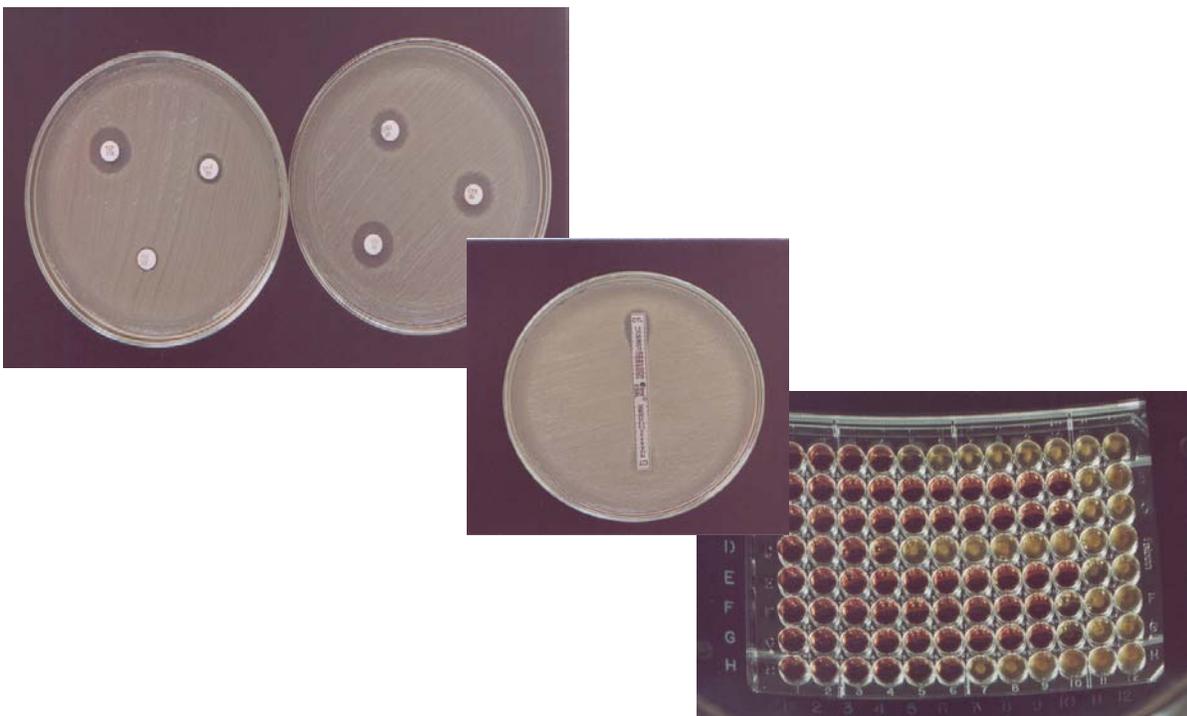


SECRETARIA
DISTRITAL
DE SALUD

MANUAL DE ACTUALIZACION EN RESISTENCIA BACTERIANA Y NORMAS CLSI M100 – S20 2010.



GRUPO PARA EL CONTROL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA
DE BOGOTÁ

- GREBO -

1 TABLA DE CONTENIDO

1	TABLA DE CONTENIDO	2
2	INTRODUCCION	5
3	GENERALIDADES	6
3.1	MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	6
3.1.1	<i>Método de Microdilución en Caldo</i>	6
3.1.2	<i>Método de Difusión en Disco</i>	6
3.1.3	<i>Método de Agar Dilución</i>	8
3.1.4	<i>Método E test</i>	8
3.1.5	<i>Métodos Comerciales</i>	9
3.2	SELECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS	9
3.3	INDICACIONES PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD	11
3.4	CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD	12
4	DETECCION DE LA RESISTENCIA EN MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS.....	13
4.1	GENERALIDADES	13
4.2	SELECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS PARA GRAM NEGATIVOS.....	14
4.3	MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS EN GRAM NEGATIVAS.....	16
4.4	DETECCIÓN DE RESISTENCIA EN GRAM NEGATIVOS	17
4.4.1	β -lactamasas	17
4.4.2	β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	18
	β -lactamasas de espectro ampliado (grupo 2b) (Enzimas TEM-1,TEM-2 y SHV-1)	18
	β -lactamasas de espectro extendido - BLEE Clase A(2be)	18
	Enzimas: (SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-M)	18
4.4.2.1	Detección de BLEE por el Laboratorio	19
4.4.3	β -lactamasas AmpC Clase C (grupo 1) Enzimas: AmpC, CMY-2, ACT-1	23
4.4.3.1	Detección de AmpC por el Laboratorio	23
4.4.4	β -lactamasas tipo Carbapenemasas Clase A (grupo 2f)	25
	Enzimas: IMI, SME y KPC	25
4.4.4.1	Detección de carbapenemasas por el Laboratorio	26
4.4.5	Detección de Metallo β -lactamasas Clase B (grupo 3)IMP-1,VIM-1,CcrA, BcII	29
4.4.5.1	Detección de Metallo β -lactamasas por el laboratorio.....	29
4.4.6	Detección de β lactamasas tipo Oxacilinas Clase D (grupo 2d) OXA-1, OXA-10.....	30
4.4.6.1	Detección de β lactamasas tipo Oxacilinas por el laboratorio.....	31
4.4.7	Detección de Resistencia a Aminoglucósidos.....	32
4.4.8	Detección de Resistencia a Quinolonas.....	32
4.4.9	Detección de Resistencia en Pseudomonas aeruginosa	33
4.4.10	Detección de Resistencia en Acinetobacter spp	33
4.4.11	Detección de Resistencia en Stenotrophomonas maltophilia.....	33
4.5	PANORAMA GLOBAL DE LA RESISTENCIA EN GRAM NEGATIVOS	34
4.6	DETECCIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA EN GRAM NEGATIVOS	35

4.6.1	Detección Molecular para BLEE	35
4.6.2	Detección Molecular para AmpC.....	35
4.6.3	Detección Molecular de Carbapenemasas.....	36
4.6.4	Detección Molecular de Metalo β -lactamasas.....	36
4.6.5	Detección Molecular de β lactamasas tipo Oxacilinasas	36
4.7	TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE BETALACTAMASAS EN GRAM NEGATIVOS	36
4.7.1	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	37
4.7.1.1	Evaluación de productos obtenidos en una PCR convencional.....	37
4.7.1.2	Secuenciación:.....	40
5	DETECCION DE LA RESISTENCIA EN MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS.....	41
5.1	GENERALIDADES	41
5.2	SELECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS PARA GRAM POSITIVOS.....	41
5.3	MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS EN GRAM POSITIVOS	44
5.4	DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN GRAM POSITIVOS	44
5.4.1	<i>S. aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa negativa (CoNS)</i>	44
5.4.1.1	Detección de la Resistencia a Penicilina en <i>Staphylococcus spp</i>	45
5.4.1.2	Detección de Resistencia a Oxacilina.....	46
5.4.1.3	Detección de Resistencia a Vancomicina.....	48
5.4.1.4	Detección de Resistencia a Macrólidos	49
5.4.1.5	Detección de Resistencia a Linezolid.....	51
5.4.2	<i>Enterococcus spp</i>	52
5.4.2.1	Detección de la Resistencia a Penicilina	52
5.4.2.2	Detección de la Resistencia a Vancomicina	53
5.4.2.3	Detección de la Resistencia a Gentamicina y Streptomicina de alta concentración	54
5.4.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
5.4.3.1	Detección de Resistencia a Penicilina	56
	Prueba tamiz a oxacilina.....	56
5.4.4	<i>Streptococcus spp</i> β hemolíticos.....	56
	Grupo A	57
	Grupo B.....	57
	Grupo C y G.....	57
5.4.5	<i>Streptococcus Grupo viridans</i>	57
5.5	PANORAMA GLOBAL DE LA RESISTENCIA EN GRAM POSITIVOS.....	58
5.6	DETECCIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA EN GRAM POSITIVOS.....	59
5.6.1	Detección Molecular de <i>S. aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa negativa (CoNS)</i>	59
5.6.1.1	Detección molecular de resistencia a Oxacilina	60
5.6.1.2	Detección molecular de resistencia a vancomicina	60
5.6.1.3	Detección molecular de resistencia a macrólidos	61
5.6.2	Detección Molecular de <i>Enterococcus spp</i>	61
5.6.2.1	Detección molecular de resistencia a vancomicina	61
5.6.2.2	Detección molecular de resistencia a macrólidos	62
5.6.3	Detección Molecular de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	63
5.6.3.1	Detección Molecular de la resistencia a β lactámicos	63
6	CONTROL DE CALIDAD EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD	64
6.1	CONTROL DE CALIDAD	64
6.1.1	Control de calidad del medio.....	64
6.1.1.1	Ph	64

6.1.1.2	Concentración de cationes.....	64
6.1.2	<i>Inóculo</i>	64
6.1.3	<i>Incubación</i>	65
6.1.4	<i>Sensidiscos</i>	66
6.1.5	<i>Cepas ATCC</i>	66
6.2	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	66
6.2.1	<i>Toma y selección de la muestra</i>	66
6.2.2	<i>Procesamiento de la muestra</i>	67
6.2.3	<i>Medios y reactivos</i>	67
6.2.4	<i>Equipos</i>	67
6.2.5	<i>Personal</i>	67
6.3	SISTEMA DE CALIDAD	67
6.4	EVALUACIÓN DE LA CALIDAD	67
6.5	ACCIONES CORRECTIVAS	67
6.6	GUÍA DE REFERENCIA DE LA FRECUENCIA DEL CONTROL DE CALIDAD PARA CIM	68
7	RESUMEN DE CAMBIOS EN CLSI 2010	70
8	ANEXOS	73
9	BIBLIOGRAFIA	75

2 INTRODUCCION

El trabajo habitual del Bacteriólogo en el Laboratorio de Microbiología se ha convertido en el pilar fundamental en el cual se apoyan los clínicos para realizar un adecuado diagnóstico y tratamiento de los pacientes hospitalarios.

El Laboratorio de microbiología tiene la responsabilidad de proporcionar al clínico los resultados de susceptibilidad confiables y oportunos, lo cual le permitirá optimizar la terapia antimicrobiana y así poder tomar las medidas requeridas para la contención de la resistencia.

El incremento de la resistencia bacteriana, la aparición y adquisición de nuevos mecanismos de resistencia a los diferentes antibióticos utilizados en la práctica clínica, se han convertido en un problema a nivel mundial; no solamente para el diagnóstico de las infecciones sino por la dificultad en la detección por el laboratorio de los diferentes perfiles de resistencia.

