de color de amarillo a rojo desde 15 min a 2 horas (figura 4B). Las cepas control de *S. aureus* TX0117, ATCC 29213 y ATCC 25923 se incluyeron en la estandarización de la

prueba. Además, el desarrollo y la validación de la prueba rápida se realizó en paralelo en los laboratorios de Colombia y Estados Unidos.



**Figura 4 Metodología de la prueba rápida Czie**

(A) Metodología de la prueba rápida (B) Controles de calidad de *S. aureus*. Los tubos de izquierda a derecha corresponden a MSSA TX0117 (BlaZ-positivo que muestra Czie), MSSA ATCC 29213 (BlaZ-positivo que carece de Czie) y MSSA ATCC 25923 (BlaZ-negativo que carece de Czie). El cambio de color a rojo indica un resultado positivo (presencia de Czie), mientras que un color amarillo sugiere un resultado negativo.

#### 4.1.5 Análisis Estadístico

Inicialmente se evaluó la sensibilidad y especificidad de todos los datos y posteriormente, se realizaron los cálculos basados en los tipos BlaZ y el CIM-AI utilizando MedCalc para Windows, versión 15.0 (MedCalc Software, Ostende, Bélgica). Se usaron los rangos de prevalencia publicados para calcular los valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN,) en cada país (145). Se construyó una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) para las predicciones del rendimiento diagnóstico de la prueba rápida utilizando todos los datos de aislamientos de MSSA y el módulo Scikit-learn (146) para el lenguaje de programación Python. Se calcularon el área bajo la curva (AUC) y el intervalo de confianza (IC) del 95% del AUC.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Desarrollo y validación de la prueba rápida Czie.

La prueba rápida para la identificación del Czie fue validada en 689 aislamientos de MSSA causantes de infecciones en sangre. 640 de Latino América y 49 de Estados Unidos (Tabla 3). 257 es decir, el 37% del total de aislamientos de MSSA presentaron Czie. En Latino

América la frecuencia del CzIE fue aproximadamente del 40% y de 10 % en los aislamientos de EE.UU. (Tabla 3). La sensibilidad global de la prueba fue de 82,5%, con una especificidad del 88,9% (Tabla 3). El rendimiento diagnóstico de la prueba rápida CzIE mostró variación entre los países, por ejemplo, en Colombia país que proporcionó el mayor número de cepas analizadas (n = 186), la frecuencia de CzIE fue de 39%, la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida CzIE de 84,9% y 91,2%, respectivamente. En contraste, con Venezuela país que proporcionó 23 aislamientos y 43% (n=10) exhibieron CzIE, en estos aislamientos la prueba rápida presento una baja sensibilidad del 60% pero alta especificidad del 100%. Además, es de destacar que en 49 aislamientos de MSSA de los Estados Unidos, solo 5 fueron positivos para el CzIE y la sensibilidad y especificidad de la prueba fue de 80% y 93,2%, respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3.** Rendimiento diagnóstico de la prueba rápida para la detección de la CzIE en MSSA recuperado de hospitales de países de Latinoamérica y EE.UU.

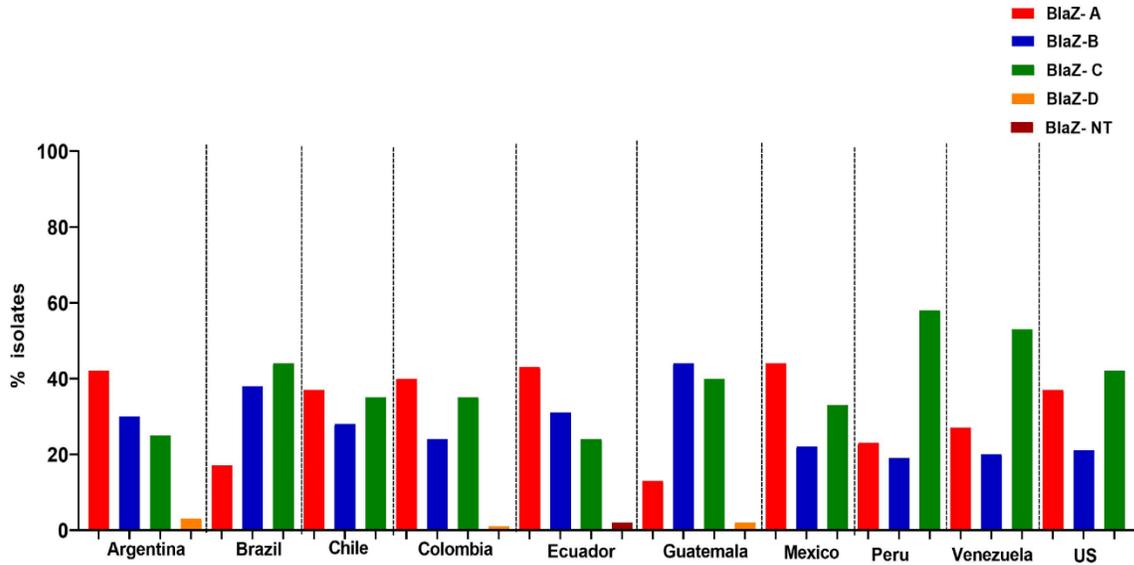
País (No de aislamientos)	Efecto Inoculo a Cefazolina determinada por microdilución en caldo "Gold Standard"						Sensibilidad (CI 95%)	Especificidad (CI 95%)
	Presente			Ausente				
	No (%) de MSSA	Prueba Rápida		No. (%) de MSSA	Prueba Rápida			
		No. (%) MSSA Positivo	No. (%) MSSA Negativo		No. (%) MSSA Negativo	No. (%) MSSA Positivo		
Argentina n=82	45 (55)	40 (89)	5 (11)	37 (45)	34 (92)	3 (8)	88.9% (76.0% - 96.3%)	91.9% (78.1% - 98.3%)
Brasil n=75	23 (31)	14 (61)	9 (39)	52 (69)	42 (81)	10 (19)	60.87% (38.5% - 80.3%)	80.8% (67.5% - 90.4%)
Colombia n=186	73 (39)	62 (85)	11 (15)	113 (61)	103 (91)	10 (9)	84.9% (74.6% - 92.2%)	91.2% (84.3% - 95.7%)
Chile n=85	26 (31)	22 (85)	4 (15)	59 (69)	49 (83)	10 (17)	91.2% (84.3% - 95.7%)	83.1% (71.0% - 91.6%)
Ecuador n=64	26 (41)	21 (81)	5 (19)	38 (59)	35 (92)	3 (8)	80.8% (60.7% - 93.5%)	92.1% (78.6% - 98.3%)
Guatemala n=55	23 (42)	19 (83)	4 (17)	32 (58)	27 (84)	5 (16)	82.6% (61.2% - 95.1%)	84.4% (67.2% - 94.7%)
México n=10	4 (40)	4 (100)	0	6 (60)	5 (83)	1 (17)	100% (39.76% - 100%)	83.3% (35.9% - 99.6%)
Perú n=60	22 (37)	20 (91)	2 (9)	38 (63)	35 (92)	3 (8)	90.9% (70.8% - 98.9%)	92.1% (78.6% - 98.3%)

Venezuela n=23	10 (43)	6 (60)	4 (40)	13 (57)	13 (100)	0	60% (26.2 - 87.8%)	100% (75.3% - 100%)
EE.UU n=49	5 (10)	4 (80)	1 (20)	44 (90)	41 (93)	3 (77)	80% (28.4% - 99.5%)	93.2% (81.3% - 98.6%)
TOTAL n=689	257 (37)	212 (82)	45 (18)	432 (63)	384 (89)	48 (11)	82.5% (77.3% - 86.9%)	88.9% (85.5% - 91.7%)

#### 4.2.3 Descripción de la precisión diagnóstica de la prueba rápida CzIE varía según el tipo de betalactamasa.

El CzIE se ha asociado con la presencia de betalactamasas estafilocócicas tipo A y C (39,94,133,147,148). BlaZ tipo A tiene una mayor actividad contra la nitrocefina y la cefazolina, mientras que BlaZ tipo C tiene más afinidad por la cefalotina que por la cefazolina (127). Es de resaltar que BlaZ tipo C es la más común en los aislamientos del torrente sanguíneo MSSA incluidos en el estudio, seguido por el tipo A, con variaciones observadas entre los países (Figura 5). Cuando se analizó el rendimiento diagnóstico de la prueba rápida estratificado por tipo de betalactamasa, la prueba funcionó mejor en la detección de CzIE en aislamientos de MSSA que presentaban BlaZ tipo A comparado a los otros tipos de BlaZ (Tabla 2) con una sensibilidad y especificidad de 92,7% y 87,8%, respectivamente. Mientras que para BlaZ tipo C, la sensibilidad y la especificidad fueron más bajas 72,3 % y 82,7 %, respectivamente, lo que concuerda con el hecho de que la enzima tipo C tiene menor capacidad para hidrolizar la nitrocefina (127). El rendimiento de la prueba se evidenció aún más disminuido frente a las betalactamasas tipo B que no tienen una capacidad robusta para hidrolizar nitrocefina (125) con una sensibilidad del 53,3 %. Sin embargo, la prueba rápida exhibió una especificidad del 100 % contra cepas que carecen de BlaZ (Tabla 4).

Por otro lado, el análisis del conjunto completo de datos de MSSA en la curva característica operativa (ROC) arrojó un AUC general de 0,85 (IC 95 % de 0,83 a 0,88) lo cual indica una buena precisión diagnóstica de la prueba rápida CzIE (Figura 6). De forma similar, la prueba rápida mostró un valor de AUC de 0,90 (IC 95 % de 0,85 a 0,95) para los aislamientos con BlaZ tipo A, lo que confirma el sólido rendimiento de la prueba en MSSA que albergan enzimas betalactamasas estafilocócicas tipo A. En el capítulo I de este estudio se encontró que ciertos alotipos de BlaZ se asociaron con la presencia de CzIE en aislamientos clínicos de MSSA recuperados de Latino América (139). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados discrepantes de la prueba rápida, es decir falsos positivos y falsos negativos para determinar alguna asociación con los alotipos de BlaZ no se encontró ninguna correlación (Anexo 1).



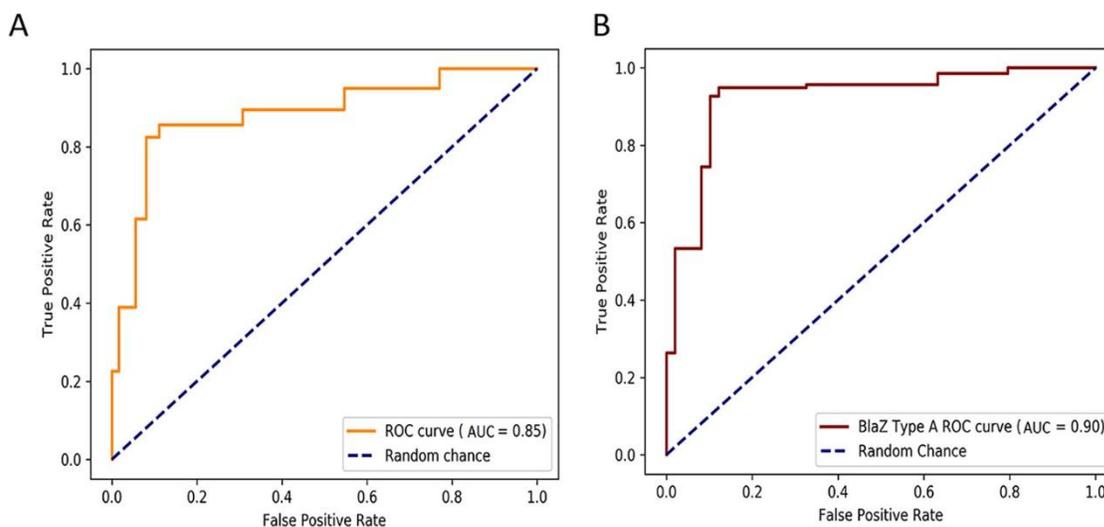
**Figura 5. Tipos de BlaZ en aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo recuperados de hospitales latinoamericanos y EE.U.** Argentina n=71, Brasil n=63, Chile n=68, Colombia n=153, Ecuador n=49 Guatemala n=45, México n=9, Perú n=43, Venezuela n=15, US N=38. Las columnas muestran diferentes tipos de BlaZ: rojo tipo-A, azul tipo-B, verde tipo-C, naranja tipo-D, marrón color No tipificable (NT).

**Tabla 4. Rendimiento Diagnóstico de la prueba rápida estratificado por tipo de Betalactamasa**

<i>S. aureus</i> evaluados No de aislamientos	Resultado Prueba Rápida Nitrocefina	CzIE – CIM Gold Standard		Sensibilidad (CI 95%)	Especificidad (CI 95%)
		Presencia	Ausencia		
Total, MSSA n=689	Positivo	212	48	82.5% (77.3% - 86.9%)	88.9% (85.5% - 91.7%)
	Negativo	45	384		
	Total	257	432		
BlaZ - tipo A n=186	Positivo	127	6	92.7% (87% - 96.4%)	87.8% (75.2%-95.4%)
	Negativo	10	43		
	Total	137	49		
BlaZ - tipo B n=157	Positivo	8	24	53.3% (26.6% - 78.7%)	83.1% (75.9% - 88.9%)
	Negativo	7	118		
	Total	15	142		
BlaZ - tipo C n=205	Positivo	73	18	72.3% (62.5% - 80.7%)	82.7% (74% - 89.4%)
	Negativo	28	86		
	Total	101	104		
BlaZ - tipo D	Positivo	4	0	NA	NA
	Negativo	0	1		

n=5	Total	4	1		
BlaZ No tipificable n=1	Positivo	0	0	NA	NA
	Negativo	0	1		
	Total	0	1		
BlaZ negativo n=135	Positivo	0	0	NA	100%
	Negativo	0	135		
	Total	0	135		

IC= intervalo de confianza del 95%; CzIE= efecto del inóculo de cefazolina Identificado por microdilución en caldo a alto inóculo; El BlaZ no tipificable indica la presencia de Lisina (K) en la posición 119 y serina (S) en la posición 207 de aminoácidos de BlaZ.; NA= No aplica.



**Figura 6 Curva característica operativa del receptor (ROC) y área bajo la curva ROC (AUC) para evaluar el rendimiento diagnóstico de la prueba rápida CzIE.** (A) Curva ROC para el conjunto completo de aislamientos MSSA ( n = 689). (B) Curvas ROC para aislamientos BlaZ tipo A (n = 186). Las líneas punteadas representan probabilidad aleatoria (AUC = 0,5).

#### 4.2.4 Correlación entre la prueba rápida del CzIE y las CIM de cefazolina en inóculo alto (CIM-AI).

Empleando la determinación de la CIM a cefazolina en alto inoculo (AI) que es la prueba Estándar de Oro o “Gold Estándar ” para identificar el CzIE, se encontró que entre los aislamientos de MSSA que presentaron BlaZ tipo A el 74% (n=137/186) tenían la presencia del CzIE y los aislamientos BlaZ tipo C el 49 % (n=101/205) exhibió CzIE, En este estudio se demostró que el CzIE está altamente correlacionado con la cantidad extracelular de la enzima y que los aislamientos con valores CIM a alto inoculo (CIM-AI) frente a cefazolina más altos tienen mayor probabilidad de fallar en la terapia con cefazolina. Es importante mencionar que el punto de corte para determinar el efecto CzIE es  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ , basado en análisis anteriores que sugieren que este valor corresponde a la CIM más baja que probablemente se correlaciona con desenlaces clínicos negativos (39). De esta manera se evaluó el desempeño diagnóstico de la prueba rápida CzIE estratificada por el valor de CIM-AI. La Tabla 5 muestra que la sensibilidad de la prueba rápida aumentó notablemente a

98,2 % en aislamientos con BlaZ tipo A que presentan CIM de  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ , lo que sugiere que la prueba sería confiable en MSSA que liberan cantidades importantes de enzima betalactamasa tipo A.

