

REVISTA MÉDICA VALDECILLA

Detección de microorganismos multirresistentes.

Martínez-Martínez L.

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria. Santander.

Palabras clave:

Antibióticos,
Multirresistencia,
Antibiograma,
Métodos
moleculares, Medios
cromogénicos.

Keywords:

Antibiotics,
Multiresistance,
Antibiogram,
Molecular methods,
Chromogenic media.

Resumen:

El estudio de la actividad in vitro de los antimicrobianos (antibiograma) permite predecir con alta probabilidad la respuesta al tratamiento anti-infeccioso. El antibiograma se puede realizar empleando técnicas de difusión o de dilución. En el primer caso, se emplean discos o tiras con antimicrobiano que se colocan sobre una placa de medio de cultivo sólido previamente inoculada, y en la que tras su incubación podrá observarse la inhibición del crecimiento bacteriano; en el segundo caso el antimicrobiano se incorpora directamente al medio de cultivo (agar o medio líquido). Muchos servicios de microbiología clínica emplean en la actualidad para estos fines sistemas (semi)automáticos basados en la técnica de microdilución. De este modo, se pueden conocer el valor de la "concentración mínima inhibitoria" (CMI, menor concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano), así como otros parámetros de interés clínico (concentración mínima bactericida, tolerancia, efecto paradójico, efecto postantibiótico,...). Los valores de CMI (o de halos de inhibición cuando se emplea la difusión con disco) se interpretan, siguiendo los criterios de comités de expertos, como categorías clínicas: sensible, intermedio o resistente. La categoría de resistente se aplica a los microorganismos que no se inhibirán con las concentraciones que habitualmente se alcanzan in vivo o que poseen un mecanismo de resistencia cuya presencia es causa de fracaso terapéutico. Una vez conocido el perfil de resistencia a diversos antimicrobianos, puede establecerse si un determinado microorganismo es multirresistente, empleando una definición de referencia. Desde el punto de vista clínico, tiene gran interés la detección de bacterias resistentes directamente en las muestras clínicas, mediante técnicas fenotípicas o por métodos moleculares; cuando esto no es posible o adecuado, puede detectarse el mecanismo de resistencia en bacterias cultivadas, de nuevo mediante técnicas fenotípicas o moleculares, y en algunos casos mediante ensayos bioquímicos.

Abstract:

The study of the in vitro activity of antimicrobial agents (antibiogram) is a reliable predictor of the efficacy of anti-infective agents. There are two major methodological approaches for antibiogram techniques: diffusion and dilution assays. For diffusion methods, discs or strips with antibiotic are placed on the surface of a previously inoculated agar plate, and after the plate is incubated, bacterial growth inhibition will be evident; for dilution methods, the antibiotic is directly incorporated into the culture medium (either solid or liquid). Most clinical microbiology laboratories are currently using (semi)automatic methods based on the microdilution assay for performing antibiograms. Using the indicated techniques, it will be possible to define the "minimal inhibitory concentration" (MIC, the lowest concentration of antimicrobial agent inhibiting bacterial growth), and other clinically relevant parameters, such as minimal bactericidal concentration, tolerance, paradoxical effect, post-antibiotic effect, etc. MIC values (or diameters of inhibition zones when using disk-diffusion assays) will be translated into clinical categories (susceptible, intermediate, resistant) using the criteria established by expert committees. A microorganism will be considered resistant when it will not be inhibited with the concentrations usually achieved in vivo or when it contains a mechanism of resistance responsible of therapeutic failure. Once the resistance profile to multiple antibiotics has been defined, it would be possible to consider an organism as multiresistant, applying a reference definition for this purpose. From a clinical point of view, it is particularly important to detect resistant bacteria directly in clinical samples using phenotypic or molecular methods, and when this is not possible or adequate, it is possible to detect resistance mechanisms in cultured bacteria, again using phenotypic or molecular methods or, in some cases, biochemical assays.

Correspondencia: lmartinez@humv.es

DetECCIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS: Conceptos generales

Una de las principales actividades de los servicios de microbiología clínica es el estudio de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos empleando técnicas de antibiograma, gracias a las cuales se define si una bacteria es o no resistente a los antimicrobianos, lo que a su vez resulta de gran ayuda para un adecuado tratamiento antimicrobiano. Desde este punto de vista, el antibiograma ha demostrado tener gran valor clínico, porque predice con bastante fiabilidad la respuesta terapéutica, de éxito para las infecciones causadas por bacterias sensibles y de fracaso para las causadas por bacterias resistentes. En cualquier caso, con esta metodología sólo se están considerando dos de los elementos (el antimicrobiano y el microorganismo) a tener en cuenta en este análisis, y al no considerar directamente al paciente, el valor de la predicción siempre podrá tener algunas limitaciones.