La Secretaría Distrital de Salud en el año 2005, como parte del proceso de implementación de la tercera línea de la Política de Prevención, Control y Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Intrahospitalarias, a través de un convenio con la Universidad Nacional de Colombia y el Grupo GREBO, se diseñó e implementó un sistema de vigilancia epidemiológica de la resistencia bacteriana en instituciones públicas y privadas de segundo y tercer nivel de la ciudad, utilizando el software WHONET recomendado por la Organización Mundial de la Salud.

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se han convertido en procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es fundamental para la vigilancia de los perfiles de sensibilidad y la detección de nuevos patrones de resistencia por el laboratorio.

El objetivo de este Manual es proporcionar a los laboratorios de las Instituciones de salud de la red SIVIBAC, una revisión y actualización de la detección de la resistencia y el control de calidad en todos los procedimientos de rutina, siguiendo la norma CLSI 2010 tanto en selección de antibióticos como en los métodos para la detección de la resistencia en los patógenos de importancia clínica y epidemiológica.

Adicionalmente se proporcionará una revisión y actualización de las técnicas microbiológicas y moleculares que ayudaran en la detección de los diferentes perfiles de resistencia.

3 GENERALIDADES

3.1 Métodos de detección de susceptibilidad antimicrobiana

3.1.1 Método de Microdilución en Caldo

La concentración Inhibitoria Mínima (CIM) está definida como la más baja concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano. Es un método cuantitativo que utiliza diluciones dobles seriadas del antimicrobiano y se expresa el resultado en $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos con el método de microdilución en caldo pueden ser afectados por diversas variables que deben ser controladas para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados:

- **Medio de cultivo:**

Se utiliza Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes, el cual contiene 20 a 25 mg de Ca^{++} y 10 a 12,5 mg de Mg^{++} . Insuficiente cantidad de cationes puede aumentar la actividad de los aminoglucósidos y viceversa.

- **Cantidad de inhibidores:**

Una baja cantidad de inhibidores pueden afectar las pruebas de susceptibilidad de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas

- **pH:**

Debe estar entre 7.2 y 7.4. Un pH bajo puede bajar la potencia de aminoglucosidos y macrólidos mientras que otros agentes antimicrobianos pueden parecer tener mayor actividad como las tetraciclinas. Si el pH es alto se observa el efecto contrario.

- **Turbidez del Inóculo:**

Preparar el inóculo del microorganismo con suspensión directa de la colonia ó por crecimiento en fase logarítmica, ajustando el inóculo al estándar 0.5 McFarland

- **Incubación:**

Incubar las placas en ambiente aerobio a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 16 a 20 horas dependiendo del microorganismo a probar.

3.1.2 Método de Difusión en Disco

En muchos laboratorios de Microbiología se utiliza el método de difusión en disco como de rutina para microorganismos de rápido crecimiento y microorganismos de crecimiento exigente.

El método de difusión en disco está basado en la presencia ó ausencia de una zona de inhibición de crecimiento, que se mide en milímetros. La interpretación de la prueba esta basada en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la CIM ($\mu\text{g/mL}$) para cada antimicrobiano y microorganismo.

Los resultados obtenidos con el método de difusión en disco pueden estar afectados por varios factores que deben ser controlados para asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados:

- **Medio de cultivo:**

Se utiliza Agar Mueller Hinton que está formulado y avalado de acuerdo a los criterios de CLSI. El medio debe tener una profundidad de 4mm.

- **Cationes divalentes:**

Variaciones en los cationes de Ca^{++} y Mg^{++} pueden afectar los resultados de aminoglucósidos y tetraciclinas para *P. aeruginosa*, exceso de cationes pueden dar una falsa resistencia y baja cantidad de cationes una falsa sensibilidad. Variaciones en los niveles de calcio pueden afectar los resultados para daptomicina. Excesiva cantidad de iones de zinc puede dar una falsa resistencia a carbapenemes.

- **Cantidad de timina y timidina:**

Una cantidad excesiva de timina y timidina puede revertir el efecto inhibitorio de sulfonamidas y trimetoprim causando una falsa resistencia

- **pH:**

Debe estar entre 7.2 y 7.4. Un pH bajo puede bajar la potencia de aminoglucosidos y macrólidos mientras que otros agentes antimicrobianos pueden parecer tener mayor actividad como las tetraciclinas. Si el pH es alto se observa el efecto contrario.

- **Turbidez del Inóculo:**

Preparar el inóculo del microorganismo con suspensión directa de la colonia, lo cual es recomendado para microorganismos exigentes (*Haemophilus* spp, *Neisserias* spp y *Streptococcus*); se ajusta la suspensión del microorganismo a la turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland.

También se puede preparar el inoculo por el método de crecimiento, cuando la colonia es difícil de suspender directamente, ajustando la turbidez al estándar 0.5 McFarland.

- **Sensidiscos**

Los sensidiscos del antimicrobiano deben ser almacenados en refrigeración a 8°C ó en refrigeración a -14°C , con desecante. Antibióticos lábiles como ~~penicámicos~~ penicámicos, carbapenemes, acido clavulánico y tetraciclinas pueden ser almacenados en congelación y dejar en refrigeración los antibióticos que usan de rutina.

- **Incubación:**

Incubar las placas en ambiente aerobio a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 16 a 18 horas para microorganismo no exigentes.

Para microorganismos como *H influenzae* y *parainfluenzae*, *S.pneumoniae*, *N.meningitidis*, *N.gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp se incuba a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 de 20 a 24 horas.

- **Lectura:**

Se mide el diámetro de la zona completa de inhibición, incluyendo el diámetro del disco, utilizando una regla o caliper y luz reflejada ó transmitida.

3.1.3 Método de Agar Dilución

El método de agar dilución para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, incorpora el antimicrobiano dentro del agar y cada placa contiene una concentración diferente de antimicrobiano. La suspensión de la bacteria se ajusta al estándar de turbidez 0.5 McFarland y se hace una dilución para que la concentración final del inóculo sea de 10^4 UFC. Este método es recomendado para microorganismos exigentes como *N. gonorrhoeae*.

Esta afectado por los mismos factores del método de difusión en disco: Agar Mueller Hinton, pH, concentración de los cationes divalentes, turbidez del inóculo e incubación.

3.1.4 Método E test

La prueba E test determina la susceptibilidad de forma cuantitativa, se basa en el uso de unas tiras o "epsilómetros" (AB Biodisk, Sweden) las cuales contienen un gradiente exponencial continuo de antibiótico y una escala interpretativa. El gradiente de antibiótico cubre un amplio rango de concentraciones correspondientes aproximadamente a 15 diluciones dobles de CIM. Estas concentraciones están diseñadas para corresponder con los puntos de corte correspondientes a cada antimicrobiano.

El procedimiento es exactamente igual al usado en el método de difusión en disco pero en vez de observar una zona circular de inhibición, se observa una zona elíptica. La CIM del antibiótico se determina en el punto donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira.

Este método tiene en cuenta varios factores para la calidad de la prueba:

- **Medio de cultivo:**

El medio debe tener una profundidad de 4mm. Un pH de $7,3\pm 0,1$. El uso de suplemento en el medio de cultivo depende del microorganismo a probar.

- **Turbidez del inóculo:**

El inóculo del microorganismo es ajustado al 0.5 McFarland para la mayoría de los microorganismos a excepción de los germen anaerobios que se ajusta al 1 de McFarland.

- **Tiras de E test**

El inóculo debe ser extendido sobre el agar, la superficie debe estar completamente seca antes de colocar las tiras del antimicrobiano.

- **Incubación:**

Las placas deben ser incubadas invertidas y no se debe apilar más de 5 cajas. La atmósfera de incubación depende del microorganismo a probar.

- **Lectura:**

Se lee el valor de la CIM, donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira. No se debe leer la placa si hay un cultivo contaminado, poco ó excesivo crecimiento. Existe una guía para la lectura de los diferentes patrones de inhibición/crecimiento.

3.1.5 Métodos Comerciales

Los métodos comerciales frecuentemente utilizan puntos de corte o diluciones en concentraciones específicas que permiten diferenciar entre las categorías de interpretación. Cuando los sistemas comerciales son usados se deben seguir las recomendaciones de la manufactura en cuanto a almacenamiento, inoculación, incubación y interpretación. De acuerdo a la FDA la tasa aceptable de errores mayores es menor de 1.5% y de errores muy mayores es menor de 3% de los aislamientos.

Actualmente existen en el mercado 3 equipos automatizados que incluyen a Vitek 2, Vitek 2 compaq (Biomérieux), Microscan WalkAway y Autoscan (Siemens) y Phoenix BD (Becton Dickinson). Estos sistemas varían en su automatización, método de detección (turbidimetría, fluorometría), tiempo de incubación, tiempo de lectura y sistema experto.

Cada equipo cuenta con las instrucciones y recomendaciones de manufactura para el manejo y control de calidad de las tarjetas ó paneles de identificación y susceptibilidad, almacenamiento de los mismos y ajuste del inóculo.

FDA indica que los sistemas comerciales proporcionan resultados de susceptibilidad equivalentes a los resultados generados usando el método de referencia recomendado por CLSI para los microorganismos y agentes antimicrobianos descritos en el inserto de manufactura.

Adicionalmente existen también en el mercado medios con cromógenos que permiten una rápida identificación de gérmenes con perfiles de resistencia determinados como los son *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), detección de β lactamasa de espectro extendido (BLEE). También se encuentran en el mercado la prueba de cefalosporina cromogénica (nitocefina) que permite detectar la hidrólisis de la β -lactamasa, esta prueba es muy útil para *H influenzae*, *N gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* y *Enterococcus* spp.

3.2 Selección de antimicrobianos

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se han convertido en procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es primordial para la vigilancia de los diferentes perfiles de susceptibilidad y la detección de nuevos mecanismos de resistencia; por tanto la selección del agente antimicrobiano más adecuado para las pruebas de susceptibilidad y el informe al clínico es una decisión importante que debe tomarse entre el

laboratorio de microbiología, el clínico y el comité de control de infecciones de cada institución, con el fin de lograr la contención de la resistencia bacteriana y apoyar el uso adecuado de los antimicrobianos.

Las técnicas utilizadas para determinar la susceptibilidad antimicrobiana incluyen el método de difusión en disco y el método de microdilución en caldo, para lo cual existen parámetros internacionales no solamente para la realización de las pruebas sino para el reporte e interpretación al clínico.

Las recomendaciones del Instituto de Estándares del laboratorio clínico de los Estados Unidos (CLSI), para cada grupo de microorganismo abarca los agentes con eficacia probada cuyas pruebas

son aceptables *in vitro*. Se establecen también consideraciones para agentes antimicrobianos en pruebas específicas, eficacia clínica, prevalencia de la resistencia y recomendación para la selección de antimicrobianos de primera línea y agentes alternativos.

CLSI agrupa los antimicrobianos de la siguiente manera:

Grupo A. Incluye los agentes antimicrobianos apropiados para ser incluidos de manera rutinaria en las pruebas y reportes de sensibilidad para un grupo específico de microorganismos.