**Tabla 5. Rendimiento de la prueba rápida CzIE según tipo de betalactamasa y CIM de inóculo alto**

Tipo BlaZ (n)	Cz CIM a AI (No de aislamientos)	Resultados de la prueba rápida	CzIE detectado por Microdilución en caldo "Gold Standard"		Sensibilidad (CI 95%)	Especificidad (CI 95%)
			Presencia No de aislamientos (%)	Ausencia No de aislamientos (%)		
Tipo A n=186	$\geq 32$ $\mu\text{g/ml}$ (n=113)	Positivo	111 (98)	0	98.2% (93.8%- 99.8%)	NA <sup>a</sup>
		Negativo	2 (2)	0		
		Total	113	0		
	16 $\mu\text{g/ml}$ (n=24)	Positivo	16 (67)	0	66.7% (44.7% - 84.4%)	NA <sup>a</sup>
		Negativo	8 (33)	0		
		Total	24	0		
	$\leq 8$ $\mu\text{g/ml}$ (n=49)	Positivo	0	6 (12)	NA <sup>b</sup>	87.8% (75.2%- 95.4%)
		Negativo	0	43 (88)		
		Total	0	49		
Tipo C n=205	$\geq 32$ $\mu\text{g/ml}$ (n=56)		42 (75)	0	75.0% (61.6% - 85.6%)	NA <sup>a</sup>
			14 (25)	0		
			56	0		
	16 $\mu\text{g/ml}$ (n=45)		31 (69)	Positivo	68.9% (53.4%- 81.8%)	NA <sup>a</sup>
			14 (31)	Negativo		
			45	Total		
	$\leq 8$ $\mu\text{g/ml}$ (n=104)		0	Positivo	NA <sup>b</sup>	82.7% (74.0%- 89.4%)
			0	Negativo		
			0	Total		

IC: intervalo de confianza 95%; CzIE: Efecto del inóculo de cefazolina identificado por microdilución en caldo a alto inóculo.

NA<sup>a</sup>: No aplica, para calcular la especificidad se requiere el número de falsos Positivos (FP) y el número de verdaderos Negativos (VN) derivados de la columna que indica "ausencia del CzIE", por lo tanto, en estos casos se pudo estimar este valor ya que FP=0 y VN =0;

NA<sup>b</sup> = No aplicable debido al pequeño tamaño de la muestra

NA<sup>c</sup> = No aplicable, para calcular la sensibilidad se requiere el número de verdaderos positivos (VP) y el número de falsos negativos (FN) derivados de la columna que indica "presencia de CIE", por lo tanto, en estos casos no pudimos estimar este valor ya que VP=0 y FN =0.

#### 4.2.5 Valores predictivos positivos y negativos de la prueba rápida para la detección del CzIE y análisis de razón de verosimilitud

Se estimó la efectividad de la prueba rápida utilizando valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) (149). Dado que hay datos limitados sobre la prevalencia de CzIE en

MSSA, se incorporaron datos publicados disponibles para aislamientos del torrente sanguíneo de los países participantes que contribuyeron con más de 10 aislamientos (35,39,40,94,139). La Tabla 6 muestra que el VPN general osciló entre 81,4% y 95,6%, mientras que el VPP osciló entre 59,8% y 100% en los países de Latino América.

Para el análisis de los VPP y VPN de Estados Unidos, se utilizaron diferentes estimaciones de prevalencia(32,94,148).debido a que hay pocos estudios han investigado la prevalencia de CziE en MSSA. Las estimaciones de prevalencia que se utilizaron oscilan entre el 25 % y el 4 % , , el VPN osciló entre el 93,3 % y el 97,7 %. En cambio, el VPP presentó amplias variaciones del 32,8% al 79,6% (Tabla 6).

**Tabla 6. Resultados de Valores Predictivos Positivos y Negativos teniendo en cuenta prevalencias reportadas en cada país**

País	Prevalencia <sup>a</sup> (%)	Sensibilidad <sup>b</sup>	Especificidad	PPV <sup>c</sup>	NPV <sup>c</sup>	Estudios
Argentina	55	88.9	91.9	92.8	87.6	Miller et al. 2018
Brasil	32	60.9	80.8	59.8	81.4	Este estudio
Colombia	39 <sup>d</sup>	84.9	91.2	86.0	90.4	Este estudio, Rincón et al. 2013
Chile	32	91.2	83.1	70.1	92.0	Este estudio
Ecuador	41 <sup>d</sup>	80.8	92.1	87.7	87.3	Este estudio, Rincón et al, 2013
Guatemala	44	82.6	84.4	80.6	86.1	Este estudio
Perú	32 <sup>d</sup>	90.9	92.1	84.4	95.6	Este estudio, Rincón et al. 2013
Venezuela	30.5 <sup>d</sup>	60	100	100	85.1	Este estudio, Rincón et al. 2013
EE. UU	25	80.0	93.2	79.6	93.3	Nannini et al. 2009 <sup>e</sup>
	4	80.0	93.2	32.8	99.1	Livorsi et al. 2012
	10	80.0	93.2	56.6	97.7	Este estudio

Prevalencia de CIE en aislamientos de MSSA recuperados de infecciones del torrente sanguíneo en cada país. Sólo se incluyeron las prevalencias de estudios basados en CIM de cefazolina  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$  con inóculo alto.

Sensibilidad y especificidad de la prueba rápida calculadas en este estudio

Los valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN) se calcularon teniendo en cuenta las prevalencias reportadas anteriormente.

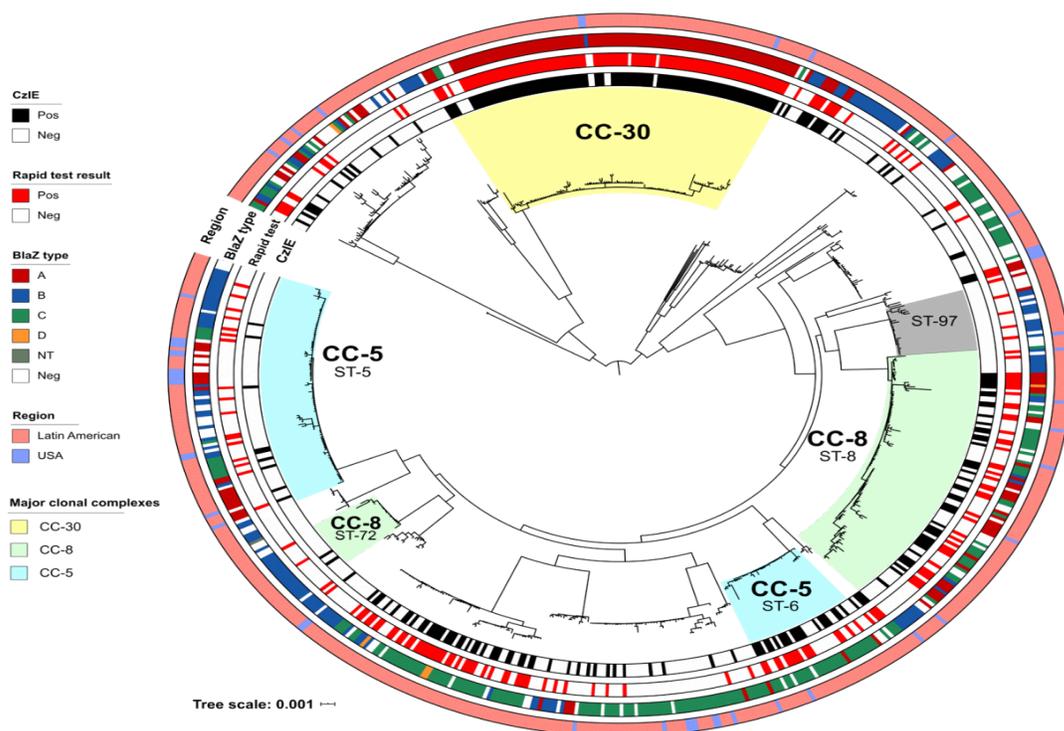
El valor representa la media de prevalencia de dos estudios reportados.

La prevalencia de CIE en este estudio (Nannini 2009) corresponde a la encontrada en aislamientos recuperados de 24 pacientes en hemodiálisis.

Se realizó el análisis de la razón de verosimilitud (RV) la cual se define como la razón entre la posibilidad de observar un resultado de efecto inóculo positivo versus la posibilidad de ese resultado en aislamientos que no tengan el fenotipo, El uso de esta razón es una herramienta valiosa para la toma de decisiones clínicas frente a la solicitud de algún test diagnóstico, porque son valores independientes de la prevalencia de la enfermedad (186). Cuando una prueba diagnóstica es altamente relevante tiene una RV positiva  $> 10$  y RV negativa  $< 0.1$ , si es buena RV positiva 5-10 y RV negativo 0,1 – 0,2; Prueba diagnóstica regular RV positivo 2-5 RV negativo 0,2-0,5 y una prueba mala RV positivo  $< 2$  y RV negativo  $> 0,5$  (186). Los valores de RV arrojadas por la prueba rápida desarrollada fue para el RV positivo fue 7,43 y el RV negativo fue 0.197 lo cual la clasifica como una prueba buena para ser contemplada en las decisiones en la clínica.

#### 4.2.6 Análisis Filogenéticos de MSSA de EE. UU y el CzIE.

En los resultados presentados en el capítulo I (139) se evidenció que los aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo de Latino América pertenecían a una variedad de linajes genéticos y que CC30 era el linaje predominante entre los MSSA que presentaban CzIE (139). Se realizó la reconstrucción del árbol filogenético utilizando un core de genes de cepas MSSA Latino América (139) y se incluyeron los aislamientos de EE.UU. De manera similar a los hallazgos anteriores en Latino América, se evidenció una heterogeneidad genética importante entre los MSSA de EE. UU, pero no se encontró diferencias genéticas claras entre los aislamientos de MSSA de EE. UU. y Latino América (Figura 7). Así, los 49 aislamientos estadounidenses se distribuyeron en 18 ST y el linaje genético más común fue el CC5 (28 %, n = 14), seguido de CC15 (12 %, n = 6) y CC8 (10 %, n = 5).



**Figura 7** Árbol filogenético de máxima verosimilitud del core genoma de aislamientos de MSSA de Latino América y EE. UU.

#### 4.3 DISCUSIÓN

En esta investigación se logró desarrollar una nueva prueba rápida colorimétrica para identificar la presencia de CzIE en aislamientos clínicos de MSSA. Aunque aún no se han reportado estudios del impacto del CzIE en pacientes infectados con MSSA y tratados con cefazolina, si existen diversos estudios que han descrito una asociación de CzIE con una mayor mortalidad y peores desenlaces clínicos (26,39,150). Estos datos están respaldados con experimentos en modelos animales que confirman que el CzIE conduce al fracaso del tratamiento con cefazolina (151). En este contexto, parece razonable interpretar que la identificación de CzIE puede ser una herramienta útil en el tratamiento de infecciones severas por MSSA con cefazolina.

Sin embargo, detectar el CzIE no es una tarea sencilla, si bien la microdilución en caldo con alto inoculo bacteriano es el “Estándar de Oro” para la detección del CzIE, no existen pautas estandarizadas actuales para la ejecución de este método, lo que resulta en la utilización de personal, recursos y tiempo adicionales. Para determinar la CIM-AI debe realizarse por triplicado y requiere experiencia en la interpretación de los resultados y para empeorar la situación los resultados solo están disponibles después de más de 2 -3 días y la prueba requiere personal altamente capacitado. En consecuencia, el estándar de oro no se adaptaría fácilmente al flujo de trabajo del laboratorio de microbiología clínica. Por otra parte, la expresión, procesamiento y liberación de la betalactamasa BlaZ, extracelular en *S. aureus* es un proceso complejo y requiere la participación de múltiples enzimas (152). En este estudio, se desarrolló una novedosa prueba colorimétrica utilizando como sustrato la nitrocefina con base en la detección de la actividad extracelular de la betalactamasa en sobrenadantes de cepas de MSSA y esto se correlacionó con la presencia del CzIE en cepas prototípicas (Anexo 2). La nitrocefina se ha utilizado ampliamente para la detección y caracterización de la betalactamasa (BlaZ) de *S. aureus* (sin diferenciar si es betalactamasa anclada a la membrana o extracelular) (40,41) y el perfil de hidrolisis de la nitrocefina ha sido clave para la clasificación de los diferentes tipos de BlaZ (A, B, C o D) (38).

Las pruebas de rutina en los laboratorios clínicos para detección de betalactamasa se realizan empleando discos de nitrocefina que no pueden discriminar entre la betalactamasa liberada y la unida a la membrana. Y antes de emplear la nitrocefina líquida, se evaluaron discos de nitrocefina con sobrenadantes bacterianos después de la inducción con ampicilina y los discos de nitrocefina funcionaron correctamente con las cepas control, pero cuando se evaluó en una colección más grande de aislamientos (previamente caracterizados para el CzIE) no funcionó, no se vio cambio de color en los discos. Por el contrario, la solución de nitrocefina permitió una visualización adecuada de la actividad enzimática de BlaZ liberada en estos aislamientos y, por lo tanto, fue elegido como el sustrato colorimétrico para desarrollar la prueba rápida. Por otro lado, se evaluaron diferentes tiempos de lectura en el proceso de desarrollo de la prueba rápida con las cepas control y se evidenció que aquellos aislamientos que exhibían CzIE, pero albergan enzimas BlaZ con menor afinidad por la nitrocefina podía detectarse si el período se extendía a 2 horas. Después de las 2 horas, los controles negativos también cambiaron de color y ya no pudieron discriminarse. Por lo tanto, con base en estas observaciones, se determinó extender la lectura de la prueba rápida hasta las 2 horas. Posteriormente, con el objetivo de validar la prueba colorimétrica rápida de CzIE, se utilizó la amplia colección de aislamientos de MSSA de hospitales de Latino América y de los Estados Unidos caracterizados para CzIE.

Interesantemente la prevalencia global de CzIE fue de 37 %, con un rango del 10 % para EE. UU. al 55 % en Latino América. Es importante resaltar que los aislamientos de EE. UU. procedían principalmente de repositorios, esto demarca un punto importante ya que el uso de cefazolina como terapia de primera línea para MSSA ha aumentado en los últimos años. Por lo tanto, es posible que las frecuencias reportadas en este estudio para los aislamientos de EE. UU., puede estar subestimadas.

La sensibilidad y la especificidad globales de la prueba rápida fueron 82,5% y 88,9%, respectivamente. Además, la disponibilidad de la secuenciación del genoma completo en todos los aislamientos permitió identificar los tipos de BlaZ más comunes asociados con el CzIE. También se encontró que la precisión de la prueba rápida CzIE tuvo variaciones de acuerdo con el tipo de betalactamasa. BlaZ tipo A es la enzima más eficiente en la hidrolisis

de cefazolina y nitrocefina en comparación con enzimas BlaZ tipo C o tipo B (38). Por lo tanto, la prueba funcionó mucho mejor en aislamientos MSSA que tenían BlaZ tipo A, con una sensibilidad y especificidad del 92,7 % y del 87,8 %, respectivamente. En contraste, la sensibilidad de la prueba en aislamientos con BlaZ tipos C y B fue menor 72,3% y 53,3%, respectivamente. Es probable que el menor rendimiento esté relacionado con la menor actividad hidrolítica de las enzimas BlaZ de los tipos B y C frente a la nitrocefina. Sin embargo, se observó que en ciertos países como Guatemala con alta prevalencia de enzimas BlaZ tipo B y C, la prueba aún funcionó bien (Tabla 5 y Figura 5). Las diferencias de la hidrólisis de la nitrocefina entre las diferentes betalactamasas, se explicaron en el capítulo I (26), donde se encontraron más variaciones en las secuencias de BlaZ de lo que se había reportado. De hecho, dentro del mismo tipo de BlaZ, se encontraron diversas variantes o alotipos que pueden tener una actividad diferencial frente a la nitrocefina. Por lo tanto, se analizaron todos los casos de falsos positivos y falsos negativos obtenidos en la validación de la prueba, para determinar si se podía encontrar una asociación del resultado de la prueba CzIE con algún alotipo en particular, pero no logro identificar ninguna asociación de alotipos individuales (Anexo 1).

Estos resultados sugieren que la variabilidad observada en el rendimiento de la prueba en cepas con los mismos tipos de BlaZ podría deberse en parte a las diferencias cinéticas entre los alotipos que pertenecen al mismo tipo de BlaZ. Estos hallazgos sugieren que las variaciones no identificadas entre los contextos genómicos de las cepas pueden afectar el rendimiento de la prueba. Por ello se realizó el análisis del rendimiento de la prueba basado en el valor de la CIM-AI, el punto de corte de la CIM-AI de cefazolina para determinar si una cepa tiene o no CzIE es de  $\geq 16$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se eligió con base en estudios previos que reportaron que este valor de CIM-AI se correlacionó con la mortalidad en pacientes con bacteriemia (15,32) , y los resultados indicaron que el 62 % de los falsos negativos exhibieron CIM-AI cercanas al valor del punto de corte. Por consiguiente, se investigó el rendimiento diagnóstico del CzIE en aislamientos con valor de CIM-AI de  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que es más probable que presenten un fenotipo fuerte y también que causen problemas terapéuticos con cefazolina, ya que se puede asumir que estos aislamientos libera mayores cantidades de la enzima en el medio extracelular. Al evaluar este valor de CIM-AI, la sensibilidad de la prueba aumentó a 98,2 % para las enzimas de BlaZ tipo A, lo que sugiere que la prueba podría identificar la mayoría de los aislamientos con una CzIE con alta producción de betalactamasa extracelular, que podrían representar mayor impacto clínico. También Cabe destacar que la especificidad de la prueba rápida CzIE, fue de 100 % en los aislamientos que carecían de BlaZ.