La realización de un antibiograma se considera adecuado en alguna de estas circunstancias: a) cuando se trata de microorganismos que presumiblemente tienen valor etiológico en el proceso infeccioso considerado; b) en estudios de portadores colonizados por microorganismos potencialmente resistentes y c) como ayuda en la identificación de algunos microorganismos.

Existe una amplia diversidad de metodologías que permiten definir una bacteria como resistente a los antimicrobianos. Algunas se basan en métodos fenotípicos, mientras que otras son ensayos moleculares. Los primeros han tenido tradicionalmente una mayor implantación, y mediante algunos de ellos se define uno de los parámetros claves en los estudios de sensibilidad: la concentración mínima inhibitoria (CMI), que corresponde a la menor concentración (medida en mg/l o en µg/ml) de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en condiciones estandarizadas. También se pueden realizar ensayos en los que se determine la capacidad de matar (en vez de inhibir) las bacterias, definiendo la concentración mínima bactericida (CMB), que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de producir *in vitro* en condiciones estándares la muerte del 99,9% de un inóculo bacteriano.

Cuando los valores de CMI y de CMB de un antimicrobiano son iguales o muy similares se considera que el mismo es bactericida; por el contrario, cuando la CMB es significativamente mayor que la CMI (esto es, tiene que haber mucho más antimicrobiano para matar al microorganismo que para simplemente inhibirlo) se dice que el compuesto es bacteriostático.

En algunas ocasiones, y para compuestos que son habitualmente bactericidas, se produce un fenómeno atípico, en el que para algunos microorganismos, la CMB del antimicrobiano es al menos 16-32 veces mayor que la CMI; en esta situación se dice que la bacteria es tolerante al antimicrobiano¹. Más inusual aún es el denominado efecto paradójico (descrito inicialmente por Harry Eagle, por lo que también se conoce como efecto Eagle)², en el que al incrementarse la concentración de antimicrobiano la tasa de muerte celular disminuye. Las bases bioquímicas y moleculares tanto de la tolerancia como del efecto paradójico son aún mal conocidas.

A concentraciones por debajo de la CMI (sub-CMI), la bacteria puede sufrir diversas alteraciones, que sin llegar a causar la inhibición de su crecimiento, sí pueden comprometer su viabilidad o su patogenicidad³. Aunque las concentraciones sub-CMI pueden ser beneficiosas desde el punto de vista terapéutico, también se ha demostrado que cuando las bacterias se encuentran en esas condiciones puede favorecerse la expresión de mecanismos de resistencia, que podrían comprometer la actividad del antimicrobiano⁴.

Cuando un cultivo bacteriano se somete a la acción de un antimicrobiano y tras ello el compuesto se elimina (por dilución, hidrólisis, inactivación...), es necesario un tiempo hasta que el cultivo vuelve a recuperar su tasa habitual de crecimiento. Dicho tiempo se denomina efecto postantibiótico, que por tanto se mide en minutos u horas⁵. El efecto postantibiótico tiene importancia para entender la farmacodinamia de los antimicrobianos, y es clínicamente relevante para considerar pautas (dosis, intervalos entre dosis,...) de algunos antimicrobianos como los aminoglucósidos⁶.

Como no es razonable estudiar *in vitro* todos los antimicrobianos actualmente disponibles, existen recomendaciones de qué compuestos deberían estudiarse para cada microorganismo considerado. En general, se escoge un representante de un grupo y se asume que otros antimicrobianos del mismo grupo, con igual mecanismo de acción y frente a los que los mecanismos de resistencia bacteriana son similares, tendrán una actividad igual o muy similar. Un grupo de consenso español ha publicado directrices generales para ayudar en esta selección⁷; este documento está siendo actualizado por el Comité Español del Antibiograma (Coesant, <http://coesant-seimc.org/>). En última instancia, la selección final se debería establecer por acuerdo entre el servicio de microbiología clínica y los demás actores implicados en el uso de los antimicrobianos, tomando en consideración los criterios del Comité de Infecciones y Política Antibiótica de cada centro.