Grupo B. Incluye agentes que son clínicamente importantes, deben ser probados rutinariamente; sin embargo, su informe debe ser selectivo. Tal es el caso de organismos resistentes a los agentes del grupo A, o cuando su selección depende del origen de la muestra, la presencia de una infección polimicrobiana, en casos de alergia, intolerancia, respuesta clínica inadecuada a agentes del grupo A y para propósitos de vigilancia epidemiológica.

Grupo C. Incluye agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que deben ser probados en instituciones con cepas endémicas o epidémicas resistentes a algunos de los antimicrobianos primarios o en caso de pacientes alérgicos a estos medicamentos, en caso de tratamiento de microorganismos inusuales o para efectos de informarlos al comité de infecciones como ayuda epidemiológica.

Grupo U (urinario). Agentes antimicrobianos (nitrofurantoina y ciertas quinolonas) que se usan únicamente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, estos agentes pueden no deben ser informados de rutina frente a patógenos reportados de otros sitios de infección-Otros agentes con indicaciones amplias pueden ser incluidos en el Grupo C para patógenos urinarios (Ej *Pseudomonas spp* y ofloxacin)

Grupo O (otros). Incluye agentes que tienen indicaciones clínicas para el grupo del organismo, pero no son generalmente candidatos a la prueba rutinaria.

Grupo Inv (Investigación). Incluye agentes que están en investigación para el grupo de microorganismo y aún no han sido aprobados por FDA.

Para CLSI la selección de los antimicrobianos esta basado en las tablas de reporte rutinario, de reporte selectivo y en consulta con el comité de Enfermedades infecciosas y la farmacia.

3.3 Indicaciones para las pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana están indicadas para cualquier organismo que este implicado en un proceso infeccioso y en el cual se requiera una terapia antimicrobiana; con mayor frecuencia se realizan en aquellos organismos que pertenecen a una especie capaz de presentar resistencia a los agentes antimicrobianos de primera línea más utilizados y que tengan estandarizados los criterios de interpretación (1)

Es importante que estos aislamientos clínicos sean recuperados de muestras tomadas adecuadamente. (2)

Las pruebas de susceptibilidad no están indicadas cuando la infección es debida a un microorganismo del cual se conoce su susceptibilidad a cierto fármaco (ej. La susceptibilidad de *S. pyogenes* a penicilina). Aislamiento de *S. pyogenes* proveniente de pacientes alérgicos a la penicilina, las pruebas de susc(1)eptibilidad a eritromicina u otro macrólido están indicadas para detectar resistencia a estos antibióticos.

Sin embargo cuando la naturaleza de la infección no es clara y en la muestra se observa mezcla de diferentes microorganismos o flora normal, las pruebas de susceptibilidad no están indicadas ya que pueden generar un uso inapropiado de un antibiótico.(1)

3.4 Criterios de Interpretación de las Pruebas de Susceptibilidad

Estos criterios están basados en la respuesta *in vitro* de un microorganismo a un agente antimicrobiano con niveles alcanzados en sangre o tejidos del antimicrobiano dosificado. Los puntos de corte y su interpretación se generan teniendo en cuenta los criterios microbiológicos, criterios de farmacocinética/farmacodinamia y clínicos. Los siguientes son los criterios de interpretación actualmente sugeridos por CLSI:

Susceptible: Cuando el microorganismo es inhibido por las concentraciones alcanzadas por el agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada es usada para el sitio de la infección.

Intermedia: Cuando el microorganismo presenta una CIM del agente antimicrobiano cercana a los niveles de antibiótico usualmente alcanzados en sangre o tejidos y para los cuales la respuesta puede ser más baja que para los aislamientos susceptibles. La categoría intermedia implica la eficacia clínica en sitios del cuerpo donde el fármaco es concentrado fisiológicamente o cuando se puede utilizar una dosis más alta de lo normal.

Resistente: Cuando el aislamiento no es inhibido por las concentraciones séricas del antimicrobiano normalmente alcanzadas a dosis normales.

No susceptibles: Cuando el microorganismo solamente tiene la categoría de interpretación de susceptible, debido a la ausencia o rara ocurrencia de resistencia. Los aislamientos que tienen CIM por encima o un diámetro de la zona debajo de los valores indicados para el punto de corte como susceptible, puede ser reportado “*no susceptible*”.

- Un aislamiento que es interpretado como no susceptible no significa que tenga un mecanismo de resistencia. Es posible que los aislamientos con una CIM en el punto de corte de susceptible, carezcan de mecanismo de resistencia y se pueden encontrar dentro de las cepas del tipo salvaje.
- Para aislamientos que se encuentran en esta categoría de “no susceptible” la identificación y susceptibilidad antimicrobiana puede realizarse

4 DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS

4.1 Generalidades

Actualmente los hospitales están realizando esfuerzos para combatir las infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes implementando nuevas medidas de control frente a dichas infecciones; adicionalmente la industria ha ido desarrollando nuevas moléculas de antibióticos con nuevos mecanismos de acción, que permitan combatir esta resistencia en varios grupos de microorganismos.

Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes, han empezado a convertirse en un problema de salud pública a nivel mundial; es así como un reporte de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas plantea la vigilancia de la resistencia en tres categorías principales:

- *E. coli* y *Klebsiella* spp resistente a cefalosporinas de espectro extendido
- *P. aeruginosa* multirresistente
- *Acinetobacter* spp resistente a carbapenemes (3)

La Familia *Enterobacteriaceae* incluye muchas especies de bacilos gramnegativos, no formadores de esporas y que pueden ser aeróbicos o anaeróbicos facultativos, están ampliamente distribuidas en las plantas, tierra, agua e intestino de humanos y animales.

Actualmente se reconocen 29 géneros de Enterobacterias, que incluyen más de 100 especies diferentes. De 20 a 23 especies son las responsables del 50% de los microorganismos aislados a partir de muestras clínicas.(4)

Las infecciones por Enterobacterias son muy prevalentes en pacientes hospitalizados, principalmente en las áreas de cirugía y terapia intensiva, sitios propicios para el desarrollo de infección intrahospitalaria.

Dentro de las infecciones más frecuentes causadas por Enterobacterias se encuentra sepsis, neumonía, infecciones del tracto respiratorio, gastrointestinal y abdominal. Entre los agentes bacterianos más frecuentes causantes de estas infecciones se encuentran principalmente, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. (5)

La multirresistencia representa un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de estas infecciones. Los mecanismos que utilizan las bacterias para defenderse de los antibióticos están en constante evolución. Se conocen al menos siete mecanismos diferentes de resistencia antimicrobiana.

Las pruebas de susceptibilidad pueden ser realizadas para este grupo de organismos siguiendo los estándares recomendados por el Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (del inglés CLSI).

El sistema de vigilancia epidemiológica para la resistencia bacteriana de la secretaria de salud distrital (SIVIBAC) para el año 2009 reportó en UCI una resistencia en *K. pneumoniae* a ceftazidima de 31% y a ciprofloxacina 14%; en *E.coli* de 11% y 23% y *P. aeruginosa* 20% y 16% respectivamente y para imipenem de 22%. En *A. baumannii* la resistencia a imipenem fue de 65%

4.2 Selección de antimicrobianos para Gram negativos

A continuación se presentará la lista de antimicrobianos de mayor importancia para el grupo de bacterias Gram negativas, de acuerdo a la norma CLSI M100-S20 2010.

CAMBIO CLSI:
En *Enterobacteriaceae* cambia de grupo: cefalotina pasa del grupo A al grupo U
En *Acinetobacter spp* se suprime colistina y polimixina B del Grupo C

Tabla No.1 Selección de antibióticos Enterobacterias, *Acinetobacter spp* y *P. aeruginosa*

<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Acinetobacter spp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Reporte	Grupo de antimicrobianos		
GRUPO A PROBAR Y REPORTAR PRIMARIAMENTE	Ampicilina	Ampicilina subactam	Ceftazidima
	*Cefazolina	Ceftazidima	Gentamicina Tobramicina
		Ciprofloxacina Levofloxacina	Piperacilina
	Gentamicina Tobramicina	Imipenem Meropenem	
		Gentamicina Tobramicina	
GRUPO B PROBAR PRIMARIAMENTE Y REPORTAR SELECTIVAMENTE	Amikacina	Amikacina	Amikacina
	Amoxicilina Acido clavulánico	Piperacilina tazobactam Ticarcilina clavulánico	Aztreonam
		Ampicilina Sulbactam Piperacilina tazobactam	Cefepime
	Ticarcilina Acido clavulánico	Cefotaxima Ceftriaxona	Ciprofloxacina Levofloxacina
	Cefuroxima	Doxiciclina Minociclina Tetraciclina	Imipenem Meropenem
	Cefepima	Piperacilina	Piperacilina Tazobactam Ticarcilina
	Cefotetán Cefoxitin	Timetoprim sulfametoxazol	
	Cefotaxima o Ceftriaxona		
	Ciprofloxacina Levofloxacina		

	Imipenem Meropenem Ertapenem		
	Meropenem		
	Piperacilina		
	Timetoprim sulfametoxazol		
GRUPO C	Aztreonam Ceftazidima		
COMPLEMENTARIOS REPORTAR SELECTIVAMENTE	Cloranfenicol		
	Tetraciclina		
	Tobramicina		
GRUPO U	Cefalotina		
COMPLEMENTARIOS USAR SOLO EN ORINA	Lomefloxacina ó Norfloxacina ofloxacina		Lomefloxacina ó ofloxacina Norfloxacina
	Nitrofurantoina		
	Sulfisoxazol		
	Trimetoprim		

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

*Solamente se realiza CIM, difusión en disco no es confiable

Es importante resaltar los cambios realizados por CLSI en el M100 S20 con respecto a la selección y reporte de antimicrobianos para este grupo de microorganismos:

CLSI

- Cefazolina solamente se reporta en CIM, el método de difusión en disco no es confiable
- **El criterio de interpretación de cefalotina, puede ser usado solo para predecir resultados de agentes orales, cefadroxil, cefpodoxima, cefalexina y loracarbef. Datos antiguos sugieren que la cefalotina puede predecir la susceptibilidad a cefalosporinas, puede ser aún correcto; sin embargo no existen datos recientes que confirmen esto.