Por último, se calcularon los valores VPP y VPN utilizando las prevalencias estimadas y publicadas del CzIE, ya que fue difícil determinar la prevalencia general de este fenómeno en los países participantes. Según los resultados del desarrollo de esta prueba rápida la alta sensibilidad y el VPN serían las características más informativas para ayudar en las decisiones terapéuticas. De esta manera, las estimaciones realizadas sugieren que la prueba tiene un buen VPN en prevalencias bajas y altas (Tabla 6).

#### **4.4 CONCLUSIONES**

Se desarrolló una prueba rápida basada en la cefalosporina cromógena nitrocefina, una prueba simple, económica y novedosa para identificar aislamientos de MSSA que presenten CzIE. Esta prueba proporcionaría información importante que actualmente no está disponible en ningún laboratorio de microbiología clínica con resultados en 3 horas. La prueba es fácil de realizar y no requiere equipo o reactivos especializados y la interpretación

es sencilla, lo que sugiere menores barreras para la implementación y la idoneidad incluso en lugares con recursos limitados.

## 5. CAPITULO III

### **Estimación de costo-efectividad de la prueba rápida diagnóstica para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en MSSA clínicos**

La resistencia antimicrobiana (RAM) no solo pone en peligro la eficacia y la prevención del tratamiento de infecciones causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos (2). Sino que además incurre en altos costos económicos no solo para el paciente sino para la sociedad (153). Según el reporte del World Bank Group, las simulaciones económicas encontraron que para 2050 en un escenario donde la RAM tuviese bajo impacto probablemente el producto interno (PIB) caería en un 1,1% y en el escenario de un alto impacto de la RAM el mundo perderá el 3,8% de PIB anual, con un déficit anual de \$ 3,4 billones de USD para 2030 (154). Esto sin contar que en las evaluaciones económicas de los antimicrobianos y las intervenciones como los diagnósticos, no se contemplan costos indirectos como pérdida de la productividad debido al exceso de morbilidad y mortalidad prematura(111,112).

Todos los estudios tanto científicos como económicos se han enfocado en MRSA por su amplio arsenal de determinantes de resistencia, además el impacto económico que representa para el sistema de salud es alarmante, por ejemplo, infecciones por MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA) genera un costo a los pacientes dependiendo de su edad entre 7.070 y 20.489 USD (92). En Estados Unidos, se ha descrito que infecciones por CA-MRSA impone una carga anual de 1.4 billones a 13.8 billones de USD a la sociedad (114). En Alemania, los pacientes con infecciones por MRSA tienen una estancia hospitalaria prolongada hasta de 11 días y presentan 7% más de probabilidad de someterse a ventilación mecánica y 7% más de probabilidad de muerte y provocan costos elevados totales de 8.198 Euros (155). Por otro lado, en pacientes con hemodiálisis que adquieren infección por MRSA los costos reportados oscilan entre los 9.554 – 20.240 euros por episodio de infección (156).

Sin embargo, MSSA también causa infecciones graves, de hecho se ha publicado que no existe diferencia significativa en los desenlaces de las infecciones causadas por MRSA vs MSSA (48), incluso este microorganismo es el mayor causante de infecciones profundas como bacteriemia en varios países de latino América incluyendo nuestro país (78). El tratamiento de elección para MSSA son las ASP como nafcilina u oxacilina pero la cefazolina se ha convertido en una opción importante debido a que tiene mejor dosificación, bajos efectos adversos, buena tolerabilidad y bajo costo (26,28,157). Desafortunadamente la eficacia de cefazolina se está viendo amenazada por el “efecto inoculo” un mecanismo de resistencia que impide que cefazolina sea efectiva en infecciones por MSSA que tienen alto inoculo bacteriano, como por ejemplo bacteriemia, osteomielitis y endocarditis entre otras, causando falla terapéutica (32,40,158). Como se describe en el capítulo I nuestro país presenta un 40% de CzIE en MSSA causante de bacteriemia lo cual es un porcentaje alto de resistencia. El método “Estandar de Oro” para la detección de efecto inoculo a cefazolina es muy dispendioso, requiere de experticia para su lectura, realmente no es una técnica que pueda desarrollarse en un laboratorio de microbiología clínico.

Por este motivo en este estudio en el capítulo II se describe el desarrollo y la validación de una prueba rápida diagnóstica para el efecto inoculo a cefazolina (CzIE). A partir de 689 aislamientos de MSSA causantes de bacteriemia, esta prueba tuvo una sensibilidad global del 82,5%, con una especificidad del 88,9%(159). Aprovechando este valioso aporte no solo a la ciencia sino a la salud, pues las pruebas diagnósticas son una herramienta para tener un tratamiento oportuno, reducir la gravedad de síntomas y prevenir la propagación de la

enfermedad. se propuso hacer un análisis de la estimación de costo efectividad de la prueba rápida para detectar el efecto inoculo a Cefazolina (CzIE), siendo esta prueba una herramienta para recuperar el uso de la cefazolina.

## 5.1 MATERIALES Y METODOS

### 5.1.1 Tipo de estudio

Evaluación económica de costo- efectividad de la prueba rápida para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE).

### 5.1.2 Revisión Integrativa

Para poder desarrollar la evaluación de costo- efectividad, se establecieron unos supuestos (datos basados en bibliografía de alta calidad, para realizar una aproximación a lo que se podría encontrar en los escenarios propuestos), que se determinaron por medio de una revisión bibliográfica (Tabla 7) integrativa.

**Tabla 7. Temas de revisión bibliográfica.**

Temas	Descripción	Referencia
Pacientes adultos con infecciones en sangre por <i>S.aureus</i>	44,7% MRSA 55,6% MSSA	Seas, C 2018
Prevalencia de bacteriemias por MSSA en pacientes adultos en Colombia	70% (70%-78%)	Arias CA; 2017 Seas, C 2018
Pruebas de detección del efecto inoculo a cefazolina en laboratorio clínico	No existen pruebas para detección de CzIE para laboratorio clínico, la prueba para sensibilidad a Cefazolina sería por Antibiograma.	CLSI, 2023
Mortalidad por bacteriemia, sepsis o infecciones de sangre en Colombia	30-40%	Castillo Londoño JS, 2011
Mortalidad por bacteriemia por MSSA en Colombia	30% (30-40%)	Karen M. Ordonez; 2019
Efectos adversos de la cefazolina y las Isoxazilpenicilinas	Nefrotoxicidad Oxacilina: 13% Cefazolina: 33%	Flynt LK,. 2017
	Fracaso terapéutico Oxacilina: 31,4% Cefazolina: 54,9%	. Miller MA,et al. 2020
	Anomalías Hepáticas Oxacilina: 30% Cefazolina: 2%	Youngster I et al. 2014
	Mortalidad a los 30 días Oxacilina:15% Cefazolina: 10%	McDanel. et al 2017

### 5.1.2.1 Estrategia de búsqueda

La búsqueda de información de estudios sobre la bacteriemia causada por SASM se realizó consultando las siguientes fuentes de información:

→Medline (PubMed), Cochrane Library (a través de la Biblioteca Cochrane Plus <http://www.update-software.com/clibplus/clibplus.asp>), LILACS (<https://lilacs.bvsalud.org/es/>)

→Las bases de datos del Centre for Reviews and Dissemination (<http://www.crd.york.ac.uk/CRDWeb/>) que incluye las bases de datos DARE (Database of Abstracts of Reviews of Effects), NHS EED (NHS Economic Evaluation Database), HTA (Health Technology Assessment) y la base de datos NIHR HTA (<http://www.disseminationcentre.nihr.ac.uk/>),

→Las páginas webs de cada una de las Agencias de Evaluación que forman parte de INAHTA (International Network of Agencies for Health Technology Assessment) (<http://www.inahta.org/ourmembers/members/>),

→La Biblioteca Virtual en Salud (<http://bvsalud.isciii.es/php/index.php>), con acceso a SciELO, LILACS, IBECs y MEDLINE.

→Sitios web de organizaciones como el CDC (<http://www.cdc.gov/hai/>), Centro Europeo del CDC (<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/hai/pages/default.aspx>) <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx> y su revista, la Eurosurveillance (<http://www.eurosurveillance.org/Default.aspx>).

→El Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas y Sepsis (GTEIS), la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

→Se buscó literatura gris: no convencional o informal como: Proyectos, tesis de posgrado, informes de investigación, memorias, actas de congresos, patentes, traducciones científicas, documentos de sociedades científicas, boletines, informes técnicos, programas de computación, autobiografías, weblogs, dossieres, encuestas y otros documentos fuera de los libros y las revistas seriadas.

→Se buscaron los costos de los medicamentos en el <https://www.minsalud.gov.co/salud/MT/Paginas/medicamentos-regulacion-precios.aspx>

→Science Citation Index y Scopus para identificar cualquier estudio adicional publicado, no publicado o en curso. Todo lo anterior con el objetivo de identificar otros posibles registros.

### 5.1.3 Estrategia PICO

La estrategia PICO permite especificar la población a estudiar, la intervención, la comparación de la intervención, la medida de resultado (161). Para este estudio la estrategia PICO se planteó de la siguiente manera:

**Tabla 7. Estrategia PICO**

Población	Pacientes con bacteriemia
Intervención	Detección de efecto inóculo a cefazolina con la prueba rápida
Comparador	Antibiograma
Outcomes (Resultados)	Costos hospitalarios, efectos adversos, morbilidad y mortalidad.

#### 5.1.4 Letalidad de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina (MSSA).

La letalidad es la proporción de personas que contraen una enfermedad y mueren a causa de la misma durante un período determinado. La letalidad se calculó como el número de muertes /el número de Casos x100.

##### 5.1.4.1 Número de muertes por bacteriemia en el país.

Para conocer el número de muertes se extrajo información del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) donde se registran todas las defunciones desde el año 1979 hasta 2022 (162). Se extrajo información de las defunciones no fetales de los años 2019-2022. Sin embargo los datos obtenidos estaban subestimados y no coincidían con los reportes de mortalidad de los diferentes estudios reportados (15,48,163–165). En los cuales se ha reportado en Latinoamérica una mortalidad alrededor del 18%, mientras que en los pocos estudios realizados en nuestro país se ha reportado entre el 30 al 40% (163,165). Sabiendo que existe un subregistro en el DANE se decidió imputar la mortalidad basados en la literatura con un 30% de mortalidad(165).

##### 5.1.4.2 Número de casos por bacteriemia.

Para conocer el número de casos por bacteriemia se utilizó El Registro Individual de Prestación de Servicios de Salud – RIPS de la secretaria de Salud, los CIE-10 incluidos fueron el A410-septicemia debida a *Staphylococcus aureus*, A411- septicemia debida a otro estafilococo especificado, A412- septicemia debida a estafilococo no especificado, A418 otras septicemias especificadas y A419 septicemia, no especificada, para disminuir el sesgo debido al subregistro (tabla 8). Una vez obtenido el número de casos de septicemia, se imputo que el 70% (87.851) de los casos serian causados por MSSA, debido a que es lo que esta reportado en la literatura(12,39).

**Tabla 8. Casos por septicemia CIE-10**

CIE-10	Número de Casos
A410	2.790
A411	1.277
A412	1.503
A418	18.397
A419	101.535
TOTAL	125.502

#### 5.1.5 Análisis de costos económicos

Para realzar el costo de la bacteriemia en Colombia, se realizó un esquema basal de como el costo de exámenes clínicos, exámenes microbiológicos, hospitalización y tratamiento antibiótico (Cefazolina y Oxacilina) de una bacteriemia no complicada (2 semanas), una bacteriemia recurrente (4-6 semanas) y un shock séptico (donde el paciente necesita entra a Unidad de Cuidados Intensivos). Este costeo se realizó teniendo en cuenta los precios regulados por el manual de tarifas" de la entidad promotora de salud del seguro social "EPS-ISS" de 2001(166) y con el manual tarifario de salud El Seguro Obligatorio de Accidentes de Tránsito (SOAT) con las tarifas actuales para el 2023(167) y se realizó con un incremento

tarifario al 30%, 50% 100% y 200% con el fin de realizar una estimación más real a lo que se paga en el sistema de salud por una enfermedad como la bacteriemia. Por otro lado, se realizó el costo de la prueba rápida incluyendo materiales, el tiempo del investigador y los servicios públicos.

### 5.1.6 Análisis de costo efectividad

El análisis de costo-efectividad ayuda a identificar oportunidades desatendidas al resaltar intervenciones que son relativamente económicas, pero que tienen el potencial de reducir sustancialmente la carga de la enfermedad. Este tipo de evaluaciones se pueden utilizar desde diferentes perspectivas y escenarios. Debido a los pocos datos reportados en Colombia a cerca de los casos de bacteriemias por MSSA, sus tratamientos y sus desenlaces como mortalidad y morbilidad en Colombia. En este estudio se tomaron datos de desenlaces clínicos reportados en el mundo y se realizó una aproximación del potencial impacto que tendría la prueba rápida de detección de efecto inoculo a cefazolina (CzIE) al ser implementada en los hospitales.

La Razón Incremental de Costo Efectividad (RICE) se evaluó por medio de la siguiente formula:

$$RICE = \frac{C_1 - C_0}{E_1 - E_0} = \frac{\Delta C}{\Delta E}$$

C<sub>1</sub>: Costo de la alternativa o intervención nueva

C<sub>0</sub>: Costo de la alternativa o intervención estándar

E<sub>1</sub>: Efectividad de la alternativa o intervención nueva

E<sub>0</sub>: Efectividad de la alternativa o intervención estándar

La RICE se evaluó en diferentes escenarios mencionados a continuación:

#### 5.1.6.1 El impacto en costos de la prueba rápida

Costo de intervención nueva (C <sub>1</sub> )	Costo de intervención estándar (C <sub>0</sub> )	Efectividad de la prueba rápida (E <sub>1</sub> )	Efectividad del antibiograma (E <sub>0</sub> )
Costo de hospitalización y tratamiento de bacteriemia con Cefazolina	Costo de hospitalización y tratamiento de bacteriemia con isoxazilpenicilinas	Casos correctamente diagnosticados por la prueba rápida para efecto inoculo a cefazolina en Colombia (159)	Casos correctamente diagnosticados por antibiograma para efecto inoculo a cefazolina (CzIE)

#### 5.1.6.2 Análisis de RICE de los costos del tratamiento con cefazolina Vs Isoxazilpenicilinas y la efectividad relacionada con diferentes desenlaces clínicos

Escenarios para análisis de RICE	Costo de intervención nueva (C <sub>1</sub> )	Costo de intervención estándar (C <sub>0</sub> )	Efecto adverso por tratamiento antibiótico	Efectividad de pacientes tratados con Cefazolina (E <sub>1</sub> )	Efectividad de pacientes tratados con Isoxazilpenicilinas (E <sub>0</sub> )
1			Nefrotoxicidad(28)	13%	33%

2	Costo de hospitalización y tratamiento de bacteriemia con Cefazolina	Costo de hospitalización y tratamiento de bacteriemia con isoxazilpenicilinas	Fracaso terapéutico (160)	31,4%	54,9%
3			Anomalías Hepáticas (28)	10%	15%
4			Mortalidad a los 30 días (22)	2%	30%

### 5.1.7 Árbol de decisiones

El árbol de decisiones se modeló contemplando el proceso de una bacteriemia, iniciando con los síntomas como estado mental alterado, frecuencia respiratoria elevada, 25 respiraciones por minuto o más, necesidad de oxígeno (40% o más) presión arterial sistólica de 90 mmHg o menos, ritmo cardíaco elevado: más de 130 latidos por minuto entre otros. Posteriormente se contempló el resultado del hemocultivo, en caso de un hemocultivo positivo, se procedería a identificar la bacteria en este caso, *S. aureus* y si es positivo para este microorganismo, se procedería a identificar la resistencia a meticilina, en caso de ser negativa su resistencia, se contempla la opción de realizar la prueba rápida a cefazolina y de allí se desencadenan los posibles escenarios (Anexo 3).