Algunos antimicrobianos deben estudiarse e informarse de forma habitual, porque son opciones terapéuticas relevantes y porque ayudan al microbiólogo en el proceso de la lectura interpretada del antibiograma. En otros casos, aunque sea recomendable estudiar ciertos compuestos, el informe de los correspondientes resultados debe hacerse de forma selectiva considerando el tipo de paciente, la infección que este sufre y los mecanismos de resistencia que se hayan inferido o detectado; por estas mismas razones otros antibióticos solo deben estudiarse en algunos casos. Finalmente, hay compuestos que solo tienen interés clínico en el contexto de las infecciones urinarias y otros que aun cuando se estudien no se deben informar porque no son de uso clínico y solo sirven de ayuda al microbiólogo para analizar el fenotipo de resistencia del microorganismo evaluado.

Técnicas de antibiograma convencional

La mayoría de los laboratorios de microbiología clínica determinan la sensibilidad o la resistencia de los microorganismos empleando técnicas fenotípicas en las que se mide directamente la interacción entre microorganismo y antimicrobiano. Para ello recurren a métodos de difusión, en los que el antimicrobiano se encuentra en un disco, una tableta o una tira que al ser colocado sobre un medio de cultivo donde crecerá la bacteria forma un gradiente de concentración, o métodos de dilución, en los que el antimicrobiano se incorpora al medio de cultivo donde crece la bacteria⁹. Además, cada vez son más frecuentes los ensayos en los que se estudia si un microorganismo tiene un determinado mecanismo bioquímico o uno o más genes de resistencia.

Atendiendo a criterios técnicos, hay múltiples factores que influyen en el resultado del antibiograma, incluyendo el medio de cultivo, el inóculo bacteriano, la atmósfera y la temperatura de incubación de los cultivos una vez inoculados, el tipo de crecimiento bacteriano (hay notables diferencias al considerar bacterias dispersas en un medio líquido o adheridas a un sustrato formando biocapas), y en el caso del método de difusión con disco, el contenido de este^{10,11}. El medio de cultivo ideal para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* debería tener una composición definida (peptonas, agar, electrolitos,...) que permita el crecimiento rápido de la mayoría de los microorganismos y la adición de los suplementos (sangre, etc.) necesarios para el crecimiento de microorganismos fastidiosos; debe tamponar los exoproductos bacterianos y no debe ejercer un efecto antagónico con ningún antimicrobiano; finalmente tiene que asegurar la reproducibilidad del ensayo. El medio más empleado en microbiología clínica para la realización

del antibiograma es el medio de Mueller-Hinton, en su versión sólida (con agar) o líquida (con concentraciones ajustadas de cationes para asegurar la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos)¹⁰. Se dispone de varios documentos donde se recogen las especificaciones técnicas que aseguran la estandarización (y la reproducibilidad) de este tipo de estudios¹²⁻¹⁵.

1. Técnicas de difusión.

Las técnicas de difusión son bastante sencillas de realizar. El método disco-placa se basa en los estudios que a mediados del siglo pasado completaron Bauer, Kirby y colaboradores^{16,17} y consiste en colocar discos de papel secante (o tabletas de material poroso) con una concentración definida de antibiótico sobre una placa de agar, que previamente ha sido sembrada con un inóculo estandarizado de la bacteria a estudiar. Cuando el disco entra en contacto con el medio de cultivo (con cierta proporción de agua), el antibiótico que contiene difunde al medio y a su alrededor crea un gradiente de concentración. Si la bacteria se inhibe en presencia de alguna de las concentraciones de dicho gradiente, cuando haya crecimiento en la placa agar se producirá una zona (halo) de inhibición (Figura 1). Dependiendo del par microorganismo-antimicrobiano, el tamaño del halo es indicador del nivel de sensibilidad de la bacteria.

Este método se suele llevar a cabo empleando agar Mueller-Hinton y es útil para el estudio de la sensibilidad de bacterias de crecimiento rápido (*Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter spp.*, etc.) y empleando el medio y las condiciones de incubación adecuados también se puede destinar para muchos microorganismos de crecimiento fastidioso (*Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Streptococcus spp.*, etc.).

La lectura de los halos de inhibición se suele hacer a las 16-20 horas de incubación, pero en determinados casos debe retrasarse hasta las 24 horas para asegurar la correcta identificación de las cepas resistentes, que podrían no ser evidentes antes de ese plazo.