Advertencia

Los siguientes agentes antimicrobianos pueden no ser reportados de rutina para aislamientos bacterianos de LCR, estos antimicrobianos no seon de elección y pueden no se efectivos para el tratamiento de infecciones de LCR causadas por estos microorganismos (incluidos de la tabla 2 A a 2L CSI)

Antimicrobianos administrados por via oral solamente

- Cefalosporinas de I y II generación (excepto cefuroxima parenteral)
- **Cefamicinas** -Tetraciclinas
- Clindamicina - Fluoroquinolonas
- Macrólidos

Tabla No.2 Selección de antibióticos *Stenotrophomonas maltophilia* y no *Enterobacteriaceae*

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		Otras no <i>Enterobacteriaceae</i>
Reporte	Grupo de antimicrobianos	
GRUPO A PROBAR Y REPORTAR PRIMARIAMENTE	Trimetoprim sulfametoxazol	Ceftazidima
		Gentamicina Tobramicina
		Piperacilina
GRUPO B PROBAR PRIMARIAMENTE Y REPORTAR SELECTIVAMENTE	*Ceftazidima	Amikacina
	*Cloranfenicol	Aztreonam
	Levofloxacina	Cefepime
	Minociclina	Ciprofloxacina Levofloxacina
	*Ticarcilina Clavulánico	Imipenem Meropenem
		Piperacilina Tazobactam Ticarcilina Clavulánico
Timetoprim sulfametoxazol		
GRUPO C COMPLEMENTARIOS REPORTAR SELECTIVAMENTE		Cefotaxima Ceftriaxona
		Cloranfenicol
GRUPO U COMPLEMENTARIOS USAR SOLO EN ORINA		Lomefloxacina u Ofloxacina Norfloxacina
		Sulfisoxazol
		Tetraciclina

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

*Solamente se realiza CIM, difusión en disco no es confiable

4.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en Gram negativas

Existen 4 mecanismos de resistencia en el cual las bacterias pueden inactivar los antibióticos β -lactámicos:

- La producción de enzimas β -lactamasas es el mecanismo de resistencia más común en los microorganismos Gram negativos
- Cambios en el sitio activo de las proteínas de unión a la penicilina (PBP) pueden bajar la afinidad de los antibióticos β -lactámicos e incrementar la resistencia a estos agentes.
- Disminución de la expresión de las proteínas de la membrana externa (OMPs). Este

mecanismo se ha descrito en algunas Enterobacterias (*E. coli*, *K.pneumoniae* y *Enterobacter spp*) y en *P. aeruginosa* y cuando se presenta asociado con otros mecanismos como este mecanismo pueden presentar resistencia a carbapenemes basado en la pérdida de esta OMPs.

d. Mecanismo de Bombas de eflujo, como parte de un fenotipo de resistencia adquirido o intrínseco, las bacterias son capaces de exportar una amplia gama de sustratos del periplasma al ambiente circundante. Estas bombas de eflujo son un importante determinante de multirresistencia en bacterias gram negativas particularmente patógenos como *P.aeruginosa* y *Acinetobacter spp.*(6)

4.4 Detección de Resistencia en Gram negativos

4.4.1 β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas catalíticas que rompen el enlace amídico del anillo betalactámico haciendo que el antibiótico pierda su capacidad para unirse a las proteínas de unión a la penicilina y su acción bactericida. Existen 2 esquemas de clasificación de las enzimas β -lactamasas, la clasificación molecular según Ambler, basado en la secuencia de los aminoácidos y divididas en 4 grupos de enzimas clases A, C y D las cuales poseen serina en su sitio activo para hidrólisis de los β -lactámicos y clase B o metaloenzimas las cuales requieren iones divalentes de zinc para su hidrólisis (7) y la clasificación funcional esquema de Bush-Jacoby-Medeiros basado en los perfiles de sustratos e inhibición de las β -lactamasas. Este último esquema es el más utilizado en el laboratorio clínico debido a que se puede correlacionar con las características fenotípicas de los aislamientos (7)

Tabla No. 3 Clasificación de las β -lactamasas

Clase Molecular	Bush-Jacoby -Medeiros (2009)	Sustrato	Inhibido por AC ó TZ	Inhibido por EDTA
A (serina penicilinasas)	2a	Penicilina	Si	No
	2b	Penicilina y cefalosporinas de corto espectro	Si	No
	2be	Penicilina y cefalosporinas de espectro corto y espectro extendido	Si	No
	2br	Penicilina	No	No
	2ber	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactam	No	No
	2c	Carbecilina	Si	No
	2ce	Carbecilina, Cefepime	Si	No
	2e	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No
	2f	Carbapenemes	Variable	No
B (metalo β -lactamasas)	3a	Carbapenemes	No	Si
	3b	Carbapenemes	No	Si
C (cefalosporinasas)	1	Cefalosporinas	No	No
C (cefalosporinasas)	1e	Cefalosporinas	No	No
D (oxacilinasas)	2d	Cloxacilina	Variable	No
	2de	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No
	2df	Carbapenemes	Variable	No
No clasificadas	4			

AC= Acido clavulánico, TZ= tazobactam

Tomado: Karen Bush1* and George A. Jacoby2. MINIREVIEW Updated Functional Classification of β lactamases. Antimicrob agents and chemotherapy.2010, 54 (3); 969–976.

4.4.2 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

La introducción en los años 80 de cefalosporinas de tercera generación dentro de la práctica clínica fue una brecha importante en la lucha contra bacterias resistentes a antibióticos mediada por β -lactamasas. Estas cefalosporinas fueron desarrolladas en respuesta al incremento de β -lactamasas en ciertos microorganismos (*K. pneumoniae* y *E. coli*) y la diseminación de estas β -lactamasas en nuevos huéspedes (*H. influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*) (8)

El crecimiento de β -lactamasas en *E. coli* y *K. pneumoniae* así como la aparición de estas enzimas en otros patógenos como son *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*, han llevado al desarrollo de antibióticos como cefalosporinas de espectro extendido, carbapenemes, monobactámicos y cefamicinas que permitan tratar estas infecciones causadas por bacterias resistentes a β -lactámicos.

Después de algunos años de la introducción de las cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima y ceftazidima) nuevas BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* han sido reportadas. (7)

Dentro de las β -lactamasas podemos encontrar:

β -lactamasas de espectro ampliado (grupo 2b) (Enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1)

Estas enzimas se presentan principalmente en bacterias gram negativas, son capaces de hidrolizar la penicilina y ampicilina y en menor grado a carbecilina ó cefalotina. No son capaces de hidrolizar las cefalosporinas o aztreonam y son inhibidas por el ácido clavulánico.

La primera β -lactamasa mediada por plásmido fue identificada en *E. coli*, en 1963 y fue llamada TEM. Otra β -lactamasa encontrada inicialmente encontrada en *K. pneumoniae* fue llamada SHV.

TEM y SHV son β -lactamasas comúnmente encontradas en *E. coli* y *K. pneumoniae*, patógenos responsables de infecciones urinarias, infecciones respiratorias y de sangre adquiridas en el hospital. (6)

β -lactamasas de espectro extendido - BLEE Clase A(2be)

Enzimas: (SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-M)

Las β -lactamasas del grupo 2be son enzimas derivadas del grupo 2b, la e indica que la β -lactamasas es de espectro extendido. Las BLEE derivadas de TEM-1, TEM-2 ó SHV-1 difieren de las progenies por unos aminoácidos, lo que hace que se produzca un cambio en la actividad enzimática y permita que ellas puedan hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro, de tercera generación, antibióticos monobactámicos y puedan ser inhibidas por el ácido clavulánico.

Otra β -lactamasa importante en este grupo es la **CTX-M**, esta aparece por la transferencia de un plásmido de un gen de BLEE cromosomal de *Kluyvera* spp, se ha convertido en una enzima importante encontrada en aislamientos provenientes de la comunidad y es la BLEE más común aislada en el mundo particularmente en Europa y América del Sur. (9)

Es una enzima que tiene actividad hidrolítica contra cefotaxima. Algunos autores han reportado que los aislamientos productores de esta enzima pueden presentar CIM de cefotaxima resistentes, ceftazidima aparentemente sensibles, aztreonam variable y resistencia a

gentamicina, ciprofloxacina y co trimoxazole. (8)

4.4.2.1 Detección de BLEE por el Laboratorio

Al menos 200 BLEE han sido detectadas en diferentes especies y presentan una variedad de perfiles de susceptibilidad.

La detección de β -lactamasas de espectro extendido es un aspecto de gran importancia en todos los laboratorios de microbiología; en la actualidad las normas de CLSI M100 S-20 establece nuevos criterios de interpretación para cefalosporinas (cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y ceftizoxima) y aztreonam.

Según la evaluación de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK-PD) y datos clínicos limitados, se establecieron los nuevos criterios de interpretación para cefalosporinas. Cefepime y cefuroxima (parenteral) también se evaluaron, sin embargo, no fueron necesarios cambios en el criterio de interpretación para las dosis indicadas

Tabla No. 4 Nuevos criterios de Interpretación CLSI

Antimicrobiano	Criterios de Interpretación					
	Difusión en disco (mm)			Concentración Inhibitoria Mínima $\mu\text{g/mL}$		
	S	I	R	S	I	R
Cefotaxima	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
Ceftriaxona	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Ceftazidima	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
Ceftizoxima	≥ 25	22-24	≤ 21	≤ 1	2	≥ 4
Aztreonam	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16

CLSI

Cuando se usan los nuevos criterios de interpretación, la prueba de rutina de BLEE no es necesaria antes de reportar los resultados. **“no es necesario editar los resultados para penicilina, cefalosporinas o aztreonam de susceptible a resistente”** Sin embargo hasta que el laboratorio implemente los nuevos criterios, la prueba de BLEE puede ser realizada como recomienda CLSI.

Prueba tamiz BLEE recomendada por CLSI

La prueba tamiz y la prueba confirmatoria fenotípica para la detección de BLEE está recomendada para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, y cuando no se han implementado los nuevos criterios de interpretación.

Esta prueba se puede realizar por el método de difusión en disco y por el método de microdilución. Cuando se realiza por difusión en disco se deben tener en cuenta la

recomendaciones de CLSI para esta técnica en cuanto a medio de cultivo (Agar Mueller Hinton), concentración del inóculo (estándar 0.5 McFarland), tiempo y atmósfera de incubación.

Para el método de microdilución en caldo se debe tener en cuenta el medio (Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes), concentración del inóculo (estándar 0.5 McFarland), tiempo y atmósfera de incubación.