## 5.2 RESULTADOS

### 5.2.1 Letalidad de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina (MSSA).

La letalidad de la bacteriemia por MSSA dio como resultado 30%, lo que quiere decir que de los 87.851 casos de bacteriemias por MSSA, se mueren 26.355 personas (Tabla 10), este porcentaje es alto a los que se han reportado en el mundo, para esta infección en Australia por ejemplo se ha reportado una letalidad que oscila entre el 10% y el 30% (168), en Dinamarca oscila entre 20,7% y el 26,7% (169), y en Canadá está entre 19% -28% (170). Por lo cual es necesario poner la mirada y recursos en herramientas que sean valiosas para mitigar este alto porcentaje de muertes en una población.

**Tabla 9. Letalidad de bacteriemia por MSSA**

Número de muertes de bacteriemia por MSSA	Número de casos por bacteriemia por MSSA	Letalidad	
26.355	87.851	30%	

### 5.2.2 Análisis de costos económicos

Se realizó el análisis de costos económicos de una hospitalización por bacteriemia no complicada, bacteriemia persistente y Shock séptico. Cada escenario se analizó con tratamiento antibiótico, con oxacilina y con Cefazolina. Adicionalmente, el cálculo tarifario se realizó con él con el manual ISS 2001 y el Manual tarifario del SOAT al 30%,50%,100% y 200% con el fin de tener valores más reales de lo que cuesta este tratamiento en las instituciones hospitalarias en el país. La tabla 10 muestra los costos en pesos de una hospitalización según el ISS 2001 con tratamiento a oxacilina, donde se evidencia que una bacteriemia no complicada podría costar desde 7.344.355 COP hasta 46.269,437 COP, para una bacteriemia persistente el costo puede oscilar entre 25.667.353 hasta 77.002.058 COP y un shock séptico estaría entre 50.161.390 hasta 225.726 COP. Mientras que la tabla 11 se reportan los costos de hospitalización de los tipos de bacteriemia con tratamiento con

cefazolina, donde los valores disminuyen de manera importante en comparación con el tratamiento con oxacilina por ejemplo la bacteriemia no complicada oscila entre 3.444.375 COP hasta 21.699.563 COP, la bacteriemia persistente de 13.734.883 COP a 41.204.648 COP y un shock séptico 46.261.410 COP a 208.176.345 COP.

**Tabla 10. Costos de una bacteriemia según el ISS 2001 con tratamiento con Oxacilina**

Costos	Tratamiento con Oxacilina- ISS 2001				
	Plena	30%	50%	100%	200%
Hospitalización por Bacteriemia no complicada (2 semanas)	\$7.344.355	\$9.547.662	\$12.118.186	\$19.462.541	\$46.269.437
Hospitalización por Bacteriemia Persistente (4-6 semanas)	\$25.667.353	\$33.367.558	\$38.501.029	\$51.334.705	\$77.002.058
Hospitalización por Shock séptico	\$50.161.390	\$65.209.807	\$75.242.085	\$130.419.614	\$225.726.255

**Tabla 11. Costos de una bacteriemia según el ISS 2001 con tratamiento con Cefazolina**

Costos	Tratamiento con Cefazolina- ISS 2001				
	Plena	30%	50%	100%	200%
Hospitalización por Bacteriemia no complicada (2 semanas)	\$3.444.375	\$4.477.688	\$5.683.219	\$9.127.594	\$21.699.563
Hospitalización por Bacteriemia Persistente (4-6 semanas)	\$13.734.883	\$17.855.347	\$20.602.324	\$27.469.765	\$41.204.648
Hospitalización por Shock séptico	\$46.261.410	\$60.139.833	\$69.392.115	\$120.279.666	\$208.176.345

Por otro lado, al analizar los costos de los 3 escenarios de bacteriemias con el Manual del SOAT 2023, el costo aumenta dramáticamente con respecto al Manual ISS 2001, tanto en tratamiento con oxacilina como cefazolina. Con el manual del SOAT 2023, una bacteriemia no complicada tratada con oxacilina puede costar 18.440.680 COP hasta 67.308.482 COP, una bacteriemia persistente tratado con el mismo antibiótico su costo oscila entre 61.590.970 COP hasta 184.772.910 COP y un shock séptico entre 173.729.380 COP y 353.845.768 COP (tabla 12). Mientras que los costos con tratamiento con cefazolina se evidencian en la tabla 13 donde se puede observar que una bacteriemia no complicada podría tener un costo entre 14.540.700 COP y 53.073.555 COP, la bacteriemia persistente entre 49.658.500 COP y 148.975.500 COP y para shock séptico el valor varía entre 169.829.400 COP y 346.045.808 COP. Cabe resaltar que, dentro del análisis tarifario con el manual del SOAT, también se observó una diferencia en el costo de todos los escenarios

analizados entre oxacilina y cefazolina, mostrando que el tratamiento con cefazolina tiene un costo mucho menor que el tratamiento con oxacilina.

**Tabla 12. Costos de una bacteriemia según el SOAT en tratamiento con Oxacilina**

Costos	Tratamiento con Oxacilina- SOAT 2023				
	Pleno	30%	50%	100%	200%
Hospitalización por Bacteriemia no complicada (2 semanas)	\$18.440.680	\$23.972.884	\$30.427.122	\$48.867.802	\$67.308.482
Hospitalización por Bacteriemia Persistente (4-6 semanas)	\$61.590.970	\$80.068.261	\$92.386.455	\$123.181.940	\$184.772.910
Hospitalización por Shock séptico	\$173.729.380	\$225.848.194	\$227.125.594	\$347.458.764	\$353.845.768

**Tabla 13. Costos de una bacteriemia según el SOAT en tratamiento con Cefazolina**

Costos	Tratamiento con Cefazolina- SOAT 2023				
	Pleno	30%	50%	100%	200%
Hospitalización por Bacteriemia no complicada (2 semanas)	\$14.540.700	\$18.902.910	\$23.992.155	\$38.532.855	\$53.073.555
Hospitalización por Bacteriemia Persistente (4-6 semanas)	\$49.658.500	\$64.556.050	\$74.487.750	\$99.317.000	\$148.975.500
Hospitalización por Shock séptico	\$169.829.400	\$220.778.220	\$222.055.620	\$339.658.804	\$346.045.808

### 5.2.3 Costo de la prueba rápida para efecto Inoculo a Cefazolina y del antibiograma convencional.

Para la descripción de los costos económicos de la prueba rápida se estimaron los valores de cada uno de los materiales, el tiempo del investigador y 30% de gastos administrativos (servicios públicos, uso de equipos y trámite administrativo), se estimó el valor para un cultivo junto con los dos controles de calidad (TX0017 control positivo y la ATCC29213 control negativo) (159) y el total de la prueba es de \$156.335 (Tabla 14). Por otro lado, y se revisó el valor en pesos del antibiograma estándar en el ISS y el SOAT y se tarifo a los porcentajes plateados en la metodología (Tabla 15). Esta prueba microbiología según el manual ISS podría costar entre \$16.410 y \$49.230 mientras que por el manual del SOAT su valor aumenta oscilando entre \$40.200 y \$120.600.

**Tabla 14. Costos de la Prueba rápida para la detección de CzIE**

Descripción	Costo (COP)
Materiales	\$32.897
Tiempo del Investigador	\$87.360
Gastos administrativos	\$36.077
TOTAL	\$156.335

**Tabla 15. Costos del antibiograma**

Costos Antibiograma	Descripción				
	Plena	30%	50%	100%	200%
ISS 2001	\$16.410	\$ 21.333	\$24.615	\$32.820	\$49.230
SOAT- 2023	\$40.200	\$52.260	\$60.300	\$80.400	\$120.600

#### 5.2.4 Análisis de costo efectividad

##### 5.2.4.1 Razón Incremental de costo efectividad (RICE)

Se realizó el RICE con los costos de la prueba rápida ( $C_1$ ) vs el antibiograma ( $C_0$ ) y la efectividad de la prueba rápida se estimó con los casos correctamente diagnosticados tomando el valor predictivo positivo (VPP) para Colombia que fue del 86% ( $E_1$ ) (159), y se comparó con la única prueba de susceptibilidad en el hospital que es el antibiograma ( $E_0$ ) con 0% de detecciones para CzIE (Tabla 16). Se obtuvo que por los 87.851 casos con bacteriemia por MSSA diagnosticados por la prueba rápida le cuesta al sistema de salud con un ISS- 2001-30% COP 137.468.141 (Tabla 16), lo cual es un valor muy bajo para la cantidad de pacientes que tendrían la posibilidad de tener un tratamiento direccionado y oportuno para reducir la posibilidad de malos desenlaces clínicos, que terminan en disminución de la esperanza y calidad de vida de los pacientes.

**Tabla 16. RICE Prueba rápida CzIE vs Antibiograma**

Descripción	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C / \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
ISS-2001					
Pleno	\$39.465	86	\$459	\$40.185.925	8.814
30%	\$135.002	86	\$1.570	\$137.468.141	30.151
50%	\$131.720	86	\$1.532	\$134.126.187	29.418
100%	\$123.515	86	\$1.436	\$125.771.303	27.585
200%	\$107.105	86	\$1.245	\$109.061.534	23.920

Tasa del dólar 4.559,25 pesos

Por otro lado, cuando se realizó el RICE de los costos de hospitalización de bacteriemia vs la prueba rápida y se encontró al implementar esta nueva tecnología para el sistema de salud dependiendo del tarifario puede tener un ahorro de hasta de COP 25.018.702.745 para una bacteriemia no complicada (Tabla 17), COP 36.451.337.106 (Tabla 18) para una bacteriemia persistente y COP 88.103.018.109 para shock séptico (Tabla 19).

**Tabla 17. Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs la prueba rápida CzIE**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	-3.899.980	86	-45.349	-3.971.222.658	-871.025
30%	-5.069.974	86	-58.953	-5.162.589.455	-1.132.333
50%	-6.434.967	86	-74.825	-6.552.517.386	-1.437.191
100%	-10.334.947	86	-120.174	-10.523.740.043	-2.308.217
200%	-24.569.874	86	-285.696	-25.018.702.745	-5.487.460

**Tabla 18. Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs la prueba rápida CzIE**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	-11.932.470	86	-138.750	-12.150.445.702	-2.665.009
30%	-15.512.211	86	-180.375	-15.795.579.413	-3.464.512
50%	-17.898.705	86	-208.124	-18.225.668.553	-3.997.514
100%	-23.864.940	86	-277.499	-24.300.891.404	-5.330.019
200%	-35.797.410	86	-416.249	-36.451.337.106	-7.995.029

**Tabla 19. Costos de hospitalización por shock séptico vs la prueba rápida CzIE**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valores en dólares USD
Pleno	-11.699.940	86	-136.046	-19.578.448.469	-4.294.225
30%	-15.209.922	86	-176.860	-25.451.983.009	-5.582.493
50%	-17.549.910	86	-204.069	-29.367.672.703	-6.441.338
100%	-30.419.844	86	-353.719	-50.903.966.019	-11.164.986
200%	-52.649.730	86	-612.206	-88.103.018.109	-19.324.015

Sin embargo, el impacto de la prueba rápida a CzIE, no está en su costo neto sino en los desenlaces clínicos cuando un paciente con bacteriemia por MSSA tiene la posibilidad de ser tratado con Cefazolina. El RICE para todos los desenlaces clínicos se analizó desde los tres los escenarios planteados en este trabajo (Bacteriemia no complicada, bacteriemia persistente y shock séptico) y con los diferentes porcentajes tarifados. Se realizó el análisis con los valores del ISS-2001 como representación porque en proporciones de los valores para el RICE da el mismo resultado.

#### **5.2.4.2 RICE eventos adversos de Isoxazolpenicilinas vs Cefazolina**

##### *Nefrotoxicidad*

La lesión renal puede ser fatal y requiere de tratamiento intensivo, se ha planteado que esta enfermedad es un problema de salud pública debido a que no se diagnostica o se trata a tiempo, además de los altos costos que genera al sistema de salud y lo más grave puede causar hasta la muerte, incluso han reportado que la lesión renal adquirida en el hospital tuvo una mortalidad global del 47.3% (171–173). Flyn y Col, reportaron que cuando los pacientes con bacteriemia por MSSA son tratados con isoxazolpenicilinas el 33% generan Nefrotoxicidad mientras que, si son tratados con Cefazolina solo el 13%, lo cual traducido en costos indica que el sistema de salud si usa cefazolina como terapia final, se ahorraría

en una bacteriemia no complicada hasta COP 107.580.421.803 (Tabla 20), Bacteriemia persistente COP156.740.749.556 (Tabla 21) y por shock séptico COP 378.842.977.870 (Tabla 22).

**Tabla 20. Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Nefrotoxicidad**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	3.899.980	-20	-194.999	-17.076.257.429	-3.745.409
30%	5.069.974	-20	-253.499	-22.199.134.658	-4.869.032
50%	6.434.967	-20	-321.748	-28.175.824.758	-6.179.925
100%	10.334.947	-20	-516.747	-45.252.082.187	-9.925.334
200%	24.569.874	-20	-1.228.494	-107.580.421.803	-23.596.078

**Tabla 21. Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Nefrotoxicidad**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.932.470	-20	-596.624	-52.246.916.519	-11.459.541
30%	15.512.211	-20	-775.611	-67.920.991.474	-14.897.404
50%	17.898.705	-20	-894.935	-78.370.374.778	-17.189.312
100%	23.864.940	-20	-1.193.247	-104.493.833.037	-22.919.083
200%	35.797.410	-20	-1.789.871	-156.740.749.556	-34.378.625

**Tabla 22. Costos de hospitalización por shock séptico vs Nefrotoxicidad**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.699.940	-20	-584.997	-84.187.328.415	-18.465.170
30%	15.209.922	-20	-760.496	-109.443.526.940	-24.004.722
50%	17.549.910	-20	-877.496	-126.280.992.623	-27.697.756
100%	30.419.844	-20	-1.520.992	-218.887.053.880	-48.009.443
200%	52.649.730	-20	-2.632.487	-378.842.977.870	-83.093.267

#### *Fallas de tratamiento antibiótico isoxazilpenicilinas vs Cefazolina*

Las fallas de tratamiento antibiótico son un real problema para el sistema de salud, debido a que implican aumento de estancia hospitalaria, cambio de tratamiento antibiótico, aumento de morbilidades y aumento de costos hospitalarios(132). Para hacer el análisis de este desenlace clínico, se tomó como referencia un estudio donde los pacientes con bacteriemia tratados con isoxazilpenicilinas presentaron un fracaso terapéutico del 51,9% y los tratados con cefazolina un 31.4%, las razones del cambio terapéutico incluyeron: toxicidad, facilidad de administración y terapia ampliada para sospechas de infecciones secundarias durante el ingreso (160). El RICE realizado arrojó que si la cefazolina se recupera como antibiótico de primera elección utilizando la prueba rápida a Cefazolina para tratamiento de la bacteriemia se evitarían 20,5% de fallas de tratamiento y disminuirán los costos en COP 104.956.509.076 para bacteriemia no complicada (Tabla 23), COP152.917.804.444 para bacteriemia persistente (Tabla 24) y COP 224.906.805.162 para Shock séptico (Tabla 25).