En vez de usar discos de papel o tabletas, cabe la posibilidad de emplear tiras que contienen a lo largo de la misma un gradiente de antimicrobiano que abarca un amplio rango de concentraciones, como el que puede emplearse en las técnicas de dilución que se comentan posteriormente. El proceso es similar al que se ha descrito para la difusión con discos. La cantidad de antimicrobiano incorporado a la tira va creciendo a lo largo de la misma, lo que determina

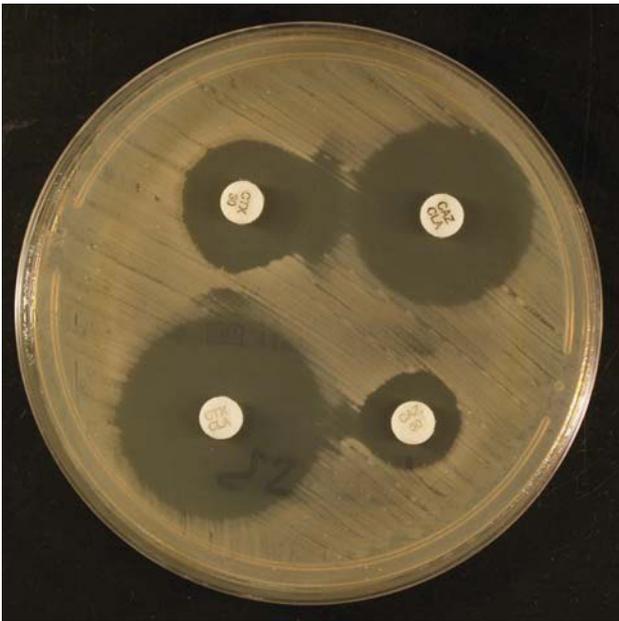


Figura 1. Antibiograma mediante la técnica de difusión con disco. Se muestran los resultados para *Escherichia coli* y los antibióticos cefotaxima (CTX 30), ceftacidima (CAZ 30), cefotaxima más ácido clavulánico (CTX CLA) y ceftacidima más ácido clavulánico (CAZ CLA). El valor numérico "30" de los discos de CTX y CAZ indica la cantidad (microgramos) estandarizada de antibiótico en el disco. Los diámetros de los halos de inhibición son indicadores del nivel de sensibilidad del microorganismo. Además, el aumento de tamaño de los halos de CAZ CLA y de CTX CLA en comparación con CAZ 30 y CTX 30 es indicador de que la cepa produce una betalactamasa de espectro extendido.

que el gradiente que se crea en la placa una vez que se coloca la tira no sea lineal sino exponencial; por ello tras, la incubación de la placa y la consiguiente (en su caso) inhibición del crecimiento se forma una zona de inhibición con aspecto piriforme (algunos autores lo describen como elipsoidal). El método ha sido calibrado de tal forma que el punto de contacto entre la tira y la zona donde se inicia la inhibición del crecimiento corresponde con la CMI del antimicrobiano (Figura 2). El método ha sido evaluado con éxito para una infinidad de microorganismos, habiendo estudios que indican su posible utilidad para bacterias de crecimiento lento, levaduras y hongos filamentosos. Su principal inconveniente es el precio de las tiras, muchísimo más caras que los discos o tabletas.

2. Técnicas de dilución.

Están basadas en valorar la inhibición del crecimiento bacteriano en una batería de tubos o placas con medio de cultivo que representan un rango de concentraciones del antimicrobiano a estudiar. A tal efecto, se preparan en el medio de cultivo adecuado (caldo o agar) diluciones del antimicrobiano, habitualmente en una escala discontinua de progresión geométrica en base 2; con posterioridad se inoculan

los tubos o placas para permitir el crecimiento, y tras ello se realiza la lectura observando en qué concentración sobreviene la inhibición del microorganismo, lo que permite definir la CMI del antimicrobiano en cuestión^{13,14}. Cuando se emplea un medio líquido, además, se puede determinar la actividad bactericida realizando un subcultivo de los medios sembrados previamente en un medio de cultivo nuevo que no tenga antimicrobiano.

En la variante de macrodilución en caldo se emplea por cada bacteria y antibiótico a estudiar una batería de tubos, en la que cada uno de ellos contiene una concentración creciente de antimicrobiano. Como se requiere gran cantidad de material para llevar a cabo el ensayo, y este es complejo metodológicamente, se recurre con frecuencia al método de microdilución con caldo, en el que cada batería de tubos es sustituida por una fila (o una columna) de una placa de microtitulación con fondo en "U"; el uso de micropipetas de dispensación múltiple facilita muchísimo el manejo de las placas y disminuye considerablemente la cantidad de material (caldo, antimicrobiano,...) que se requiere en las mismas; todo ello, junto con la posibilidad de hacer lectura automática de las placas una vez se haya producido el crecimiento (o la inhibición) del microorganismo ha popularizado el uso de este método.