Tabla No.5 Tamizaje y confirmatoria de BLEE por Método de Difusión en Disco

Método de Difusión en disco		
Indicaciones	Prueba tamiz inicial	Prueba confirmatoria fenotípica
Agar Mueller Hinton	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli</i> Cefpodoxima 10µg Ceftazidima 30µg Ceftriaxona 30µg Cefotaxima 30µg Aztreonam 30µg <i>Proteus mirabilis</i> Cefpodoxima 10µg Cefotaxima 30µg Ceftazidima 30µg	Cefotaxima 30µg Cefotaxima + Acido clavulánico 30µg/10µg Ceftazidima 30µg Ceftazidima + Acido clavulánico 30µg/10µg
Inóculo	Estandar 0.5 McFarland	Estandar 0.5 McFarland
Incubación	35±2 en aerobiosis 16 a 18h	35±2 en aerobiosis 16 a 18h
Potenciales BLEE	<i>K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli</i> Aztreonam ≤ 27 Cefotaxima ≤ 27 Cefpodoxima ≤ 17 Ceftazidima ≤ 22 Ceftriaxona ≤ 25 <i>Proteus mirabilis</i> Cefotaxima ≤ 27 Cefpodoxima ≤ 22 Ceftazidima ≤ 22	Incremento de ≥ 5 mm en el diámetro halo para ceftazidima ó cefotaxima cuando se combina con Acido clavulánico

Tabla No.6 Tamizaje y confirmatoria de BLEE por Método de Microdilución en Caldo

Método de Microdilución en Caldo		
Indicaciones	Prueba tamiz inicial	Prueba confirmatoria fenotípica
Agar Mueller Hinton	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> Cefpodoxima 4µg/mL Ceftazidima 1µg/mL Ceftriaxona 1µg/mL Cefotaxima 1µg/mL Aztreonam 1µg/mL <i>Proteus mirabilis</i> Cefpodoxima 1µg/mL Cefotaxima 1µg/mL Ceftazidima 1µg/mL	Cefotaxima 0.25-128µg/mL Cefotaxima + Acido clavulánico 0.25/4µg/mL -128/4µg/mL Ceftazidima 0.25-64µg/mL Ceftazidima + Acido clavulánico 0.25/4µg/mL - 64/4µg/mL
Inóculo	Estándar 0.5 McFarland	Estándar 0.5 McFarland
Incubación	35±2 en aerobiosis 16 a 20h	35±2 en aerobiosis 16 a 20h
Potenciales BLEE	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> y <i>E. coli</i> CIM ≥8µg/mL cefpodoxima, CIM≥2µg/mL para ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima ó aztreonam <i>Proteus mirabilis</i> CIM ≥2µg/mL cefpodoxima, cefotaxima ó ceftazidima	Disminución de 3 ó más diluciones en la CIM con ceftazidima ó cefotaxima cuando se combina con Acido clavulánico

Otras Pruebas para detección de BLEE

Adicional a la prueba para la detección de BLEE recomendada por CLSI existen varios métodos descritos como son el test tridimensional, agares cromogénicos, métodos de microdilución que usan el clavulanato con diferentes β-lactámicos como es el E test. Estas pruebas pueden utilizarse como alternativas para la detección de BLEE.

E test para la detección de BLEE

Esta prueba utiliza tiras que contienen en una parte de ella diferentes concentraciones decrecientes de la cefalosporina (ceftazidima) y en la otra parte la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico. Las tiras deben ser colocadas en el agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco en cuanto a inóculo, tiempo y atmósfera de incubación.

La CIM se determina observando el punto en que la elipse de inhibición intercepta la escala de la tira. Se lee el extremo del antibiótico sin el ácido clavulánico y el extremo que contiene ácido clavulánico, se divide las dos concentraciones en ese orden y un resultado positivo para BLEE es cuando la proporción es ≥8 y negativo <8.

Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CIM será el valor superior que tiene la tira y por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe informar el valor mínimo de la escala.

Figura No. 1 Prueba E test para la detección de BLEE



Laboratorio de Microbiología Universidad Nacional de Colombia

Prueba alternativa Doble disco para la detección de BLEE

Este método de doble disco fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μg) en el centro de una placa a una distancia de 20 mm se coloca un disco de ceftazima (30 μg) y al otro lado un disco de cefotaxima (30 μg). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.

Figura No. 2 Prueba doble disco para detección BLEE



Laboratorio de Microbiología Universidad Nacional de Colombia

4.4.3 β -lactamasas AmpC Clase C (grupo 1) Enzimas: AmpC, CMY-2, ACT-1

Muchas bacterias gram negativas producen β -lactamasas tipo AmpC también conocidas como cefalosporinas, las cuales en su mayoría son codificadas en cromosoma y unas pocas en plásmidos. Estas enzimas usualmente son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico y son más activas frente a cefalosporinas y cefamicinas como cefoxitin más que en contra de benzilpenicilinas, también poseen alta afinidad sobre aztreonam comparadas a las cefalosporinas de clase A (7, 10) y pueden conducir a resistencia a carbapenemes si se presentan de manera simultánea con otros mecanismos como alteraciones de porinas o sobreexpresión de bombas de e-flujo tal como ha sido reportado en *P. aeruginosa*.

En organismos como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, la expresión de AmpC cromosomal es reducida pero inducible en exposición a algunos betalactámicos como amoxicilina, ampicilina, cefazolina y cefalotina, cefoxitin, imipenem e inhibidores de betalactamasas como ácido clavulánico (10). La sobreexpresión de AmpC se asocia con mutaciones en el sistema de regulación de la enzima AmpC, lo que conduce a una hiperinducibilidad de AmpC o a una hiperproducción de esta enzima (10)

Por el contrario en *A. baumannii* y en *E. coli* las enzimas AmpC han perdido uno o más componentes del sistema de inducción y la hiperproducción de esta enzima es asociada en *E. coli* a mutaciones del sistema regulador y en *A. baumannii* a la presencia de una secuencia de inserción ISAb-1 (7, 11)

Por otro lado, algunas enterobacterias como *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp. y *Proteus mirabilis*, han perdido las enzimas AmpC cromosomales y un fenotipo de resistencia asociado con presencia de cefalosporinasa es mediado por β -lactamasas AmpC adquiridas las cuales son codificadas en plásmidos. Dentro de estas cefalosporinas encontramos las enzimas CMY, ACT, DHA, FOX, MIR, las cuales son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de I, II y III generación y cefamicinas y presentan resistencia al clavulanato, sulbactam y tazobactam (10). En el caso de *E. coli* un fenotipo AmpC puede ser debido a sobreexpresión de la AmpC cromosomal o a la presencia de AmpC codificada en plásmidos.

4.4.3.1 Detección de AmpC por el Laboratorio

Actualmente CLSI no tiene estandarizada una técnica por el laboratorio para detección de AmpC, sin embargo la prueba tamiz de BLEE puede ser usada para tamizar β -lactamasas tipo AmpC.

Debido a que la detección por el laboratorio se dificulta y muchas veces microorganismos como *Klebsiella* spp y *E. coli* que presentan AmpC mediada por plásmido, el clavulanato puede actuar como inductor de altos niveles de de AmpC resultando en una prueba para BLEE falsa negativa. (12)

Otras Pruebas

Alternativamente cefoxitin (intermedio ó resistente) puede utilizarse como tamizaje algunos microorganismos como *Klebsiella* spp, *P. mirabilis* y *E. coli* entre otros.

Pruebas confirmatorias basadas en la detección de la hidrólisis de las cefamicinas ó inhibición de

AmpC podrían distinguir las β -lactamasas tipo AmpC de las BLEE. Existen varios autores que respaldan el uso de otras técnicas que ayudan a la detección de estas enzimas.

Prueba de Disco para AmpC

Esta prueba esta basada en el uso de un disco que contiene Tris-EDTA para permeabilizar la célula de la bacteria y permitir la liberación de la β lactamasa al ambiente externo. Siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco se extiende sobre una placa de Mueller Hinton una cepa sensible a cefoxitin que es *E. coli* ATCC 25922, se coloca sobre la superficie del agar un disco de cefoxitin de 30 μ g y junto al este se coloca el disco de Tris EDTA sobre el cual se colocan varias colonias del microorganismo a probar. Se incuba en aerobiosis a 35°C con la placa invertida.

Resultado positivo: Se observa un aplastamiento o hendidura en la zona de inhibición cerca al disco de cefoxitin, indicando inactivación de la enzima.

Esta prueba proporciona una detección confiable de AmpC mediada por plásmido en organismos gram negativos como son *K. pneumoniae*, *Salmonella*, spp y *P mirabilis*. Esta prueba no es muy confiable para aislamientos de *E. coli* debido a que este microorganismo puede tener AmpC mediada por plásmidos y por cromosoma.(13).

Prueba de Disco con acido borónico

Es un método que se basa en la inhibición de AmpC con ácido fenil borónico. Para ello se utilizan discos de ceftazidima y cefotaxima de 30 μ g y otros discos adicionales de estos mismos antibióticos y con la misma carga a los que se les ha añadido 30 μ l de una solución de ácido fenil borónico. Tras la realización de un antibiograma con los 4 discos, se considera que existe una betalactamasa de tipo AmpC si el halo de inhibición en presencia de ácido fenil borónico con cualquiera de los dos antibióticos es superior o igual a 5 mm respecto al disco que no contiene este inhibidor.

Test tridimensional para detección de AmpC mediada por plásmido

Esa prueba ha sido diseñada para la detección de β -lactamasas tipo BLEE y AmpC. Para esta prueba se utiliza un concentrado de células.

La superficie del agar Mueller Hinton es inoculada con la cepa de *E. coli* ATCC 25922, se coloca un disco de cefoxitin de 30 μ g sobre el agar inoculado. Se hace una hendidura de 5mm sobre el agar desde el borde del disco en forma radial, dentro de la hendidura se coloca el extracto celular de la muestra.

Si se observa un aumento del crecimiento del microorganismo en el punto donde se intercepta la hendidura con la zona de inhibición es considerado un resultado positivo de presencia de AmpC.
(14)

Prueba con Agar suplementado con Cefoxitín

Esta prueba con cefoxitin es sencilla para realizar y fácil de interpretar; permite la diferenciación de AmpC de otros mecanismos de resistencia en bacterias como *K. pneumoniae* y *E. coli*.

Para esta prueba se parte de un cultivo fresco del microorganismo en tripticasa de soya, el cual se centrifuga para tener un extracto de la enzima y posteriormente se realiza un proceso de

congelación y descongelación.

Para realizar esta técnica se utiliza el Agar Mueller Hinton con diferentes concentraciones de

Cefoxitin (2, 4, 8 y 16 µg/mL), las placas son inoculadas previamente con *E. coli* ATCC 25922. Sobre la superficie del agar se hacen pozos circulares de 5mm de diámetro y se coloca 30 µL del extracto de las células de la muestra en el interior del pozo. Se incuban las placas por 18-24 horas a 35°C.