**Tabla 23. Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Falla de tratamiento**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares
Pleno	3.899.980	-20,5	-190.243	-16.659.763.345	-3.654.058
30%	5.069.974	-20,5	-247.316	-21.657.692.349	-4.750.275
50%	6.434.967	-20,5	-313.901	-27.488.609.520	-6.029.195
100%	10.334.947	-20,5	-504.144	-44.148.372.865	-9.683.253
200%	24.569.874	-20,5	-1.198.530	-104.956.509.076	-23.020.565

**Tabla 24. Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Falla de tratamiento**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.932.470	-20,5	-582.072	-50.972.601.481	-11.180.041
30%	15.512.211	-20,5	-756.693	-66.264.381.926	-14.534.053
50%	17.898.705	-20,5	-873.108	-76.458.902.222	-16.770.061
100%	23.864.940	-20,5	-1.164.143	-101.945.202.963	-22.360.082
200%	35.797.410	-20,5	-1.746.215	-152.917.804.444	-33.540.123

**Tabla 25. Costos de hospitalización por shock séptico vs Falla de tratamiento**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.699.940	-20,5	-570.729	-49.979.290.036	-10.962.174
30%	15.209.922	-20,5	-741.947	-64.973.077.047	-14.250.826
50%	17.549.910	-20,5	-856.093	-74.968.935.054	-16.443.260
100%	30.419.844	-20,5	-1.483.895	-129.946.154.094	-28.501.651
200%	52.649.730	-20,5	-2.568.280	-224.906.805.162	-49.329.781

#### *Enfermedad hepática*

La sepsis y la respuesta inflamatoria tienen una importante función en el desarrollo de la hepatitis hipóxica o isquémica debida a la presencia de «disoxia» hepática y a la alteración de la función respiratoria de las células hepáticas, La insuficiencia cardíaca, la insuficiencia respiratoria y el shock séptico son responsables de más de un 90 % de los casos de hepatitis hipóxica(174). A pesar de que las enfermedades hepáticas no causan muerte si hacen el que paciente pierda calidad de vida e se incurre en costos hospitalarios para su tratamiento (175). Youngester y col. Reportaron que pacientes con bacteriemia por MSSA tratados con cefazolina tan solo el 2% presento enfermedad hepática mientras que los tratados con isoxazilpenicilinas fue del 30% (28). Según el análisis realizado si se usa cefazolina podrán disminuir los costos hospitalarios relacionados bacteriemia y falla hepática en COP 76.843.158.431 en una bacteriemia no complicada (tabla 26), COP 111.957.678.254 en una bacteriemia persistente (Tabla 27) y COP 164.663.910.923. (Tabla 28)

**Tabla 26. Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Enfermedades hepáticas**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares
Pleno	3.899.980	-28	-139.285	-12.197.326.735	-2.675.292

30%	5.069.974	-28	-181.071	-15.856.524.756	-3.477.880
50%	6.434.967	-28	-229.820	-20.125.589.113	-4.414.232
100%	10.334.947	-28	-369.105	-32.322.915.848	-7.089.525
200%	24.569.874	-28	-877.496	-76.843.158.431	- 16.854.342

**Tabla 27. Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Enfermedades hepáticas**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares
Pleno	11.932.470	-28	-426.160	-37.319.226.085	-8.185.387
30%	15.512.211	-28	-554.008	-48.514.993.910	-10.641.003
50%	17.898.705	-28	-639.239	-55.978.839.127	-12.278.081
100%	23.864.940	-28	-852.319	-74.638.452.169	-16.370.774
200%	35.797.410	-28	-1.278.479	-111.957.678.254	-24.556.161

**Tabla 28. Costos de hospitalización por shock séptico vs Enfermedades hepáticas**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.699.940	-28	-417.855	-36.591.980.205	-8.025.877
30%	15.209.922	-28	-543.212	-47.569.574.267	-10.433.640
50%	17.549.910	-28	-626.783	-54.887.970.308	-12.038.816
100%	30.419.844	-28	-1.086.423	-95.139.148.533	-20.867.280
200%	52.649.730	-28	-1.880.348	-164.663.910.923	-36.116.447

#### *Mortalidad a los 30 días*

La bacteriemia es una de las enfermedades que más causan altas tasas de mortalidad entre el 35-40% (41,176). Se ha reportado que el tratamiento con isoxazilpenicilinas causa un 15% de muertes a los 30 días, mientras Cefazolina un 10%(19). El uso de cefazolina no solo evitaría un 5% menos de muertes, (que no es un porcentaje menos importante cuando se trata de mantener la vida de los pacientes). sino que adicionalmente el sistema de salud lograría un ahorro de COP 430.321.687.211 por una bacteriemia no complicada (Tabla 29), para una bacteriemia persistente COP 626.962.998.222 (Tabla 30) y por un shock séptico COP 922.117.901.166 (Tabla 31)

**Tabla 29. Costos de hospitalización de bacteriemia no complicada vs Mortalidad a los 30 días**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	3.899.980	-5	-779.996	-68.305.029.716	-14.981.637
30%	5.069.974	-5	-1.013.995	-88.796.538.631	-19.476.128
50%	6.434.967	-5	-1.286.993	-112.703.299.031	-24.719.701
100%	10.334.947	-5	-2.066.989	-181.008.328.747	-39.701.339
200%	24.569.874	-5	-4.913.975	-430.321.687.211	-94.384.315

**Tabla 30. Costos de hospitalización de bacteriemia persistente vs Mortalidad a los 30 días**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	11.932.470	-5	-2.386.494	-208.987.666.074	-45.838.168
30%	15.512.211	-5	-3.102.442	-271.683.965.896	-59.589.618
50%	17.898.705	-5	-3.579.741	-313.481.499.111	-68.757.252
100%	23.864.940	-5	-4.772.988	-417.975.332.148	-91.676.335
200%	35.797.410	-5	-7.159.482	-626.962.998.222	-137.514.503

**Tabla 31. Costos de hospitalización por shock séptico vs Mortalidad a los 30 días**

Descripción ISS-2001	$\Delta C$	$\Delta E$	$\Delta C/ \Delta E$	C/E x Número de casos	Valor en dólares USD
Pleno	-11.699.940	-5	-2.339.988	-204.915.089.148	-44.944.912
30%	-15.209.922	-5	-3.041.984	-266.389.615.892	-58.428.385
50%	-17.549.910	-5	-3.509.982	-307.372.633.722	-67.417.368
100%	-30.419.844	-5	-6.083.969	-532.779.231.785	-116.856.771
200%	-52.649.730	-5	-10.529.946	-922.117.901.166	-202.252.103

### 5.2.5 Árbol de decisiones

En el árbol de decisiones se puede apreciar la descripción de la toma de decisiones en caso de tener un paciente con síntomas de posible bacteriemia y que desenlaces clínicos se podrían dar si se introduce la prueba rápida como alternativa para conocer el CzIE en los MSSA y cada decisión como influiría la disminución de efectos adversos, y en el ahorro en pesos para el sistema de salud cada vez que un paciente tiene menor probabilidad de generar comorbilidades y mayor posibilidad de tener calidad de vida (Anexo 3).

## 5.5 DISCUSIÓN

La evaluación económica permite la gestión integral de los recursos, analizar los procesos y los costos incurridos para desarrollar una determinada intervención sanitaria, evaluar la relación de coste-efectividad de los resultados de las acciones según su impacto, es decir, la obtención de un beneficio sostenido en términos de salud sobre la morbilidad y mortalidad de la población, en función de los costes asociados para lograr determinada acción(177). Estas evaluaciones económicas se hacen necesarias para relacionar los costos con las actividades de vigilancia en salud y sus los recursos que son limitados, por tanto, es importante disponer de estudios que permitan ver la forma de asignar recursos que permitan maximizar la salud(178).

La bacteriemia causada por *Staphylococcus aureus* en nuestro país afecta a más de 100.000 personas, se ha reportado que el 78% de esta infección es causada por MSSA y genera al alrededor de 26.000 muertes (12,39,44,179). La letalidad de esta es del 30%, lo cual hace que esta enfermedad este en el foco del sistema de salud buscando alternativas para mejorar su tratamiento y disminuir morbilidad y mortalidad. Cefazolina es un antibiótico que se usa para tratar las bacteriemias por MSSA tiene buena tolerabilidad, bajos efectos adversos, menor costo y menor mortalidad en comparación con las isoxazilpenicilinas (19,26,160,180). Sin embargo, el efecto inoculo a cefazolina a amenaza la eficacia de este antibiótico. En este capítulo se realizó una estimación de la costó-efectividad de una prueba rápida para detección del efecto inoculo a cefazolina, con el fin de recuperar la cefazolina como antibiótico de uso para infecciones de alto inoculo como bacteriemia, endocarditis, osteomielitis causadas por MSSA, (19,26,). Se ha reportado en Estados Unidos que los

costos directos hospitalarios por bacteriemia causada por MSSA puede llegar hasta los 40.725 USD (181), otros estudios reportan valores de 123.065 USD en 84 casos con bacteriemia sin incluir el tratamiento con antimicrobianos que fue de 119.210 USD (182). Los análisis de costos de la bacteriemia no complicada, complicada y shock séptico, se realizaron con los precios del Manual de ISS-2001 y El Manual del SOAT 2023 (con tratamiento a oxacilina o cefazolina) se tarifaron diferentes porcentajes para tener una aproximación en diferentes escenarios de cuanto podría ser el valor de esta infección en un hospital del país. Según el ISS-2001 el costo de bacteriemia no complicada hasta shock séptico con tratamiento a oxacilina oscila entre COP 46.269.437 y COP 225.726.255 en su tarifa más alta (Tabla 10). Y con el SOAT 2023 oscila entre COP 67.308.482 y COP 353.845.768 (Tabla 12); Mientras que con el tratamiento a cefazolina el ISS-2001 el costo oscila entre COP 21.699.563 Y COP 208.176.345 en su tarifa más alta (tabla 12) y con el SOAT 2023 COP 53.073.555 y COP 346.045.808(Tabla 14). En las dos alternativas tarifarias cefazolina presenta un menor costo que la oxacilina, lo que es consistente con la literatura donde se ha reportado que para tratamiento de una bacteriemia por MSSA el costo de las isoxazilpenicilinas por día es de 162 USD, mientras que el de cefazolina es de 8 USD por día y realizando el calcula de un promedio de 20 días de estancia hospitalaria el costo de la isoxazilpenicilina fue de 3400 USD y con cefazolina de 166 USD (26). En otro estudio en una clínica ambulatoria, que trata aproximadamente a 100 pacientes al año con cefazolina y/o nafcilina durante una mediana de 28 días, indicaron el costo económico de los 100 pacientes si fueran todos tratados con nafcilina el costo ascendería a \$475 776 frente a \$73 584 por 100 pacientes tratados con cefazolina: un ahorro potencial de \$402 192 por año (28).

Por otro lado se realizó el coste del valor de la prueba rápida a cefazolina para una muestra con dos controles de calidad y el valor es de COP156.335 (Tabla 14) y también se buscó el valor del comparador que es el antibiograma por los manuales tarifarios ISS-2001(166) y SOAT 2023 (167)(Tabla 16). Se realizó el RICE de la prueba rápida vs el antibiograma y arrojó un aumento incremental por cada paciente 1.245-1.570 COP, es decir que el sistema de salud tendría que invertir COP entre 40.185.925 a 109.061.534 para 87.851 casos de bacteriemia por MSSA. Aparentemente el costo de la prueba es bajo por paciente y no habría diferencia entre implementarla o no. Pero el RICE cuando se analizaron los costos de tratamiento a una bacteriemia al implementar la prueba rápida, sugirió que el sistema de salud por utilizar cefazolina lograría ahorrar en costo de hospitalización en bacteriemia no complicada, complicada y shock séptico entre COP 25.018.702.745, hasta COP 88.103.018.109. Sin embargo, el verdadero impacto económico no solo es evidente cuando la prueba rápida permite usar cefazolina, sino que también se ve reflejado en la disminución de efectos adversos y por ende los costos económicos de tratamiento por estos eventos.

La cefazolina no solamente es más económica que las isoxazilpenicilinas, sino que también tiene mejor tolerabilidad, genera menos eventos adversos como la nefrotoxicidad, las anomalías hepáticas, además causa menos fracaso terapéutico por toxicidad, facilidad de administración y terapia ampliada para sospechas de infecciones secundarias durante el ingreso y menor mortalidad(19,26,71,160). A partir de los datos de los desenlaces mencionadas anteriormente y con los costos de la infección de bacteriemia con oxacilina vs Cefazolina se quiso hacer el análisis de la Razón Incremental de costo efectividad para cada uno de ellos. Cuando los pacientes con bacteriemia por MSSA son tratados con cefazolina tiene menor probabilidad de tener nefrotoxicidad en comparación con isoxazilpenicilinas, lo cual según los resultados de este estudio con el RICE el costo de ahorro al tener menor nefrotoxicidad varían entre COP 107.580.421.803 a COP 378.842.977.870 para los casos con bacteriemias, por fallas de tratamiento el ahorro oscila

entre COP 104.956.509.076 y COP 224.906.805.162, en enfermedades hepáticas entre 76.843.158.431 a 164.663.910.923. y en mortalidad a los 30 días el ahorro esta entre COP 430.321.687.211- COP 922.117.901.166.

Esta estimación de costo efectividad de la prueba rápida y su implementación como impacta en la recuperación de cefazolina permitiendo disminución de los efectos adversos y el ahorro que implica para el sistema de salud, es muy valioso debido a que el CzIE es un mecanismo de resistencia que se ha reportado en diferentes partes del mundo. En Estados Unidos se ha reportado que es del 29,8%(89), En Corea del Sur varios estudios reportan CzIE entre el 11% y 57% (50,95,131,147,183) , Japón ha reportado 57% de CzIE (133) Argentina tiene el 54% de CzIE y es un país donde las isoxazilpenicilinas no están disponibles y solo se usa cefazolina como antibiótico de primera línea para infecciones profundas por MSSA (39), En el capítulo I se realizó la prevalencia en 9 países de Latinoamérica y se reportó el 40% de este CzIE. Lo que indica que esta prueba diagnóstica no solo sería útil para nuestro país sino para todos aquellos que presentan este fenotipo de resistencia como los es el CzIE.

Es importante resaltar que esta estimación de costo efectividad, tiene sesgos y limitaciones, los casos de bacteriemias y las defunciones por las mismas están subestimadas posiblemente por subregistro de las entidades (162,179), por esto para las defunciones se tomó un porcentaje de mortalidad de la literatura(163,165). Por otro lado, los costos evaluados de hospitalización se realizaron contemplando un panorama general de una bacteriemia no complicada, persistente y shock séptico y tomando tiempos de estadía hospitalaria estándar reportadas en la literatura (184), es claro que cada paciente tiene un proceso de enfermedad diferente y los costos pueden variar de un paciente a otro. Los precios de la cefazolina y la oxacilina no están completamente regulados en el país, es posible que los valores puedan diferir, pero la cefazolina sigue siendo mucho más económica que las isoxazilpenicilinas. Adicionalmente este estudio se realizó solo para bacteriemia causada por MSSA y se ha reportado que otras enfermedades con alto inoculo bacteriano como Osteomielitis presentan hasta un 60% de CzIE (40). Si se incluyen todas las enfermedades de alto inoculo bacteriano causadas por MSSA, posiblemente aumentará el costo de la prueba rápida a alto inoculo a cefazolina y se aumentará el ahorro para el sistema de salud. Los costos de las bacteriemias deben ser más altos de los estimados en este estudio debido a que solo se contemplaron costos directos y se omitieron los indirectos que están relacionados con el paciente y su entorno.

## **5.6 CONCLUSIONES**

El análisis de costo-efectividad demostró que la implementación de la prueba rápida a cefazolina es de un bajo costo por paciente y que su impacto más directo esta la recuperación de la cefazolina como antibiótico de primera línea y esto conlleva a que se disminuyan los efectos adversos en los pacientes, los costos de tratamiento y la mortalidad a los 30 días, lo cual se desencadena en un ahorro para el sistema de salud nacional de miles de millones de pesos, que podrán ser destinados a otras enfermedades que son un problema de salud pública.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza para la medicina moderna y para la sostenibilidad de la respuesta eficaz de la salud pública mundial ante la amenaza constante de las enfermedades infecciosas. Los medicamentos efectivos son esenciales para las medidas preventivas y los tratamientos, protegiendo a los pacientes de enfermedades potencialmente mortales y asegurando que los procedimientos complejos como la cirugía y la quimioterapia entre otras se puedan realizar con bajo riesgo. Sin embargo, el uso indiscriminado de los medicamentos pone riesgo al mundo sin excluir a ningún país, pues hay muy pocos productos de reemplazo en la etapa de investigación y desarrollo. Ni tampoco existe una acción global inmediata y concertada. Esta problemática amenaza con entrar al planeta en una era posantibiótica donde las infecciones comunes podrían volver a ser mortales(185).

La organización Mundial de la Salud adoptó un plan acción para tratar de mitigar la crisis de la RAM en el mundo, planteándose 5 objetivos: 1. mejorar la concienciación y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos a través de una comunicación, educación y formación efectivas; 2. reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación; 3. reducir la incidencia de las infecciones con medidas eficaces de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones; 4. utilizar de forma óptima los medicamentos antimicrobianos en la salud humana y animal; 5. Preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, y aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones (185).

Esta investigación contribuye a reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación; conocer a detalle el comportamiento de los microorganismos y sus características evolutivas y de resistencia, es por ello que caracterizar el efecto inoculo a cefazolina (CzIE) en aislamientos de MSSA causante de bacteriemia de 9 países de Latino América permite vigilar la prevalencia de CzIE en estas regiones. Es de resaltar que todos los países evaluados presentaron una presencia de CzIE no menor del 30%, siendo el mayor Argentina con un 54% (39). En Ecuador y Colombia presentaron un CzIE del 42% y 40% respectivamente, lo cual es consistente con reportes anteriores realizados del CzIE en estos países respectivamente (40), estos son porcentaje realmente alarmantes teniendo en cuenta que es un mecanismo que no se detecta por métodos de rutina clínica, para empeorar la situación en infecciones como osteomielitis se ha reportado en Colombia un 60% CzIE y en un estudio de niños con osteomielitis aguda en Estados Unidos se reportó 14.4% de CzIE y se asociaron con el desarrollo de osteomielitis crónica (57).