En el mercado existen diversos proveedores que además de suministrar placas de microdilución (pa-



Figura 2. Determinación de la CMI mediante tiras de gradiente de antibiótico. Se muestran los resultados para una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y los antibióticos ciprofloxacino (CI; CMI: 0.25 mg/L) y ácido nalidíxico (NAL; CMI: 16 mg/L). Las colonias que crecen en el interior de los halos son mutantes seleccionadas por los antimicrobianos.

neles o tarjetas) aportan sistemas (semi)automáticos de microdilución que permiten una fácil inoculación de los mismos, la posterior incubación de los paneles en el propio sistema y la lectura automatizada de los resultados obtenidos, que gracias a un *software* propio permiten generar un informe completo de valores de CMI y de interpretación de categorías clínicas (ver posteriormente)^{19,20}. Además, esta información se puede transmitir a un sistema de gestión de laboratorio y almacenarse en el propio equipo. Casi todos estos proveedores también incorporan en sus equipos programas informáticos (sistemas expertos) que pueden reconocer ciertos mecanismos de resistencia o la inconsistencia en los resultados obtenidos mediante el análisis fenotípico de la información generada²¹. Una limitación de estos sistemas es su elevado precio y, hasta cierto punto, la necesidad de emplear paneles “cerrados”, con antimicrobianos y concentraciones de los mismos decididos por el proveedor (que, en todo caso, procura atender las necesidades de sus clientes).

Como alternativa a la macrodilución en caldo, y antes del desarrollo de la técnica de microdilución en medio líquido, se empleó con frecuencia (y aún se sigue usando) el método de dilución en agar, en el que los tubos de la batería de macrodilución son sustituidos por placas de medio sólido, cada una con una concentración diferente de antimicrobiano que es añadido al medio antes de que este se solidifique. Una de las placas, sin antimicrobiano, se emplea como control de crecimiento (todos los microorganismos deben crecer en la misma). En cada placa se pueden sembrar simultáneamente muchos microorganismos (habitualmente entre 32 y 36, pero hay más formatos), empleando para ello un replicador de Steers²². Tras la correspondiente incubación de las placas, se observa a simple vista en qué placa con más baja concentración se produce la ausencia de crecimiento del microorganismo, obteniéndose así el valor de la CMI.

3. Interpretación de resultados del antibiograma.

Los datos crudos del antibiograma se interpretan en forma de categorías clínicas aplicadas a los microorganismos estudiados, de las que habitualmente se manejan tres: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R)¹²⁻¹⁵. Estas categorías se establecen por comités de expertos, de los que los de mayor influencia en la actualidad son el *European Committee of the Antibiogram*, (EUCAST, www.eucast.org) y el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, <http://www.clsi.org>). En España, el Coesant promueve la utilización de los criterios de EUCAST en la práctica clínica y colabora con dicho comité en el desarrollo de normativas sobre metodología e interpretación del antibiograma. Estos comités contemplan aspectos microbiológicos

(agente etiológico considerado, valores de CMI o de diámetros de halo de inhibición, mecanismos de resistencia,...), farmacológicos (parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos) y clínicos (resultados de ensayos en animales, de ensayos clínicos...) para definir puntos de corte, esto es, valores de CMI o de diámetro de halo que separan las mencionadas categorías clínicas.

De forma muy genérica, la categoría de “sensible” indica que el microorganismo está causando una infección que puede tratarse adecuadamente con las dosis habituales de antimicrobiano. La categoría de “intermedio”, que en sangre o tejidos se alcanzan concentraciones cercanos a los valores de CMI y que es de esperar eficacia clínica si la infección se localiza donde se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (p. ej. orina) o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual; tradicionalmente, la categoría de “intermedio” también se emplea para incluir valores de CMI o halos de inhibición que pudieran estar influidos por pequeños errores técnicos durante el desarrollo del ensayo pero que se traducirían en cambios importantes de interpretación en la categoría clínica. La bacteria será “resistente” cuando no es de esperar que se inhiba con las concentraciones de antimicrobiano que se alcanzan habitualmente *in vivo*; también se aplica la categoría de “resistente” a las bacterias que poseen un mecanismo de resistencia específico para el que se ha demostrado que su presencia es causa de fracaso terapéutico²³.

Tras haber definido las categorías clínicas de los antimicrobianos que se hayan estudiado *in vitro* frente a un microorganismo concreto, podrán definirse los conceptos de multiresistencia (resistencia a tres o más grupos de compuestos), resistencia extrema (resistencia a todos los antimicrobianos disponibles salvo dos grupos) y panresistencia (resistencia a todos los antimicrobianos disponibles), siguiendo los criterios de Magiorakos y col.²⁴.