Una zona de crecimiento alrededor de la periferia del pozo es considerada positiva para la presencia de AmpC.(15)

4.4.4 β-lactamasas tipo Carbapenemasas Clase A (grupo 2f) Enzimas: IMI, SME y KPC

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de betalactamasas, estas enzimas tienen la habilidad de hidrolizar carbapenemes y en su gran mayoría hidrolizan casi todos los betalactámicos de uso clínico. Las carbapenemasas se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo al mecanismo hidrolítico de su sitio activo, el primer grupo son las carbapenemasas que poseen serina, en este grupo encontramos las carbapenemasas clase A y clase D (Oxacilinasas). El segundo grupo son las carbapenemasas metalobetalactamasas (MBL) las cuales necesitan átomos de zinc, el cual es utilizado como metal cofactor para su actividad enzimática, también son conocidas como carbapenemasas clase B.(16)

Las carbapenemasas clase A son dependientes de serina, incluye las no metalocarbapenemasas. Son capaces de hidrolizar los carbapenemes, así como las cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, adicionalmente son inhibidas por el clavulánico y tazobactam. Estas enzimas carbapenemasas han sido identificadas principalmente en *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *K. pneumoniae*, aunque también se han detectado en no fermentadores como *P aeruginosa*.(6)

La enzima SME-1 fue detectada inicialmente en Inglaterra en un aislamiento de *S. marcescens* en 1982. La enzima IMI-1 y NMC fueron detectadas en *E. cloacae*; los genes para estas tres enzimas están localizados en el cromosoma. Sin embargo la enzima IMI-2 ha sido encontrada en plásmidos en especies de *Enterobacter*. Estas enzimas cromosomales pueden ser inducidas en respuesta al imipenem y cefoxitin.

Las primeras enzimas tipo KPC fueron encontradas en plásmidos, son predominantes en *K. pneumoniae* sin embargo han sido reportadas en *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter freundii*, *K. oxytoca*, *Salmonella spp.*, *E. coli* y en menor proporción en *A. baumannii* y *P. aeruginosa* en este último microorganismo la enzima KPC ha sido detectada tanto en plásmido como en cromosoma (17). Estas B- lactamasas tipo KPC se pueden difundir rápidamente debido a su localización en el plásmido, lo cual hace que el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo sea extremadamente difícil debido a su multirresistencia. (16)

En la literatura se describe que en algunos aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC la resistencia a carbapenémicos no solo es resultado de la presencia de la enzima sino que puede deberse a la combinación con otros mecanismos como defectos en la membrana externa y presencia de otras betalactamasas ya sea tipo BLEE o AmpC.(8)

4.4.4.1 Detección de carbapenemasas por el Laboratorio

El laboratorio de microbiología juega un papel muy importante en la detección y confirmación de la resistencia en *Enterobacteriaceae* a carbapenémicos, debido a su rápida diseminación y a su

dificultad para un tratamiento adecuado.

Los sistemas automatizados presentan algunas limitaciones y fracasos en la detección y confirmación de carbapenemasas, debido a que estos aislamientos pueden ser resistentes a la terapia con carbapenemes a pesar de presentar una aparente susceptibilidad basada en los puntos de corte de CLSI para estos antibióticos; por lo cual se requiere mejorar la metodología disponible para esta detección.(16)

CLSI Recomienda

Enterobacteriaceae que son resistentes a una o más cefalosporinas de tercera generación y que presentan CIM elevadas o una reducida zona de inhibición alrededor del disco para carbapenemes “puede ser un aislamiento productor de carbapenemasa” a pesar de que la CIM ó el diámetro del disco estén dentro del rango de susceptible. De igual manera CLSI recomienda realizar la prueba de tamizaje y confirmatoria de Hodge modificada la cual ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad.

De igual manera CLSI destaca que las Enterobacterias que son resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y presentan CIM a los carbapenemes (imipenem 2 a 4µg/mL, meropenem 2 a 4µg/mL y ertapenem 2µg/mL), pueden ser productoras de KPC o de otras carbapenemasas. En sitios donde es raro encontrar este tipo de carbapenemasas es importante enviar estos aislamientos a un Instituto de Referencia para su respectiva caracterización.

No es necesario probar un aislamiento para carbapenemasas realizando el Test de Hodge, cuando todos los carbapenemes reportados por el laboratorio son intermedios ó resistentes. Sin embargo el Test de Hodge puede ser útil para el control de infecciones y fines epidemiológicos.

Prueba tamiz y confirmatoria para sospecha de carbapenemasas “Test de Hodge Modificado” recomendado por CLSI

Esta prueba analiza la actividad de las enzimas tipo carbapenemasas en células intactas del microorganismo a probar.

Prueba tamiz por método de difusión en disco

- Discos de meropenem y ertapenem de 10µg
- Incubación 35±2°C en aerobiosis por 16-18horas
- Sospecha de carbapenemasa: Diámetro del halo meropenem 16-21mm
Diámetro del halo ertapenem 19-21mm
- Se debe confirmar con el test de Hodge
- No utilizar disco de imipenem porque es pobre predictor de carbapenemasas
- Control de calidad: *E. coli* ATCC 25922

Prueba tamiz por el método de microdilución en caldo

- Se utiliza imipenem, meropenem ó ertapenem de 1µg/mL
- Incubación 35±2°C en aerobiosis por 16-20horas
- Sospecha de carbapenemasa: ertapenem 2µg/mL imipenem y meropenem 2-4µg/mL

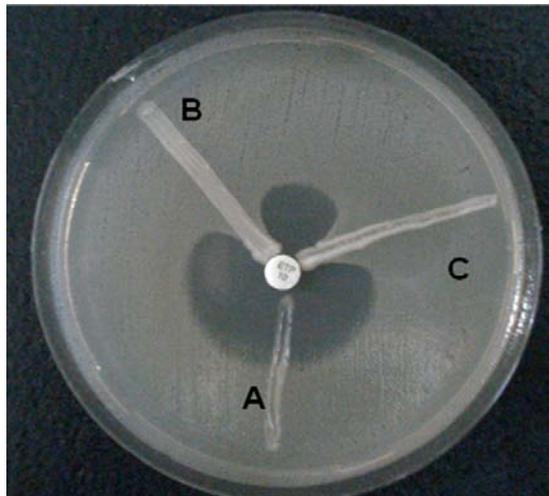
- Se debe confirmar con el test de Hodge
- Control de calidad: *E. coli* ATCC 25922

Prueba Confirmatoria CLSI

Confirmar con Test de Hodge: Cuando la prueba tamiz es positiva ó se presenta resistencia a cefalosporinas como son cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoperazona y ceftizoxima.

- Preparar una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 al 0.5 McFarland y realizar una dilución 1:10 en solución salina ó agua destilada.
- Extender el inóculo de la cepa ATCC sobre la superficie del agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco.
- Colocar el disco de ertapenem o meropenem 10µg en el centro de la placa
- Tomar de 3 a 5 colonias de un cultivo fresco del microorganismo a probar y realice una estría desde el disco hacia la periferia, que puede tener una profundidad de 20 a 25mm
- Incubación 35±2°C en aerobiosis por 16-20horas
- Resultado positivo: Hendidura en el crecimiento
- Control positivo *K.pneumoniae* BAA 1705
- Control negativo *K. pneumoniae* BAA 1706

Figura No.3 Test de Hodge Modificado



Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina .Universidad Nacional de Colombia (Bogotá)

- A. Control negativo *E. coli* ATCC 25922 (aislamiento no productor de carbapenemasas)
- B. Control positivo *K. pneumoniae* (aislamiento productor de carbapenemasa KPC-3)
- C. Aislamiento en estudio *K. pneumoniae* (resultado positivo para producción de carbapenemasa)

CLSI recomienda para el reporte

Los aislamientos positivos para el Test de Hodge pero susceptibles a carbapenemes por CIM (ertapenem $\leq 2\mu\text{g/mL}$, imipenem $\leq 4\mu\text{g/mL}$ y meropenem $\leq 4\mu\text{g/mL}$) reportar la CIM de los carbapenemes sin interpretación con el siguiente comentario “ ***Estos aislamientos demostraron producción de carbapenemasas. La eficacia clínica de los carbapenemes no ha sido establecida para el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacteriaceae donde las pruebas para carbapenemes (ertapenem $\leq 2\mu\text{g/mL}$, meropenem e imipenem $\leq 4\mu\text{g/mL}$) fueron sensibles, pero demostraron producción de carbapenemasa in vivo***”

Si el test de Hodge es negativo se informa el dato de CIM de los carbapenemes de acuerdo a los criterios de interpretación de CLSI.

Otras Pruebas

Existen otras pruebas que se pueden hacer desde el laboratorio de microbiología y recomendadas por varios autores para la detección de carbapenemasas:

Prueba alternativa sinergismo con doble disco y acido borónico

Para esta prueba se utiliza el disco de imipenem 10 μg , meropenem 10 μg ó ertapenem 10 μg y un disco blanco con 300 μg de acido borónico, previamente preparado a partir de una solución de 3-aminofenilborónico.

Se extiende la suspensión del microorganismo en una placa de Mueller Hinton, se coloca en el centro un disco en blanco con acido borónico y a una distancia de 20mm discos de ertapenem, imipenem ó meropenem.

Un resultado positivo se considera cuando hay un agrandamiento de la zona de inhibición en el área entre el carbapeneme y el disco que contiene el inhibidor.

Prueba alternativa para detección de carbapenemasa con acido borónico

La prueba de acido borónico es específica para detección de KPC en *K. pneumoniae*. (12)

En esta prueba se utiliza discos de imipenem 10 μg , meropenem 10 μg ó ertapenem 10 μg . El acido borónico es un inhibidor reversible de las enzimas tipo KPC, causando una inhibición del organismo que presenta KPC, lo cual puede ser atribuido a la presencia de solo esta carbapenemasa.(18)

Para esta prueba se utiliza ácido 3-aminofenilborónico en concentración final de 300 µg. En una placa de Agar Mueller Hinton se extiende la suspensión del microorganismo, se colocan dos discos de imipenem, meropenem ó ertapenem, y en uno de los discos del carbapenem se adiciona ácido borónico (concentración 300µg).

Se considera un resultado positivo cuando se observa un incremento ≥ 5 mm en el disco que contiene el carbapenem con el ácido borónico comparado con el disco solo del carbapenem; y con

el método de CIM una reducción de ≥ 3 diluciones.

4.4.5 Detección de Metalo β -lactamasas Clase B (grupo 3)IMP-1,VIM-1,CcrA, BcII

Estas enzimas denominadas metalo β -lactamasas (MBLs) se caracterizan por la habilidad de hidrolizar los carbapenemes y los inhibidores de β -lactámicos como ácido clavulánico y tazobactam, pero susceptibles a la inhibición por agentes quelantes como EDTA, ácido mercaptoacético y ácido mercaptopropiónico (MPA). El mecanismo de hidrólisis depende de la interacción de los β -lactámicos con iones de zinc presentes en el sitio activo de la enzima, por lo cual estas enzimas únicamente son inhibidas por quelantes de iones metálicos.(6)

Las primeras MBL descritas fueron enzimas cromosomales que se detectaron en patógenos oportunistas y microorganismos ambientales como: *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp y *Stenotrophomonas maltophilia*. Con el tiempo se ha incrementado y diseminado estas enzimas MBL, las cuales se encontraban dentro de integrones que se empezaron a asociar con plásmidos y transposones haciendo más fácil la transferencia de esta resistencia entre bacterias. (16)

De las MBL transmisibles se han reportado enzimas de las familias VIM, IMP, GIM, SIM, SPM y la más reciente es la enzima AIM-1, de estas enzimas las familias con más variantes son las familias IMP y VIM, las cuales han sido reportadas en gram negativos tanto fermentadores como no fermentadores. Mientras que las familias GIM, SPM, y AIM han sido reportadas en *P. aeruginosa* y la SIM en *A. baumannii*.