De la misma manera, se caracterizaron los aislamientos de MSSA que presentaron efecto inoculo a cefazolina (CzIE) encontrando el 78% tuvieron BlaZ-A y 53% BlaZ-C. y los MSSA que no presentaron CzIE se asociaron con BlaZ-B con 90% y BlaZ-C con 47% (Tabla 5). Por otro lado, se propuso una nueva clasificación de las betalactamasas basadas en el CzIE, por medio de alotipos los cuales incluyeron un análisis de la betalactamasa completa incluido el péptido señal y esta clasificación evidenció 3 cambios de aminoácidos significativos, que podrían estar involucrados de forma crítica en la generación del efecto inoculo.

Sin embargo, en los experimentos del capítulo I se presentaron varias limitaciones. Primero, no se investigaron los perfiles cinéticos de los diferentes alotipos de betalactamasas. Además, aunque los valores de CIM son importantes desde un punto de vista clínico, en este trabajo se utilizó CIM de cefazolina como sustituto de las características cinéticas de las betalactamasas. Por lo tanto, para establecer si la clasificación de alotipos de BlaZ podría correlacionarse con la CzIE y predecir el fenotipo en aislamientos clínicos de *S. aureus*, sería necesario realizar un análisis enzimático. En segundo lugar, se evaluaron solo aislamientos recolectados de infecciones del torrente sanguíneo. Por lo tanto, nuestros hallazgos pueden no ser aplicables a MSSA recuperados de otras fuentes (es decir, abscesos profundos, osteomielitis, neumonía, endocarditis y otras infecciones con altas cargas bacterianas). Finalmente, los resultados clínicos no estaban disponibles para el análisis y, por lo tanto, la correlación con fenotipos clínicamente relevantes sería de suma importancia en futuras investigaciones.

Por otro lado, y contribuyendo nuevamente a él plan de resistencia antimicrobiana de la OMS. En la preparación de nuevos medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones (185). Se postulo una prueba diagnóstica rápida para la detección del efecto inoculo a cefazolina (CzIE), lo cual es un desarrollo valioso para la ciencia, la clínica humana y la salud pública. Debido a que este fenómeno que por años ha pasado desapercibido y posiblemente ha generado mayores estancias hospitalarias, más comorbilidades y fallas terapéuticas en infecciones con alto inoculo bacteriano como bacteriemia, osteomielitis, endocarditis y abscesos entre otras(32,39,55).

Esta prueba se validó utilizando 689 aislamientos de MSSA del torrente sanguíneo recuperados de Latino América y EE.UU con una sensibilidad y especificidad global de 82,5% y 88,9%, respectivamente. La sensibilidad en los aislados de MSSA que albergaban BlaZ tipo A (la enzima más eficaz contra la cefazolina) fue del 92,7 % con una especificidad del 87,8 %. El rendimiento de la prueba fue menor frente a las enzimas tipo B y C (sensibilidades del 53,3 % y 72,3 %, respectivamente) y el resultado se obtiene en 2 a 3 horas, mientras que la prueba estándar de oro para detección de CzIE se puede demorar hasta 4 días y diferencia de la determinación de la CIM con inóculo alto, la prueba rápida es económica, factible y fácil de realizar. Después de pequeños pasos de validación, podría incorporarse al flujo de trabajo de laboratorio clínico de rutina.

A pesar de este importante aporte a la salud pública como lo es la prueba rápida, este estudio del capítulo II presentó varias limitaciones. En primer lugar, los aislamientos incluidos en la cohorte son principalmente de Latino América (93%) y, por lo tanto, las medidas de rendimiento de la prueba podrían variar cuando se aplican a aislamientos de otras ubicaciones geográficas, ya que la probabilidad previa a la prueba estaría influenciada por la prevalencia de la prueba. CzIE en cada región. En segundo lugar, la prueba se desarrolló en un laboratorio de investigación y es necesario validar el rendimiento de la prueba en el mundo real. En tercer lugar, en esta cohorte solo se incluyeron los aislamientos que causan infecciones del torrente sanguíneo, y no está claro si los resultados se aplicarían a los aislamientos recuperados de otras infecciones. Concluyendo, y como ocurrió en la parte I de esta investigación no fue posible evaluar los resultados clínicos debido a la falta de información confiable en todos los pacientes.

Finalmente, para la salud pública las evaluaciones económicas, tan tomado relevancia al momento de tomar decisiones para optimizar recursos económicos y al mismo tiempo disminuir la letalidad de las infecciones y mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes(106). Para completar esta investigación el estudio económico de costo

efectividad de la prueba rápida y las implicaciones que tendría poderla tener en el ámbito clínico. En primer lugar, logró mostrar que las tarifas del manual SOAT son dramáticamente más altas que las del ISS 2001, es tal la diferencia que mientras una bacteriemia no complicada por el ISS en su tarifa más alta podría llegar a costar 225.726.255 COP (Tabla 10) , por el SOAT aumenta casi 100.000.000 COP más con un valor de 353.845.768 COP (Tabla 12). Esto se debe a que el ISS 2001 desde su creación no ha sido actualizado y sin embargo hay muchas entidades hospitalarias que negocian con este manual, mientras que el SOAT es actualizado anualmente y a pesar que fue un manual diseñado para accidentes de tránsito, es muy completo y también se emplea para negociar en instituciones hospitalarias. En segunda instancia al calcular la Razón de costo Incremental de Costo Efectividad (RICE) entre la prueba rápida y el antibiograma se estimó que el sistema de salud le costaría 134.126.187 COP para implementar la prueba rápida a 87.851 casos de bacteriemia por MSSA. Al lograr por medio de la prueba rápida a CzIE recuperar la cefazolina como terapia definitiva, no solo disminuirá los costos en hospitalización con respecto al tratamiento con oxacilina hasta en 88.103.018.109 COP ( Tablas 18-20), sino que también se disminuirá el porcentaje de efectos adversos y a su vez los costos que generan estos efectos por el tratamiento con isoxazilpenicilinas. Eventos adversos como la nefrotoxicidad podrían disminuir hasta un 20% con un ahorro al sistema de salud de hasta 378.842.977.870 COP ( Tablas 21-23) y la mortalidad a 30 días hasta un 5% con un ahorro hasta de hasta 922.117.901.166 COP (tablas 24-26).

Y con esto incluyendo la calidad de vida que podría aumentar en los pacientes evitando las comorbilidades y disminuyendo la letalidad de la infección que es del 30%. Realmente esta herramienta diagnostica permitirá recuperar la cefazolina un antibiótico que además de económico tiene muchas ventajas para el personal de salud y para el paciente.

En este estudio de costo efectividad se presentaron sesgos de clasificación . En primer lugar, debido a que los casos por bacteriemia no estuvieron bien definidos en el CIE-10 cuando se quiso atribuir una muerte por bacteriemia por *S.aureus* muertes fue posible, por tal motivo se imputaron datos, tomando la mortalidad por literatura. En segundo lugar, El subregistro de datos en el RIPS en los CIE-10 correspondiente a Sepsis por *S.aureus*, impidió dar un número exacto de datos, por lo que se decidió incluir las bacteriemias causadas por *Staphylococcus* spp y no especificadas e imputar la prevalencia de las causadas por MSSA según lo reportado en la literatura. En tercer lugar, los análisis de los efectos adversos se realizaron desde datos de la literatura. Y por último se realizó el análisis para una sola infección, lo cual nos impide saber cómo sería el análisis con otras infecciones de alto inculo bacteriano.

El objetivo más importante es para la salud pública garantizar de forma íntegra, la salud de la población mediante acciones dirigidas tanto de forma individual como colectiva y los resultados de estas acciones se constituyen en indicadores de las condiciones de vida, bienestar y desarrollo integral. La prueba rápida a cefazolina CzIE es una herramienta diagnostica valiosa para recuperar la cefazolina para el tratamiento de infecciones de alto inculo bacteriano y de esta manera disminuir los costos en hospitalización y por consecuencia de los efectos adversos, Además de mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes disminuyendo la posibilidad que tengan una comorbilidad por consecuencia de administración de antibiótico.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto inoculo a cefazolina en otra infecciones de alto inoculo bacteriano como endocarditis, abscesos u osteomielitis donde se ha reportado que la prevalencia en Colombia es del 60% (40).
- Realizar el ensayo cinético de los alotipos de las betalactamasas para tener información más certera de la relación de los alotipos con el CzIE.
- Realizar la validación la prueba rápida en diferentes laboratorios clínicos del país y en tiempo real, para mejorar o adaptar la prueba para que sea reproducible en cualquier laboratorio.
- A partir de esta investigación, sería interesante desarrollar un estudio clínico donde se puedan tener la información clínica, microbiológica y económica para realizar un análisis no basado en la literatura sino en datos reales del país.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. OMS. Resistencia a los antimicrobianos 2017. No Title.
2. Resistencia a los antimicrobianos - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
3. La resistencia a los antibióticos, los alimentos y los animales de producción | CDC [Internet]. [cited 2023 Mar 15]. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/challenges/antibiotic-resistance.html>
4. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
5. Aguado JM, San-Juan R, Lalueza A, Sanz F, Rodríguez-Otero J, Gómez-Gonzalez C, et al. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible staphylococcus aureus bacteremia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1099–102.
6. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, From KPC to CCC [Internet]. Vol. 60, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2015 [cited 2020 Oct 1]. p. 1289–90. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/60/8/1289/2462747>
7. Ericson JE, Popoola VO, Brian Smith P, Fowler VG, Benjamin DK, Clark RH, et al. Burden of invasive staphylococcus aureus infections in hospitalized infants. *JAMA Pediatr.* 2015 Dec;169(12):1105–11.
8. Inagaki K, Lucar J, Blackshear C, Hobbs C V. Methicillin-susceptible and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Bacteremia: Nationwide Estimates of 30-Day Readmission, In-hospital Mortality, Length of Stay, and Cost in the United States. *Clin Infect Dis.* 2019;69(12):2112–8.
9. O'Reilly D, O'Connor C, McCallion N, Drew RJ. A retrospective study (2001–2017) of acute and chronic morbidity and mortality associated with Staphylococcus aureus bacteraemia in a tertiary neonatal intensive care unit. *Ir J Med Sci.* 2019 Nov 1;188(4):1297–301.
10. Prybylski JP. Vancomycin Trough Concentration as a Predictor of Clinical Outcomes in Patients with Staphylococcus aureus Bacteremia: A Meta-analysis of Observational Studies. *Pharmacotherapy.* 2015;35(10):889–98.
11. Magill SS, O'Leary E, Janelle SJ, Thompson DL, Dumyati G, Nadle J, et al. Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. Hospitals. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Oct 1];379(18):1732–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30380384/>
12. INS. Informe De Resultados De La Vigilancia Por Laboratorio De Resistencia Antimicrobiana En Infecciones Asociadas a La Atención En Salud (Iaas) 2018 Dirección. *Epidemiol las Infecc Asoc a la atención en salud.* 2019;29–44.
13. Gould IM, Reilly J, Bunyan D, Walker A. Costs of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its control. Vol. 16, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 1721–8.
14. Zhang Y, Song Z, Huang S, Zhang P, Peng Y, Wu P, et al. Global health effects of future atmospheric mercury emissions. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 May 24 [cited 2022 Jul 7];12(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23391-7>
15. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Arch Intern Med* [Internet]. 2002 Oct 28 [cited 2020 Oct 1];162(19):2229–35. Available from: <https://jamanetwork.com/>

16. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, Corey GR, et al. Staphylococcus aureus Native Valve Infective Endocarditis: Report of 566 Episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug;41(4):507–14.
17. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, et al. Dissemination of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec;49(12):1861–7.
18. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A prospective cohort multicenter study of molecular epidemiology and phylogenomics of Staphylococcus aureus bacteremia in nine Latin American countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10).
19. McDanel JS, Roghmann MC, Perencevich EN, Ohi ME, Goto M, Livorsi DJ, et al. Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2017 Jul;65(1):100–6.
20. Forsblom E, Ruotsalainen E, Järvinen A. Comparable effectiveness of first week treatment with anti-staphylococcal penicillin versus cephalosporin in methicillin-sensitive Staphylococcus aureus bacteremia: A Propensity-score adjusted retrospective study. *PLoS One*. 2016;11(11):1–13.
21. Lee S, Song K-H, Jung S-I, Park WB, Lee SH, Kim Y-S, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus nafcillin for methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteraemia: a prospective multicentre cohort study in Korea. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:152–8.
22. McDanel JS, Roghmann MC, Perencevich EN, Ohi ME, Goto M, Livorsi DJ, et al. Comparative Effectiveness of Cefazolin Versus Nafcillin or Oxacillin for Treatment of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Infections Complicated by Bacteremia: A Nationwide Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2017;65(1):100–6.
23. Bryant RE, Alford RH. Unsuccessful treatment of staphylococcal endocarditis with cefazolin. *JAMA*. 1977 Feb;237(6):569–70.
24. Quinn EL, Pohlod D, Madhavan T, Burch K, Fisher E, Cox F. Clinical experiences with cefazolin and other cephalosporins in bacterial endocarditis. *J Infect Dis*. 1973 Oct;128:Suppl:S386-9.
25. Stryjewski ME, Szczech LA, Benjamin DK, Inrig JK, Kanafani ZA, Engemann JJ, et al. Use of vancomycin or first-generation cephalosporins for the treatment of hemodialysis-dependent patients with methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2020 Sep 29];44(2):190–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17173215/>
26. Flynt LK, Kenney RM, Zervos MJ, Davis SL. The Safety and Economic Impact of Cefazolin versus Nafcillin for the Treatment of Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. *Infect Dis Ther*. 2017;6(2):225–31.
27. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of Staphylococcus aureus. Vol. 111, *Journal of Clinical Investigation*. The American Society for Clinical Investigation; 2003. p. 1265–73.
28. Youngster I, Shenoy ES, Hooper DC, Nelson SB. Comparative evaluation of the tolerability of cefazolin and nafcillin for treatment of methicillin-susceptible staphylococcus aureus infections in the outpatient setting. *Clin Infect Dis*. 2014;59(3):369–75.
29. Kernodle DS, McGraw PA, Stratton CW, Kaiser AB. Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of Staphylococcus aureus  $\beta$ -lactamase variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(3):420–5.
30. Monogue ML, Ortwine JK, Wei W, Eljaaly K, Bhavan KP. ARTICLE IN PRESS G Model Nafcillin versus cefazolin for the treatment of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia. *J Infect Public Heal J Infect Public Heal*. 2018;

31. Sabath LD. Reappraisal of the antistaphylococcal activities of first-generation (narrow-spectrum) and second-generation (expanded-spectrum) cephalosporins [Internet]. Vol. 33, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology (ASM); 1989 [cited 2020 Sep 21]. p. 407–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172450/>
32. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh K V., Bourgogne A, Rude TH, Corey GR, et al. Inoculum effect with cefazolin among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: Frequency and possible cause of cefazolin treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3437–41.
33. Rodriguez CA, Agudelo M, Zuluaga AF, Vesga O. In vitro and in vivo comparison of the anti-staphylococcal efficacy of generic products and the innovator of oxacillin. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2010 Jun 4 [cited 2023 Mar 6];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20525378/>
34. Barber M, Waterworth PM. Penicillinase-Resistant Penicillins and Cephalosporins. *Br Med J* [Internet]. 1964 [cited 2020 Sep 21];2(5405):344–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1816326/>
35. Nannini EC, Singh K V., Murray BE. Relapse of Type a  $\beta$ -Lactamase-Producing *Staphylococcus aureus* Native Valve Endocarditis during Cefazolin Therapy: Revisiting the Issue. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2020 Sep 21];37(9):1194–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14557964/>
36. Burgess HA, Evans RJ. Failure of Cephaloridine in a Case of Staphylococcal Endocarditis. *Br Med J* [Internet]. 1966 Nov 19 [cited 2020 Sep 21];2(5524):1244. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1944816/>
37. Regamey C, Libke RD, Engelking ER, Clarke JT, Kirby MM. Inactivation of cefazolin, cephaloridine, and cephalothin by methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 1975 Mar;131(3):291–4.
38. Lee S, Kwon KT, Kim H-I, Chang HH, Lee J-M, Choe PG, et al. Clinical Implications of Cefazolin Inoculum Effect and  $\beta$ -Lactamase Type on Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Microb Drug Resist*. 2014;00(00):1–7.
39. Miller WR, Seas C, Carvajal LP, Diaz L, Echeverri AM, Ferro C, et al. The cefazolin inoculum effect is associated with increased mortality in methicillin-susceptible staphylococcus aureus bacteremia. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 21];5(6). Available from: [/pmc/articles/PMC6007512/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007512/?report=abstract)
40. Rincón S, Reyes J, Carvajal LP, Rojas N, Cortés F, Panesso D, et al. Cefazolin high-inoculum effect in methicillin-susceptible staphylococcus aureus from south american hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Dec;68(12):2773–8.
41. Castillo Londoño JS, Leal AL, Cortes JA, Alvarez CA, Sanchez R, Buitrago G, et al. Mortality among critically ill patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: A multicenter cohort study in Colombia. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2012 Nov;32(5):343–50.
42. Cohen B, Larson EL, Stone PW, Neidell M, Glied SA. Factors associated with variation in estimates of the cost of resistant infections. *Med Care* [Internet]. 2010 Sep [cited 2020 Sep 21];48(9):767–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20706168/>
43. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan;36(1):53–9.
44. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Oct;61(10):e00816-17.

45. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs [Internet]. Vol. 42, *Clinical Infectious Diseases*. Clin Infect Dis; 2006 [cited 2021 May 30]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16355321/>
46. Rieg S, Peyerl-Hoffmann G, de With K, Theilacker C, Wagner D, Hübner J, et al. Mortality of *S. aureus* bacteremia and infectious diseases specialist consultation--a study of 521 patients in Germany. *J Infect*. 2009 Oct;59(4):232–9.
47. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):362–86.
48. Seas C, Garcia C, Salles MJ, Labarca J, Luna C, Alvarez-Moreno C, et al. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Latin America: Results of a multinational prospective cohort study. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2020 Sep 21];73(1):212–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29045648/>
49. McDanel JS, Perencevich EN, Diekema DJ, Herwaldt LA, Smith TC, Chrischilles EA, et al. Comparative Effectiveness of Beta-Lactams Versus Vancomycin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections Among 122 Hospitals. *Clin Infect Dis*. 2015 Aug;61(3):361–7.
50. Lee S, Song KH, Jung SI, Park WB, Lee SH, Kim YS, et al. Comparative outcomes of cefazolin versus nafcillin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a prospective multicentre cohort study in Korea. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(2):171–4.
51. Li J, Echevarria KL, Traugott KA. -Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. 2016;
52. Sabath LD, Garner C, Wilcox C, Finland M. Effect of inoculum and of beta lactamase on the anti staphylococcal activity of thirteen penicillins and cephalosporins. *ANTIMICROBAGENTS CHEMOTHER* [Internet]. 1975 [cited 2020 Sep 21];8(3):344–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1167043/>
53. Kaye D, Hewitt W, Remington JS, Turck M. Cefazolin and *Staphylococcus aureus* endocarditis. *JAMA*. 1977 Jun;237(24):2601.
54. Laverdiere M, Welter D, Sabath LD. Use of a heavy inoculum in the in vitro evaluation of the anti-staphylococcal activity of 19 cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978 Apr;13(4):669–75.
55. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh K V., Rude TH, Ralph Corey G, Fowler VG, et al. Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Sep 21];54(5):2206–8. Available from: </pmc/articles/PMC2863656/?report=abstract>
56. RICHMOND MH. WILD-TYPE VARIANTS OF EXOPENICILLINASE FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *Biochem J*. 1965 Mar;94:584–93.
57. Chase McNeil J, Sommer LM, Boyle M, Hogan P, Vallejo JG, Hultén KG, et al. Cefazolin inoculum effect and methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* osteoarticular infections in children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Sep;64(9).
58. Li J, Echevarria KL, Hughes DW, Cadena JA, Bowling JE, Lewis JS. Comparison of cefazolin versus oxacillin for treatment of complicated bacteremia caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Sep;58(9):5117–24.
59. Pollett S, Baxi SM, Rutherford GW, Doernberg SB, Bacchetti P, Chambers HF. Cefazolin versus Nafcillin for Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection in a California Tertiary Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Aug;60(8):4684–9.

60. Vardakas KZ, Apiranthiti KN, Falagas ME. Antistaphylococcal penicillins versus cephalosporins for definitive treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Dec;44(6):486–92.
61. Weinstein MC. Principles of cost-effective resource allocation in health care organizations. *Int J Technol Assess Health Care* [Internet]. 1990 [cited 2020 Sep 21];6(1):93–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2113893/>
62. Eichler HG, Kong SX, Gerth WC, Mavros P, Jönsson B. Use of cost-effectiveness analysis in health-care resource allocation decision-making: How are cost-effectiveness thresholds expected to emerge? *Value Heal* [Internet]. 2004 [cited 2020 Sep 21];7(5):518–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367247/>
63. Griebisch I. Economic Evaluation in Health Care: Merging theory with practise. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2020 Sep 21];31(4):877–8. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article/31/4/877/630285>
64. Enthoven AC. Consumer-Choice Health Plan: Inflation and Inequity in Health Care Today: Alternatives for Cost Control and an Analysis of Proposals for National Health Insurance. *N Engl J Med* [Internet]. 1978 Mar 23 [cited 2020 Sep 21];298(12):650–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/415239/>
65. Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design. *Front Immunol*. 2014 Jan;4:507.
66. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Feb;17:32–7.
67. Pietrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:166.
68. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
69. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: A review of population-based studies [Internet]. Vol. 19, *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2013 [cited 2020 Sep 24]. p. 492–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23398633/>
70. Le Moing V, Alla F, Doco-Lecompte T, Delahaye F, Piroth L, Chirouze C, et al. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection and Endocarditis - A Prospective Cohort Study. Greub G, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 28 [cited 2020 Sep 24];10(5):e0127385. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127385>
71. Talan DA, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, Limbago B, Albrecht V, et al. Comparison of *staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in us emergency Department patients, 2004 and 2008. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2020 Sep 24];53(2):144–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21690621/>
72. Nabera CK. *Staphylococcus aureus* bacteremia: Epidemiology, pathophysiology, and management strategies. In: *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. *Clin Infect Dis*; 2009 [cited 2020 Sep 24]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19374578/>
73. Arias CA, Rincon S, Chowdhury S, Martínez E, Coronell W, Reyes J, et al. MRSA USA300 clone and VREF - A U.S.-Colombian connection? [Internet]. Vol. 359, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2008 [cited 2020 Sep 30]. p. 2177–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005205/>
74. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, et al. Community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1998 Feb 25 [cited 2020 Sep 24];279(8):593–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486753/>

75. Solomon SL, Oliver KB. Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink [Internet]. Vol. 89, Number. 2014 [cited 2020 Sep 24]. 938–941 p. Available from: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp).
76. David MZ, Boyle-Vavra S, Zychowski DL, Daum RS. Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* as a Predominantly Healthcare-Associated Pathogen: A Possible Reversal of Roles? Diep BA, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Apr 13 [cited 2020 Oct 3];6(4):e18217. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018217>
77. Jackson KA, Gokhale RH, Nadle J, Ray SM, Dumyati G, Schaffner W, et al. Public Health Importance of Invasive Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* Infections: Surveillance in 8 US Counties, 2016. Clin Infect Dis [Internet]. 2020 Mar 3 [cited 2020 Oct 3];70(6):1021–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31245810/>
78. Arias CA, Reyes J, Carvajal LP, Rincon S, Diaz L, Panesso D, et al. A Prospective Cohort Multicenter Study of Molecular Epidemiology and Phylogenomics of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Nine Latin American Countries. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Oct;61(10):e00816-17.
79. Haslam S, Yen D, Dvirnik N, Engen D. Cefazolin use in patients who report a non-IgE mediated penicillin allergy: a retrospective look at adverse reactions in arthroplasty. Iowa Orthop J [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 20];32:100–3. Available from: [/pmc/articles/PMC3565389/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3565389/?report=abstract)
80. Crader MF, Varacallo M. Preoperative Antibiotic Prophylaxis [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Sep 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723061>
81. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52(3).
82. Lee S, Choe PG, Song KH, Park SW, Kim H Bin, Kim NJ, et al. Is cefazolin inferior to nafcillin for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia? Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2011 Nov [cited 2023 Mar 6];55(11):5122–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21825299/>
83. Knothe H, Dette GA, Shah PM. Impact of injectable cephalosporins on the gastrointestinal microflora: Observations in healthy volunteers and hospitalized patients. Infection [Internet]. 1985 Jan [cited 2020 Sep 30];13(1 Supplement). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4055042/>
84. Rao SN, Rhodes NJ, Lee BJ, Scheetz MH, Hanson AP, Segreti J, et al. Treatment outcomes with cefazolin versus oxacillin for deep-seated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(9):5232–8.
85. Bai AD, Showler A, Burry L, Steinberg M, Ricciuto DR, Fernandes T, et al. Comparative effectiveness of cefazolin versus cloxacillin as definitive antibiotic therapy for MSSA bacteraemia: Results from a large multicentre cohort study. J Antimicrob Chemother. 2014;70(5):1539–46.
86. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics [Internet]. Vol. 74, The Journal of antimicrobial chemotherapy. NLM (Medline); 2019 [cited 2020 Sep 30]. p. 2825–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31170287/>
87. Ridley M, Phillips I. Relative instability of cephaloridine to staphylococcal penicillinase. Nature [Internet]. 1965 [cited 2020 Sep 21];208(5015):1076–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/2081076a0>
88. Bruns W, Keppeler H. Extracellular and membrane-bound  $\beta$  lactamase of *Staphylococcus aureus*: Their importance for the expression of penicillin resistance. J Med

Microbiol [Internet]. 1987 [cited 2020 Sep 30];23(2):133–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3494127/>

89. Dingle TC, Gamage D, Gomez-Villegas S, Hanson BM, Reyes J, Abbott A, et al. Prevalence and Characterization of the Cefazolin Inoculum Effect in North American Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2022;60(7).

90. PALABRAS CLAVE Infección Profilaxis antibiótica Cirugía torácica.

91. Wi YM, Park YK, Moon C, Ryu SY, Lee H, Ki HK, et al. The cefazolin inoculum effect in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates: Their association with dysfunctional accessory gene regulator (*agr*). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;

92. Effect I, *Staphylococcus M*, Lee SH, Park B, Lee S, Park S, et al. Association between Type A *blaZ* Gene Polymorphism and Cefazolin. 2016;60(11):6928–32.

93. Chong YP, Park S, Kim ES, Bang KM, Kim MN, Kim SH, et al. Prevalence of *blaZ* gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;34(2):349–55.

94. Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of *blaZ* gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;

95. Song KH, Jung SI, Lee S, Park S, Kiem SM, Lee SH, et al. Characteristics of cefazolin inoculum effect-positive methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* infection in a multicentre bacteraemia cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(2):285–94.

96. Wang WJ, Wang Q, Zhang Y, Lu R, Zhang YL, Yang KW, et al. Characterization of  $\beta$ -lactamase activity using isothermal titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2017;1861(8):2031–8.

97. Loubet P, Burdet C, Vindrios W, Grall N, Wolff M, Yazdanpanah Y, et al. Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a narrative review. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 29];24:125–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.003>

98. Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(July).

99. Rathina Kumar Shanmugakania, Balaji Srinivasana, Marshall J. Glesby, Lars F. Westblade, Washington B. Cárdenas, Tony Raj, David Erickson SM. Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *Lab Chip*. 2020;20(15):2607–25.

100. Dhamnetiya D, Jha RP, Shalini S, Bhattacharyya K. How to Analyze the Diagnostic Performance of a New Test? Explained with Illustrations. *J Lab Physicians*. 2022;14(01):090–8.

101. Kelly H, Bull A, Russo P, McBryde ES. Estimating sensitivity and specificity from positive predictive value, negative predictive value and prevalence: application to surveillance systems for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*. 2008;69(2):164–8.

102. Restrepo J, Rojas K. The genesis of Health Economics in Kenneth Arrow (1963). *Lect Econ* [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 30];(84):209–42. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-25962016000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-25962016000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

103. Collazo Herrera M, Cárdenas Rodríguez J, González López R, Abreu RM, María Gálvez González A, Casulo JC. Temas de actualidad / Current topics La economía de la salud: ¿debe ser de interés para el campo sanitario? 1. Vol. 12, *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2002.

104. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Sep 30]. Available from: <http://www.fce.unal.edu.co/media/files/CentroEditorial/documentos/documentosEE/documentos-economia-22.pdf>

105. Amaya NI, Andrea P, Romero T. Metodología del análisis de costo-efectividad (ACE) en la práctica clínica Methodology of Cost-effectiveness Analysis in Clinic Practice Metodologia de análise de custo-efetividade em prática clínica.
106. Zarate V. Evaluaciones económicas en salud: Conceptos básicos y clasificación. Vol. 138, Rev Med Chile. 2010.
107. Da'ar OB, Al Shehri AM. Towards integration of health economics into medical education and clinical practice in Saudi Arabia. Med Teach. 2015 Apr 1;37(S1):S56–60.
108. Williams A. Qalys and ethics: A health economist's perspective. Soc Sci Med. 1996 Dec 1;43(12):1795–804.
109. Eisenberg JM. Clinical economics. A guide to the economic analysis of clinical practices. JAMA J Am Med Assoc [Internet]. 1989 Nov 24 [cited 2020 Sep 30];262(20):2879–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2509745/>
110. De Revisión A, Santamaría Benhumea AM, Herrera Villalobos JE, Jaimes PAS, Santamaría Benhumea NH, Flores Manzur MÁ, et al. Medicina e Investigación Estructura, sistemas y análisis de costos de la atención médica hospitalaria. Med e Investig [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 30];3(2):134–40. Available from: [www.elsevier.es/rmi](http://www.elsevier.es/rmi)
111. Shrestha P, Cooper BS, Coast J, Oppong R, Do Thi Thuy N, Phodha T, et al. Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of interventions affecting their use. Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 2018 Aug 9 [cited 2023 Mar 16];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30116525/>
112. Kaier K, Frank U. Measuring the externality of antibacterial use from promoting antimicrobial resistance. Pharmacoeconomics [Internet]. 2010 [cited 2023 Mar 16];28(12):1123–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21108531/>
113. Drug-Resistant Infections. Drug-Resistant Infect. 2017;(March).
114. Lee BY, Singh A, David MZ, Bartsch SM, Slayton RB, Huang SS, et al. The economic burden of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). Clin Microbiol Infect [Internet]. 2013;19(6):528–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03914.x>
115. Kim T, Oh PI, Simor AE. The Economic Impact of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Canadian Hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001;22(02):99–104.
116. Boucher H, Miller LG, Razonable RR. Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2023 Mar 16];51 Suppl 2(SUPPL. 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20731576/>
117. Koeck M, Como-Sabetti K, Boxrud D, Dobbins G, Glennen A, Anacker M, et al. Burdens of Invasive Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Disease, Minnesota, USA. Emerg Infect Dis [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Mar 16];25(1):171. Available from: [/pmc/articles/PMC6302582/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30116525/)
118. Brook I. Inoculum Effect. Rev Infect Dis. 1989;11(3):361–8.
119. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30(15):2114–20.
120. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol [Internet]. 2012 May 1 [cited 2023 Mar 16];19(5):455–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22506599/>
121. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 Mar 16];42(Database issue). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24293654/>

122. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 May 25 [cited 2023 Mar 16];31(22):3691–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26198102/>
123. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2023 Mar 16];32(5):1792–7. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/32/5/1792/2380623>
124. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2023 Mar 16];30(9):1312–3. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/9/1312/238053>
125. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Mar 16];44(W1):W242–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095192/>
126. Voladri RKR, Kernodle DS. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1998 [cited 2023 Mar 16];42(12):3163–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9835509/>
127. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 16];36(2):440–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1605608/>
128. Valderrama-Beltrán S, Cortés JA, Caro MA, Cely-Andrade L, Osorio-Pinzón JV, Gualtero SM, et al. Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Manejo de las Infecciones de Piel y Tejidos Blandos en Colombia. *Infectio* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 15];23(4):318–46. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922019000400318&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922019000400318&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
129. Tibavizco D, Rodríguez JY, Silva E, Cuervo SI, Cortés JA. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. 2007;27(9):294–307.
130. Salinas F, Ahunca L, Muñoz D, Vélez D, Sierra J, Lugo L, et al. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento preoperatorio, intraoperatorio y posoperatorio de la persona amputada, la prescripción de la prótesis y la rehabilitación integral [Internet]. Vol. 29, *Iatreia*. 2016. 82–95 p. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/26864/20784853>
131. Wang Y, Hougaard AB, Paulander W, Skibsted LH, Ingmer H, Andersen ML. Catalase Expression Is Modulated by Vancomycin and Ciprofloxacin and Influences the Formation of Free Radicals in *Staphylococcus aureus* Cultures. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Sep;81(18):6393–8.
132. Chong YP, Bae IG, Lee SR, Chung JW, Jun JB, Choo EJ, et al. Clinical and economic consequences of failure of initial antibiotic therapy for patients with community-onset complicated intra-abdominal infections. *PLoS One* [Internet]. 2015 Apr 24 [cited 2023 Mar 18];10(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25910171/>
133. Saeki M, Shinagawa M, Yakuwa Y, Nirasawa S, Sato Y, Yanagihara N, et al. Inoculum effect of high concentrations of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on the efficacy of cefazolin and other beta-lactams. *J Infect Chemother*. 2018;24(3):212–5.
134. Ambler RP. The amino acid sequence of *Staphylococcus aureus* penicillinase. *Biochem J* [Internet]. 1975 [cited 2023 Apr 7];151(2):197–218. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1218078/>
135. Chan PT. Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase gene. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1986 Jul 11 [cited 2023 Apr 7];14(14):5940. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3488540/>

136. East AK, Curnock SP, Dyke KGH. Change of a single amino acid in the leader peptide of a staphylococcal beta-lactamase prevents the appearance of the enzyme in the medium. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1990 Jun 1 [cited 2023 Apr 7];57(3):249–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2210337/>
137. Hadler JL, Petit S, Mandour M, Cartter ML. Trends in invasive infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Connecticut, USA, 2001-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Jun;18(6):917–24.
138. Jernigan JA, Hatfield KM, Wolford H, Nelson RE, Olubajo B, Reddy SC, et al. Multidrug-Resistant Bacterial Infections in U.S. Hospitalized Patients, 2012-2017. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2023 Mar 16];382(14):1309–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32242356/>
139. Carvajal LP, Rincon S, Echeverri AM, Porras J, Rios R, Ordoñez KM, et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal  $\beta$ -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Mar 16];64(5). Available from: </pmc/articles/PMC7179603/>
140. JV. U. Detection of beta-lactamase activity with nitrocefin of multiple strains of various microbial genera. *Acta Microbiol Hung* [Internet]. 1985;2(133–45). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3933272/>
141. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel Method for Detection of  $\beta$ -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1972 [cited 2023 Mar 16];1(4):283–8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.1.4.283>
142. Voladri RKR, Tummuru MKR, Kernodle DS. Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase: importance of amino acids 128 and 216. *J Bacteriol* [Internet]. 1996 [cited 2023 Mar 16];178(24):7248–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8955409/>
143. Jolley K a, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):595.
144. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S28. 28 Edition. Washington, USA; 2018.
145. Hunt BR, Kaloshin VY. Prevalence. *Handb Dyn Syst* [Internet]. 2022 May 24 [cited 2023 Mar 16];3(C):43–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430867/>
146. Fabian Pedregosa GV. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J Mach Learn Res*. 2011;12.
147. Lee SO, Lee S, Park S, Lee JE, Lee SH. The Cefazolin Inoculum Effect and the Presence of type A bla<sub>Z</sub> Gene according to agr Genotype in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Infect Chemother* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Mar 16];51(4):376. Available from: </pmc/articles/PMC6940372/>
148. Wang SK, Gilchrist A, Loukitcheva A, Plotkin BJ, Sigar IM, Gross AE, et al. Prevalence of a Cefazolin Inoculum Effect Associated with bla<sub>Z</sub> Gene Types among Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Four Major Medical Centers in Chicago. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Mar 16];62(8). Available from: </pmc/articles/PMC6105856/>
149. Trick WE, Temple RS, Chen D, Wright MO, Solomon SL, Peterson LR. Patient colonization and environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci in a rehabilitation facility. *Arch Phys Med Rehabil* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 16];83(7):899–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12098146/>
150. Lee SO, Lee S, Lee JE, Song KH, Kang CK, Wi YM, et al. Dysfunctional accessory gene regulator (agr) as a prognostic factor in invasive *Staphylococcus aureus* infection: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Mar 16];10(1). Available from: </pmc/articles/PMC7691521/>

151. Singh K V., Tran TT, Nannini EC, Tam VH, Arias CA, Murray BE. Efficacy of Ceftaroline against Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Exhibiting the Cefazolin High-Inoculum Effect in a Rat Model of Endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Mar 16];61(7). Available from: [/pmc/articles/PMC5487651/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/275487651/)
152. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 1995 Oct [cited 2023 Mar 16];8(4):557–84. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.8.4.557>
153. The costs of the Antimicrobial Resistance and the benefits of reducing it – HAPPY PATIENT [Internet]. [cited 2023 Mar 9]. Available from: <https://happypatient.eu/the-costs-of-the-antimicrobial-resistance-and-the-benefits-of-reducing-it/>
154. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future [Internet]. [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.worldbank.org/en/topic/health/publication/drug-resistant-infections-a-threat-to-our-economic-future>
155. Resch A, Wilke M, Fink C. The cost of resistance: Incremental cost of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in German hospitals. *Eur J Heal Econ* [Internet]. 2009 Jul 18 [cited 2023 Mar 9];10(3):287–97. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10198-008-0132-3>
156. Greiner W, Rasch A, Köhler D, Salzberger B, Fätkenheuer G, Leidig M. Clinical outcome and costs of nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in haemodialysis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(3):264–8.
157. Lowy F. *Staphylococcus Aureus* Infections. *N Engl J Med*. 1998;339:520–32.
158. Nannini EC, Singh K V., Murray BE. Relapse of Type A -Lactamase-Producing *Staphylococcus aureus* Native Valve Endocarditis during Cefazolin Therapy: Revisiting the Issue. *Clin Infect Dis*. 2003;
159. Rincon S, Carvajal LP, Gomez-Villegas SI, Echeverri AM, Rios R, Dinh A, et al. A Test For The Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2021 Feb;59(4):e01938-20.
160. Miller MA, Fish DN, Barber GR, Barron MA, Goolsby TA, Moine P, et al. A comparison of safety and outcomes with cefazolin versus nafcillin for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2020;53(2):321–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.07.006>
161. Peñaherrera Oviedo C, Soria Viteri J. Pregunta de investigación y estrategia PICOT. *Medicina (B Aires)*. 2015;19(1):66.
162. Catálogo Central de Datos [Internet]. [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://microdatos.dane.gov.co/index.php/catalogo/central/about>
163. Castillo Londoño JS. Mortalidad de la bacteremia causada por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en pacientes críticamente enfermos de la red distrital / Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia mortality in critically ill patients in the a city heal. 2011;141. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6355/>
164. Carolina HinCapié-osorno- César Caraballo-Cordovez- María Fernanda Tibaduiza-GarCía. Clinical and microbiological characterization of bacteremia by *Staphylococcus aureus* Colombia.
165. Disclosures. DA authors: N reported, 207. High Severity and Mortality Due to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Infections in a Colombian Hospital Karen M. Ordonez Diaz, MD1; Laura M. Baron1; Juan M. Garcia2; Edilberto Cristancho3; John Alzate1; Lina P. Carvajal, PhD student 4; Au P and CAA. High Severity and Mortality Due to Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. 2019;6(Table 2):2019.
166. Consejo Directivo del Instituto de Seguros Sociales. ACUERDO No. 256 DE 2.001. Man Tarif la Entid Promot Salud del Seguro Soc. 1993;001(256):1–208.
167. Quispe J. el manual tarifario de salud El Seguro Obligatorio de Accidentes de Tránsito (SOAT9. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย. 2023;4(1):88–100.

168. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in staphylococcus aureus bacteremia. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2012 Apr [cited 2023 Apr 8];25(2):362–86. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.05022-11>
169. Benfield T, Espersen F, Frimodt-Møller N, Jensen AG, Larsen AR, Pallesen L V., et al. Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult *Staphylococcus aureus* bacteraemia between 1981 and 2000. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2007 [cited 2023 Apr 8];13(3):257–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391379/>
170. Allard C, Carignan A, Bergevin M, Boulais I, Tremblay V, Robichaud P, et al. Secular changes in incidence and mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Quebec, Canada, 1991-2005. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2008 [cited 2023 Apr 8];14(5):421–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18325037/>
171. Chávez-Iñiguez JS, García-García G, Lombardi R. Epidemiología y desenlaces de la lesión renal aguda en latinoamérica. *Gac Med Mex*. 2018;154:S6–14.
172. Correa A, Patel A, Chauhan K, Shah H, Saha A, Dave M, et al. National Trends and Outcomes in Dialysis-Requiring Acute Kidney Injury in Heart Failure: 2002-2013. *J Card Fail* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Mar 18];24(7):442–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29730235/>
173. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre J V., Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005 [cited 2023 Mar 18];16(11):3365–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16177006/>
174. Henrion J. Hypoxic hepatitis. *Liver Int* [Internet]. 2012 Aug [cited 2023 Mar 19];32(7):1039–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098491/>
175. Bernal W. El hígado en la enfermedad sistémica: sepsis y enfermedad crítica. *Clin Liver Dis* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Mar 19];8(Suppl 1):S6. Available from: </pmc/articles/PMC6490227/>
176. Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *JAMA* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2023 Mar 19];318(13):1241–9. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2654187>
177. Collazo Herrera M, Rodríguez Milord D, García AF. Importancia y necesidad de la evaluación económica para el sistema de vigilancia en salud. *Pharmacoeconomics - Spanish Res Artic* [Internet]. 2017;14(3–4):101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40277-017-0073-2>
178. Guía de Evaluación Económica en Promoción de la Salud Guía de Evaluación Económica en Promoción de.
179. Sistema de Información de Prestaciones de Salud - RIPS [Internet]. [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/proteccionsocial/Paginas/rips.aspx>
180. Moshinsky M, Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PMP, et al. Is cefazolin inferior to nafcillin for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia? Greub G, editor. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2019 [cited 2018 Dec 3];7(1):5122–6. Available from: <https://lexsaludcolombia.files.wordpress.com/2010/10/tarifas-iss-2001.pdf>
181. Klein EY, Jiang W, Mojica N, Tseng KK, McNeill R, Cosgrove SE, et al. National Costs Associated With Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations in the United States, 2010–2014. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Mar 21];68(1):22. Available from: </pmc/articles/PMC6293004/>
182. Shoji T, Muto R, Fukuda H, Muraki Y, Kawata K, Akazawa M. Cost and healthcare utilization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia estimated from linked

antimicrobial resistance surveillance and hospital claims data in Japan. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol.* 2022 Aug 30;2(1).

183. Chong YP, Park S, Kim ES, Bang KM, Kim MN, Kim SH, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;34(2):349–55.

184. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Montejo M, Salavert M, Maseda E, et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quim.* 2013;26(1):1–84.

185. Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos.

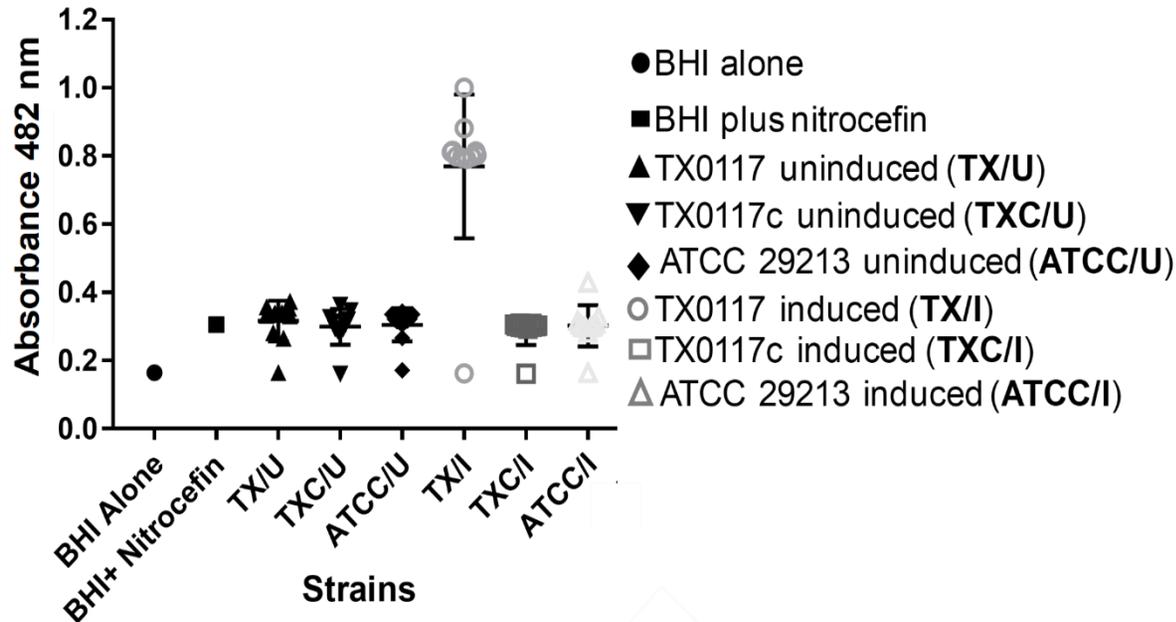
186. Silva Fuente-Alba C, Molina Villagra M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología. *Rev Argent Radiol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rard.2016.11.002>

Anexo 1. Distribución de falsos positivos y falsos negativos de MSSA con eCzIE

Discrepancias	Alotipo	BlaZ Tipo	No de aislamientos (%)	Cefazolin MIC a AI (µg/mL) (No de aislamientos)							Complejo clonal CC (No de aislamientos)	
				128	64	32	16	8	4	2		1
<b>Falso Negativo n=45</b>	BlaZ-1	C	24 (53)	<b>5</b>	3	2	<u>14</u>					CC5 (7), CC8 (5), CC1 (5), CC15 (4), CC45 (1)
	BlaZ-4	A	9 (20)			1	<u>8</u>					CC45 (4), CC8 (3), CC5(1), ND (1)
	BlaZ-3	B	5 (11)	<u>4</u>			1					ND (3), CC8(2)
	BlaZ-6	C	3 (7)	<u>2</u>		1						CC30 (1), CC1 (1), ND (1)
	BlaZ-2	A	1 (2)		<u>1</u>							CC30 (1)
	BlaZ-5	B	1 (2)	<u>1</u>								CC5 (1)
	BlaZ-8	B	1 (2)	<u>1</u>								CC8 (1)
	BlaZ-23	C	1 (2)			<u>1</u>						CC15 (1)
	TOTAL			45 (100)	13	4	5	23				
<b>Falso Positivo (n=48)</b>	BlaZ-1	C	16 (33)					<b>7</b>	<u>7</u>	2		CC1 (8), C5 (4), CC30 (1), CC15 (1), CC8 (1), ND (1)
	BlaZ-5	B	15 (31)						<b>5</b>	<u>7</u>	3	CC5 (9), C97 (4), CC1 (1), CC45 (1)
	BlaZ-3	C	8 (17)							<b>1</b>	<u>7</u>	CC8 (4), ND (4)
	BlaZ 2	A	2 (4)					<b>1</b>		<u>1</u>		CC30 (1), ND (1)
	BlaZ-4	A	2 (4)						<b>2</b>			CC8 (2)
	BlaZ-6	C	1 (2)						<b>1</b>			CC1 (1)
	BlaZ-9	B	1 (2)								<b>1</b>	CC1 (1)
	BlaZ-13	C	1 (2)					<b>1</b>				ND (1)
	BlaZ-28	A	1 (2)								<b>1</b>	CC30 (1)
	BlaZ-0	A	1 (2)						<b>1</b>			CC8 (1)
TOTAL			48 (100)					9	16	11	12	C5 (13), CC1 (11), CC8 (8), CC97 (4) CC30 (3), CC15 (2), CC45 (1), ND (7)

ND: No determinado. MIC<sub>90</sub> Negrita, MIC<sub>50</sub> Subrayado..

**Anexo 2 . Nitrocefin-based hydrolysis of MSSA strains after 30 minutes in the presence and absence of ampicillin.**



TX0117 (exhibits the CzIE), TX0117c (cured derivative of TX0117 without CzIE) and ATCC29213 (BlaZ but no CzIE). Symbols represent the number of repetitions of each experiment. Statistically significant differences (all  $p < 0.001$ ) were observed in ODs after 30 min of incubation for TX0117 (CzIE) vs TX0117c (no CzIE) and vs. ATCC 29213 (no CzIE).

### Anexo 3. Árbol de decisiones