El problema de la multiresistencia puede afectar a una amplia variedad de microorganismos, pero algunos de ellos tienen tal trascendencia epidemiológica y clínica que se les presta una especial atención. En la Tabla 1, basada en la información recogida en el “Protocolo de vigilancia y control de microorganismos multiresistentes” del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander²⁵, se recogen los patógenos más relevantes. Aunque tradicionalmente estos agentes han sido de mayor importancia en el contexto de la infección nosocomial, varios de ellos (sobre todo *S. aureus* resistente a metilina y enterobacterias productoras de BLEEs) también son ya una causa muy importante de infección en el entorno extrahospitalario. Podrían considerarse otros muchos agentes que también pueden presentar

Tabla 1. Principales microorganismos multirresistentes de especial relevancia clínica.

MICROORGANISMO	MARCADORES DE RESISTENCIA
Enterococcus faecalis, E. faecium	Resistencia a glucopéptidos
Staphylococcus aureus	Resistencia a meticilina
	Resistencia a glucopéptidos
Enterobacterias	Productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)
	Productoras de AmpC plasmídica o hiperproductores de AmpC cromosómica
	Productoras de carbapenemasas
Pseudomonas aeruginosa Acinetobacter baumannii complex	Resistencia al menos a un antibiótico de TRES de los siguientes grupos: a) Cefepime, ceftazidima, piperacilina/tazobactam b) Ciprofloxacino, levofloxacino c) Amikacina, tobramicina, gentamicina d) Imipenem, meropenem
Stenotrophomonas maltophilia	Multirresistencia intrínseca

multirresistencia, tales como diversas especies de *Staphylococcus coagulasa-negativa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Burkholderia* spp. y otros muchos bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa, etc.

Detección específica de microorganismos resistentes

Teniendo en cuenta que la detección de resistencia predice con mucha fiabilidad el fracaso terapéutico, se ha puesto especial énfasis en determinar lo más rápidamente tanto la posible presencia de microorganismos resistentes en muestras clínicas (obviamente, lo más interesante) como la resistencia a uno o más antimicrobianos en bacterias que ya han sido cultivadas^{26,27}. Tanto en un caso como en otro se puede recurrir a métodos fenotípicos (basados en cultivo) como a métodos genéticos; además, en el caso de bacterias ya crecidas, se puede recurrir a la detección de la(s) proteína(s) responsable(s) de la resistencia empleando métodos bioquímicos.

1. Detección en muestras clínicas.

Para detectar fenotípicamente cepas resistentes en muestras clínicas, estas deben sembrarse en medios que contengan antimicrobianos que inhiban el crecimiento de las cepas sensibles y permitan el crecimiento de las resistentes. Desde el punto de vista del diagnóstico etiológico, la muestra a sembrar será la más adecuada en función del tipo de infección considerado; cuando se trate de hacer estudios epidemiológicos para el control de bacterias multirre-

sistentes se pueden considerar las muestras que se recogen en la Tabla 2^{28,29}.

Puede hacerse una preincubación en medio líquido con antimicrobiano para luego hacer un subcultivo en medio sólido (también, habitualmente, con antimicrobiano).

Para facilitar el reconocimiento de las bacterias resistentes se emplean cada vez más medios cromogénicos³⁰. Dichos medios contienen ciertas sustancias que al ser metabolizadas por la(s) bacteria(s) de interés dan lugar a colonias de un color característico para cada una de las principales especies objeto de estudio. La identificación se basa, por tanto, en observación de la placa de cultivo, por lo que no es necesario un equipamiento complejo; además, al disponer del cultivo, pueden hacerse estudios adicionales (comprobación de la identificación o del fenotipo, estudios moleculares para definir a nivel genético el mecanismo de resistencia, tipificación molecular,...). Existe una amplia variedad de medios cromogénicos disponibles comercialmente que permiten la detección de *S. aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos, enterobacterias productoras de BLEE o de carbapenemasas y *A. baumannii*³¹⁻³⁵.

Los métodos moleculares permiten una identificación rápida (incluso en 1 a 3 horas) de microorganismos resistentes en muestras clínicas, lo cual es de gran importancia para un mejor control de las infecciones que estos microorganismos puedan ocasionar. Estos métodos están basados en la detección de uno o más genes de resistencia, frecuentemente

empleando técnicas de amplificación mediante PCR a tiempo real, aunque también hay ensayos (incluso más rápidos) basados en otras tecnologías³⁶.