4.4.5.1 Detección de Metalo β -lactamasas por el laboratorio

CLSI no tiene ningún procedimiento estandarizado para la detección de metalo β -lactamasas sin embargo algunos autores han descrito técnicas que pueden facilitar la detección de este mecanismo por el laboratorio:

E test para detección MBLs

Utilizando una tira de E-Test impregnada en un extremo con imipenem en el otro extremo con imipenem-EDTA. Se sigue el mismo procedimiento estandarizado por CLSI para la técnica de difusión en disco.

Esta prueba tiene algunas limitaciones porque no detecta MBLs de todos los miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* y puede dar falsos positivos en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Una reducción de la CIM ≥ 3 diluciones en presencia de EDTA es interpretado como sugestivo de producción de MBLs. La presencia de una zona fantasma entre los dos gradientes ó deformación en la elipse de imipenem es también considerado indicativo de presencia de MBLs.

Prueba de sinergismo

Teniendo en cuenta la capacidad de los quelantes para interactuar con el Zn del sitio activo, muchos ensayos fenotípicos han sido empleados en la detección de MBLs; sin embargo ningún método ha sido lo suficientemente estandarizado.

Esta técnica se basa en el método de difusión en disco, se realiza una suspensión de la bacteria sobre el Agar Mueller Hinton, se colocan dos discos de imipenem y dos de meropenem de 10µg, se

adiciona EDTA sobre uno de los disco de imipenem y de meropenem.

La presencia de una zona sinérgica de inhibición o agrandamiento de diámetro en el halo de inhibición del disco del antibiótico hacia el disco con inhibidores es considerada positiva.

Las pruebas que involucran varios agentes quelantes como EDTA y MPA han tenido una buena sensibilidad debido a que los quelantes son inhibidores específicos de MBLs; no siempre un solo agente quelante puede no inhibir todas las MBLs en ciertos patógenos, haciendo necesario el uso de una mezcla de quelantes para una confiable detección.(19)

Esta técnica ha sido validada con *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, mientras que es más limitada para Enterobacterias y bacterias gram negativas. (20)

4.4.6 Detección de β lactamasas tipo Oxacilinas Clase D (grupo 2d) OXA-1, OXA-10

Las β-lactamasas tipo OXA son enzimas dependientes de serina, este es un grupo de enzimas con gran diversidad, en el encontramos β-lactamasas con espectro de hidrolisis amplio las cuales son resistentes a penicilinas y cefalosporinas o β-lactamasas con espectro de hidrólisis expandido, las cuales pueden hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemes. Las β-lactamasas tipo OXA no son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam ni sulbactam, sin embargo su actividad puede ser inhibida in vitro por el cloruro de sodio (NaCl) (21).

La mayoría de los genes de la β-lactamasa Clase C, han sido identificados en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* en plásmidos transferibles. Algunos genes encontrados en *P. aeruginosa* han sido localizados cromosomalmente como son los que codifican para OXA-13 y OXA-17, OXA-18 y OXA-20 (21). La gran mayoría de carbapenemasas tipo OXA han sido detectadas en *Acinetobacter* sp en especial en *A. baumannii* y solo unas pocos aislamientos de *P. aeruginosa* y *Proteus* sp, la primera carbapenemasa tipo OXA detectada fue OXA-23 o ARI-1, descrita en 1993 en una cepa de *A. baumannii* aislada en 1985.

Las enzimas tipo OXA, están formadas por variantes, hasta el momento han sido descritas cerca de 31 variantes, las cuales se han clasificado de acuerdo a su secuencia de aminoácidos en 4 subgrupos (subgrupo 1 o tipo OXA-23, subgrupo 2 o tipo OXA-24, subgrupo 3 o tipo OXA-51 y subgrupo 4 o tipo OXA-58), el mas grande es el subgrupo 3, el cual es intrínseco en *A. baumannii*, mientras que los subgrupos restantes son adquiridos.

OXA-1: El gen *bla*_{OXA-1} ha sido identificado en Enterobacterias resistentes a ampicilina como son *E. coli*, *Shigella flexneri* y *Salmonella* spp, este gen esta asociado con genes que codifican β-

lactamasas de espectro extendido (BLEE), incluso actualmente se ha encontrado asociada a CTX_M-15 de diseminación mundial. OXA-1 tiene la capacidad de hidrolizar cefepime y ligeramente ceftiofeno.

OXA-2: El gen *bla*_{OXA-2} ha sido identificada en *P. aeruginosa* y *S. Typhimurium* productores de BLEE tipo PER-1. También se ha encontrado en varias partes del mundo en aislamientos de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Morganella morganii*

OXA-3: Las β -lactamasas tipo OXA-3 tienen la habilidad de hidrolizar cefalosporinas, cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam. El gen *bla*_{OXA-10} se encuentra en una gran variedad de especies de

bacterias gram negativas principalmente en *P. aeruginosa*.

OXA-9: El gen *bla*_{OXA-9} fue primero identificado en un plásmido de *K. pneumoniae*; posteriormente se encontró en aislamientos de *P. aeruginosa*, coexpresando la metalo β -lactamasa VIM-2, en *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*.

OXA-58: El gen *bla*_{OXA-58} se identificó en aislamientos de *Acinetobacter* spp y ha sido asociado con una variedad de estructuras genéticas.(8)

OXA –ES Adquiridas: enzimas capaces de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido, algunas de las enzimas de este subgrupo son derivadas de enzimas OXAs de amplio espectro y difieren en su cadena de aminoácidos por puntos de mutación como por ejemplo la OXA-11 identificada en *P. aeruginosa* que varía por dos sustituciones en su cadena de aminoácidos de la OXA-10. Por el contrario otras enzimas OXA-ES no son relacionadas con las enzimas OXAs de amplio espectro como la OXA-18 de *P. aeruginosa*.

OXA tipo carbapenemasas: En su mayoría han sido descritas en *Acinetobacter* spp, este grupo de enzimas a su vez ha sido clasificado en cuatro subgrupos: subgrupo 1 o enzimas tipo OXA-23 (OXA-23, OXA-27, OXA- 49, OXA-73, OXA-102, OXA-103 y OXA-105), subgrupo 2 o enzimas tipo OXA-24 (OXA-24/40, OXA-25, OXA-26, OXA-72), subgrupo 3 o enzimas tipo OXA-51 enzimas de ocurrencia natural en *A. baumannii* (OXA-51, OXA-65, OXA-68, OXA-69 entre otras) este es el subgrupo mas grande y se conforma por cerca de 45 variantes las cuales son de tipo cromosomal Subgrupo 4 o enzimas tipo OXA-58 (OXA-58, OXA-96 y OXA-97), las enzimas de los subgrupos 1,2 y 4 han sido asociadas a elementos genéticos móviles como plásmido y secuencias de inserción (21). Otras OXA tipo carbapenemasas son la enzima OXA-143 reportada recientemente en *A. baumannii* y la OXA-48 reportada en *Klebsiella pneumoniae*(21)

4.4.6.1 Detección de β lactamasas tipo Oxacilinasas por el laboratorio

Uno de las mayores preocupaciones para controlar la diseminación de las β -lactamasas Clase D es la ausencia de pruebas fenotípicas que podrían contribuir a su detección por el laboratorio, debido a que CLSI no tiene estandarizada ninguna prueba para su detección.

Por ejemplo la OXA-13 y OXA-19 ambas poseen la habilidad de ser inhibidas por imipenem; una vez que la enzima se produce en aislamientos de *P. aeruginosa*, se puede colocar un disco de imipenem al lado de un disco de cefsulodin. También se ha observado que esta actividad la comparten otras β -lactamasas de la Clase D como son OXA-10.(21). Sin embargo la dificultad de la detección de las OXA radica en que algunas de ellas son inhibidas por el ácido clavulánico ó tazobactam como la OXA-12, OXA-18, OXA-45 y OXA-46 de *P.aeruginosa* y al utilizar la prueba de sinergismo con el ácido clavulánico pueden llegar a confundirse con presencia de BLEE.

Algunos autores sugieren para su detección por el laboratorio utilizar análisis espectrofotométricos con extractos celulares y en presencia de NaCl.

4.4.7 Detección de Resistencia a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos como son amikacina, gentamicina, tobramicina son generalmente activos contra *Enterobacteriaceae*

La resistencia adquirida a los aminoglucósidos se debe a 3 mecanismos básicos:

- **Presencia de enzimas que modifican aminoglucósidos:** Es el mecanismo más común y ha sido detectado en diferentes bacilos gramnegativos. Se trata de diversas enzimas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) que modifican grupos sustituyentes de la molécula, lo que resulta en un compuesto de baja afinidad por el ribosoma bacteriano. Además no ocurre la segunda fase de ingreso acelerado de la droga a la célula. Los genes que codifican estas enzimas en general se encuentran en plásmidos, lo que permite la transferencia de los mismos a otra bacteria.
- **Alteraciones en los sitios de unión:** Se debe a mutaciones en los genes que codifican los sitios de unión a estas drogas. Es un mecanismo poco frecuente y ha sido hallado en *E. coli*
- **Disminución del ingreso:** Determinado por alteraciones a nivel de la membrana externa para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, que dificultan la entrada de la droga a la bacteria (22).

CLSI recomienda

Para aislamientos de *Salmonella* spp y *Shigella* spp, los aminoglucósidos pueden ser activos *in vitro* pero no son efectivos clínicamente, y pueden no ser reportados como susceptibles.