Los métodos moleculares suelen tener mayor sensibilidad que los métodos basados en cultivo para la detección del mecanismo considerado. Sin embargo, su gran especificidad implica que algunas causas de resistencia que puedan existir en las bacterias consideradas no serán detectadas, y para realizar estudios adicionales (antibiograma, tipificación molecular, etc.) seguirá siendo necesario hacer un cultivo convencional. Por otra parte, es importante considerar que el coste de esta metodología es prácticamente siempre superior a la de los métodos basados en cultivo, por lo que en cada escenario conviene hacer el oportuno análisis que garantice la eficiencia de su empleo.

2. Detección de mecanismos de resistencia en bacterias cultivadas.

Como se ha indicado previamente la detección habitual de la resistencia, una vez que la bacteria ha sido cultivada, se basa en las técnicas de antibiograma. Se están empleando algunas variaciones de los métodos clásicos de antibiograma para confirmar la presencia de determinados mecanismos de resistencia. Por ejemplo, la resistencia a cefoxitina es un buen marcador de la resistencia a meticilina en *S. aureus* (y para este fin, tiene menos problemas metodológicos el uso de cefoxitina que el de la propia meticilina o la oxacilina). La comparación de la sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro solas o en combinación con ácido clavulánico es la referencia fenotípica para la comprobación de la presencia de BLEEs en enterobacterias (Figura 2); igualmente la comparación de la actividad de meropenem de forma aislada o en combinación con ciertos inhibidores

de betalactamasas permite la detección de carbapenemasas en bacterias gramnegativas.

Estas aproximaciones fenotípicas permiten reconocer la existencia de un determinado mecanismo de resistencia, pero como el mismo mecanismo puede tener una base genética muy diversas, la definición precisa del gen o los genes implicados requiere métodos moleculares.

Se ha venido considerando durante años que el método de referencia para la detección de resistencia a meticilina en *S. aureus* es la detección mediante PCR del gen *mecA*, que codifica la proteína PBP2a (responsable de la resistencia). El reciente descubrimiento del gen *mecC*³⁷, también responsable de resistencia a meticilina y la infrecuente posibilidad de que dicha resistencia pueda ser consecuencia de la hiperproducción de la betalactamasa de *S. aureus*, resaltan la importancia del uso adecuado de los métodos moleculares para resolver problemas clínicos de causa multifactorial. Se han diseñado métodos de PCR sencilla o múltiple para detectar los principales genes de resistencia a los antimicrobianos de interés clínico, incluyendo los que codifican resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos, quinolonas, aminoglucósidos... etc. Los amplicones obtenidos se pueden (en ocasiones, se deben) secuenciar para definir el alelo de resistencia implicado en cada caso. En los últimos años se está empezando a prestar atención a la detección de genes de resistencia en genomas bacterianos analizados mediante técnicas de secuenciación masiva³⁸; por el momento, el coste y las dificultades del análisis bioinformático han limitado la implementación de esta metodología en los servicios de microbiología clínica, pero es posible que una vez superados estos dos inconvenientes, esta nueva aproximación encuentre su aplicación en la práctica diaria.

Tabla 2. Muestras clínicas de mayor interés para la detección de microorganismos multirresistentes con fines epidemiológicos (Adaptado de 28 y 29).

MICROORGANISMO	RECTAL/ HECES	PERINEAL	FARINGE	NASAL	OTRAS MUESTRAS CLÍNICAS
Staphylococcus aureus resistente a meticilina	-	+	3+	4+	Aspirado traqueal, heridas, úlceras, (orina)
Enterococcus resistente a glucopéptidos	4+	4+	-	-	Heridas, úlceras, orina
Enterobacterias multirresistentes	4+	4+	+	-	Orina, (heridas, úlceras)
Acinetobacter baumannii complex	4+	4+	4+	-	Aspirado traqueal, heridas, úlceras, orina
Pseudomonas aeruginosa multirresistente	3+	3+	4+	-	Aspirado traqueal, heridas, úlceras, orina

Una vez crecida la bacteria, cabe también la posibilidad de detectar directa o indirectamente la(s) proteína(s) responsables del mecanismo de resistencia. Esta posibilidad no ha logrado el mismo nivel de desarrollo metodológico que las basadas en cultivo o en métodos moleculares, pero también se emplea en ciertas ocasiones en el laboratorio clínico. En general, estos métodos son también muy rápidos, y su precio no suele ser tan elevado como el de los métodos enfocados en la detección de genes de resistencia. La proteína PBP2a, antes referida, se puede detectar mediante aglutinación con partículas de látex o por inmunocromatografía. También se puede detectar betalactamasa empleando discos con nitrocefina: al inocular el disco con la bacteria a estudiar, la presencia en esta última de una betalactamasa hidroliza la nitrocefina y aparece como consecuencia de ello un metabolito de color rojizo característico. Siguiendo un principio similar a este último, se han desarrollado varios métodos colorimétricos que permiten la detección de BLEEs y de carbapenemasas: al añadir a una solución de antibiótico tamponada y con un indicador de pH, una suspensión de un microorganismo problema, si este tiene una betalactamasa que hidroliza el antibiótico en cuestión, se genera un metabolito ácido que cambia el color del indicador de pH, facilitando la lectura de la reacción³⁹. También se han diseñado métodos⁴⁰ que detectan mediante MALDI-Tof (del inglés, *matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight*) los productos de hidrólisis de carbapenémicos o cefalosporinas por carbapenemasas o por BLEEs, respectivamente, o que permiten la detección directa de algunas betalactamasas, con la gran ventaja de la rapidez (los resultados están disponibles en minutos) que aporta la detección con este sistema.

Bibliografía.

- Morosini MI, Cantón R. Tolerancia y heterorresistencia en microorganismos Gram-positivos. *Med Clin (Barc)*. 2010;135(3):16-22.
- Eagle H. A Paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro. *Science*. 1948;107:44-45.
- Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17:1-8.
- Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups J Med Sci*. 2014;119:103-107.
- MacKenzie FM, Gould IM. The post-antibiotic effect. *J Antimicrob Chemother*. 1993;32:519-537.
- Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, et al. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs*. 2011;71:2277-2294.
- Cantón R, Alós JI, Baquero F, et al.; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad in vitro con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad in vitro con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. *Inferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:394-400.
- Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013;303:287-292.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1749-1755.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard. Third Edition. CLSI document M22-A3. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.
- Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78:510-543.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard. Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems- susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 2: evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. ISO 20776-2. Geneva: International Organization for Standardization; 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-sixth Informational Supplement CLSI document M100-S26. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45:493-496.
- Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1971;217(B):1-90.
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, et al. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol*. 1991;29:533-538.
- Nielsen LE, Clifford RJ, Kwak Y, et al. An 11,000-isolate same plate/same day comparison of the 3 most widely used platforms for analyzing multidrug-resistant clinical pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83:93-98.
- Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:442-447.
- Barry J, Brown A, Ensor V, et al. Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:1191-1202.
- Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother*. 1959;9:307-311.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance [Internet]. [Acceso 20/05/2016]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:268-281.

25. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Protocolo de vigilancia y control de microorganismos multirresistentes. 2ª edición. Santander: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla; 2016.
26. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, et al. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1757–1762.
27. Tenover, F. C. Potential impact of rapid diagnostic tests on improving antimicrobial use. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010;1213:70-80.
28. Cano ME, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, et al. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2007.
29. Bou G, Chaves F, Tabla 2. Muestras clínicas de mayor interés para la detección de microorganismos multirresistentes con fines epidemiológicos (Adaptado de 28 y 29). Oliver A, et al. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2015.
30. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol.* 2007;103:2046-2055.
31. Dodémont M, Verhulst C, Nonhoff C, et al. Prospective Two-Center Comparison of Three Chromogenic Agars for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Screening in Hospitalized Patients. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3014-3016.
32. Suwantarat N, Roberts A, Prestridge J, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4039-4042.
33. Willems E, Cartuyvels R, Magerman K, et al. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76:16-19.
34. Pence MA, Hink T, Burnham CA. Comparison of chromogenic media for recovery of carbapenemase-producing enterobacteriaceae (CPE) and evaluation of CPE prevalence at a tertiary care academic medical center. *J Clin Microbiol.* 2015;53:663-666.
35. Barsoumian A, Calvano T, Markelz AE, et al. Variations of CHROMagar *Acinetobacter* to detect imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Scan J Infect Dis.* 2013;45:446-452.
36. Ledeboer NA, Hodinka RL. Molecular detection of resistance determinants. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):S20-S24.
37. Paterson GV, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014;22:42-47.
38. Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* 2014;30:401-407.
39. Poirer L, Nordmann P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3003-3008.
40. Zboromyrska Y, Ferrer-Navarro M, Marco F, Vila J. Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas. *Rev Esp Quimioter.* 2014;27:87-92.