4.4.8 Detección de Resistencia a Quinolonas

Las quinolonas son activas frente a las bacterias gramnegativas y han sido ampliamente utilizadas por su actividad bactericida desde la introducción de la ciprofloxacina en 1987; sin embargo el uso de quinonas se ha incrementado y han empezado a aparecer cepas resistentes a este antimicrobiano.(22)

CLSI recomienda

Aislamientos de *Salmonella* spp susceptibles a fluoroquinolonas y con una prueba a ácido nalidixico resistente pueden estar asociados con fracaso clínico ó respuesta tardía en pacientes tratados con fluoroquinolonas con salmonelosis extraintestinal. **“aislamientos extraintestinales de *Salmonella* extraintestinal pueden ser probados para determinar resistencia a ácido nalidixico”**

4.4.9 Detección de Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

Este microorganismo es intrínsecamente resistente a penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y trimetoprim sulfamtozazole.(2)

Pseudomonas aeruginosa es considerado un patógeno oportunista y causa frecuente de infecciones de origen hospitalario con un gran incremento en la tasa de colonización. Debido a que estos microorganismos pueden presentar multirresistencia a diferentes antimicrobianos, se hace necesario trata estas infecciones con más de un antimicrobiano.(2)

Los mecanismos de resistencia en este patógeno se basan en mutaciones en los genes codificantes o reguladores de los mecanismos involucrados en su resistencia natural o a través de la adquisición de determinantes genéticos de enzimas con capacidad de hidrolizar al antibiótico. Entre los más observados: el incremento en la expresión de los sistemas de eflujo MexABOprM, la pérdida de la porina transmembrana OprD (impermeabilidad), la hiperproducción de enzimas de

tipo AmpC, la adquisición de genes codificantes de beta-lactamasas (MBLs y BLEE) (24).

4.4.10 Detección de Resistencia en *Acinetobacter spp*

Acinetobacter spp. es un patógenos oportunistas frecuentemente asociado con brotes de infecciones intrahospitalarias, particularmente entre pacientes con compromiso inmune. Tienen varios mecanismos de resistencia incluyendo β lactamasas, ~~acarato~~ las proteínas de membrana y bombas de eflujo.(2)

4.4.11 Detección de Resistencia en *Stenotrophomonas maltophilia*

Es un patógeno oportunista con amplio espectro de síndromes clínicos como son bacteremia, endocarditis, pacientes con cáncer, infección del tracto respiratorio y fibrosis quística. Se caracteriza por su resistencia intrínseca a β -lactámicos y carbapenemes, también presenta resistencia a aminoglucósidos y es sensible a fluoroquinolonas y al cotrimoxazol. Esta resistencia es debida en parte a la presencia de genes que codifican enzimas que inactivan los antibióticos y multirresistencia mediada por bombas de eflujo. Posee una proteína *Onr* que contribuye a la resistencia intrínseca a quiniolonas.(23)

Su tratamiento de elección sigue siendo trimetoprim sulfametoxazol a pesar del incremento en su resistencia.

Debido a su lento crecimiento y a su elevada tasa de mutación puede desarrollar rápidamente resistencia adquirida frente a varias clases de antimicrobianos, principalmente por presión selectiva de éstos, lo que puede dar lugar en ocasiones a discordancias entre los resultados de sensibilidad in vitro y la evolución clínica. Por otra parte, no existe ningún método estandarizado para la determinación de la sensibilidad de este microorganismo, y se han descrito problemas con el método de difusión en disco frente a ciprofoxacina y trimetoprim sulfametoxazol; no obstante, son preferibles el método de dilución en agar, microdilución en caldo y E-test. (2)

4.5 Panorama Global de la Resistencia en Gram negativos

La resistencia bacteriana a antimicrobianos se ha convertido en un problema emergente a nivel mundial. Se ha observado un incremento notable en la resistencia en Enterobacterias y *Acinetobacter baumannii* principalmente a cefalosporinas y fluoroquinolonas; sin embargo esto hace parte del fenómeno perjudicial inducido por el uso indiscriminado de antibióticos.(24)

Los datos del sistema de vigilancia Europeo muestran que la resistencia a tres clases de antibiótico en *Klebsiella spp* es más común que la resistencia solo a una o dos clases de antibióticos. Durante la pasada década se ha incrementado la resistencia a cefalosporinas a tal punto que ahora no es seguro utilizar estos antibióticos para infecciones severas. (25)

En microorganismos como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* es muy preocupante la tendencia que se ha observado en las últimas dos décadas, con el desarrollo de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido (cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona), esta resistencia puede ser mediada por plásmidos ó por hiperproducción cromosomal de AmpC. (3)

En el año 2007 en el Reino Unido las bacteriemias causadas por *E. coli* y *Klebsiella spp* presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación en un 12% y 14% respectivamente, comparado con un 2% y 6% observado en el año 2000. La resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* incremento de 5% a 23% en el año 2007.(24)

Estudios ha mostrado que un tercio de las Enterobacterias y especies relacionadas presentan resistencia a cefalosporinas por la presencia de β -lactamasas en la comunidad. En varios estudios se han descrito los factores de riesgo para tener una infección por bacterias productoras de BLEE, como son la estancia hospitalaria, severidad de la infección, tiempo en la unidad de cuidados intensivos, intubación, ventilación mecánica, presencia de catéter y exposición a antibióticos. (24)

Estudios de vigilancia de la susceptibilidad antimicrobiana, han demostrado que la mayoría de las *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE, son sensibles a carbapenemes. Sin embargo la resistencia en bacterias gram negativas ha evolucionado significativamente y se pueden observar diferentes niveles de resistencia que puede variar de una región a otra.

El Programa para el Monitoreo de la resistencia antimicrobiana de la Región Asia-Pacífico (SMART) muestran una frecuencia de BLEE para *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* de 40%, comparada con 30% en América Latina, 17% en Oriente medio y Africa, 10% en Europa y 8% en Norte América. (26)

Debido a la dificultad de tratar a los pacientes que presentaban resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, se empezó a incrementar el uso de antibióticos carbapenémicos como último recurso terapéutico para tratar estas infecciones; sin embargo la resistencia a carbapenemes en

Enterobacterias empezó a surgir y se han reportado recientemente brotes de Enterobacterias resistentes a carbapenemes. (27).

Es importante destacar la rápida diseminación de resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* y *E. coli* a nivel mundial. En un brote reportado en New York, 600 *K. pneumoniae* fueron caracterizadas, y se observó que la mitad de los aislamientos eran productores de BLEE y de estos 3,3% fueron resistentes a carbapenemes.

Para el año 2007 Reino Unido a través del Centro para el monitoreo de resistencia a antibióticos y laboratorio de referencia (ARMRL) reportó 8 aislamientos productores de carbapenemasa; para el año 2008 este número se duplicó y se reportaron 17 aislamientos, aunque el número sigue siendo bajo, indica que el sistema de vigilancia no muy activo para la detección de carbapenemasas. (24)

El sistema de vigilancia europeo (EARRS) tiene reportes de los años anteriores al 2006, de una tasa de 0.3% de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemes proveniente de muestras de sangre; la diseminación de estos aislamientos fue tan rápida que permitió un incremento en la resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* de 11% en el año 2006 a 22% en el 2007. (27).

De acuerdo a la información del grupo GREBO de los resultados de la vigilancia de la resistencia año 2008-2009 que incluye 35 instituciones, se observó que *E. coli* en el servicio de NO UCI presentó una resistencia a carbapenemes entre 0.3% y 0.5% mientras que para el servicio de no UCI no se presentó resistencia. En *K. pneumoniae* se observó una resistencia que oscila entre 3.2% y 5.8%. (28)

En el año 2008 en un estudio realizado con 13 instituciones de tercer nivel de Colombia, realizado por el Grupo GREBO, se observó que de 144 aislamientos recibidos de *K. pneumoniae*, 10 (14,4%) eran portadores de KPC. (28)

4.6 Detección Molecular de la Resistencia en Gram negativos

4.6.1 Detección Molecular para BLEE

Aunque las pruebas fenotípicas para BLEE nos permiten establecer la expresión de estas enzimas en los aislamientos, no nos permite determinar que tipo de enzima BLEE poseen, siendo necesario el uso de técnicas moleculares para esta detección, de las cuales la reacción en cadena de la polimerasa PCR es considerada como el gold estándar para determinar que gen o genes *bla* del tipo BLEE (*bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV o *bla*OXA) poseen los aislamientos en estudio (33), actualmente en la literatura hay descritos diferentes ensayos de PCR para esta detección, de los cuales la PCR multiplex son las más utilizadas ya que en un solo ensayo nos permite estudiar los diferentes genes *bla* que codifican enzimas BLEE (33-35), sin embargo para establecer que variante de las enzimas posee el aislamiento es necesario realizar secuenciación.

4.6.2 Detección Molecular para AmpC

Debido a que las pruebas fenotípicas no permiten determinar las diferentes enzimas AmpC mediadas por plásmidos, es necesario realizar técnicas moleculares para esta detección, siendo

considerada como el gold estándar la PCR; actualmente existen diferentes ensayos de PCR multiplex para esta detección como el descrito por Perez (36), sin embargo para establecer que variante de las enzimas posee el aislamiento es necesario realizar secuenciación. Por otra parte, si se desea evaluar la expresión del gen AmpC es necesario realizar una PCR transcriptasa Reversa en tiempo real (RT-PCR) (ver glosario) (37)

4.6.3 Detección Molecular de Carbapenemasas

Aunque las pruebas fenotípicas para detección de carbapenemasas nos orientan acerca de la expresión de estas enzimas, es necesario confirmar la presencia del gen que codifica la carbapenemasa y determinar a tipo de carbapenemasas clase A pertenece para esto es necesario recurrir a herramientas moleculares como la PCR y a la posterior secuenciación del amplificado obtenido para determinar la variante de la carbapenemasa que posee el aislamiento. En la actualidad hay ensayos de PCR simple (30), sin embargo debido a que algunas pruebas fenotípicas solo nos permiten establecer la presencia de carbapenemasas sin definir si son de la clase A o B, actualmente se ha propuesto una PCR multiplex que nos permite determinar la presencia del gen *blaKPC*, *blaVIM* o *blaIMP* (38).

4.6.4 Detección Molecular de Metalo β -lactamasas

Las pruebas fenotípicas nos permiten determinar la presencia de carbapenemasas tipo metaloenzimas, para establecer que familia de carbapenemasas clase B que posee el aislamiento es necesario utilizar PCR. Actualmente existen ensayos de PCR multiplex que nos permiten la detección de *blaVIM* y *blaIMP* que son las familias más frecuentemente encontradas, sin embargo

se pueden evaluar las otras familias a través de PCR simple (38, 39).

4.6.5 Detección Molecular de β lactamasas tipo Oxacilinasa

La PCR sigue siendo la prueba de oro para la detección de este tipo de β -lactamasas, dentro de los ensayos de PCR descritos tenemos el de Woodford et al una PCR multiplex que permite la detección de los 4 subgrupos de carbapenemasas tipo OXA descritos en *Acinetobacter spp* (34).

4.7 Técnicas moleculares para detección de genes codificantes de betalactamasas en Gram negativos

Para la detección molecular de genes codificantes de betalactamasas el método estándar y convencionalmente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) ya sea la PCR de tipo convencional o la variante PCR en tiempo real, sin embargo la técnica PCR por sí misma no nos permite establecer a que variante pertenece la betalactamasa detectada por lo cual si usted desea genotipificar la enzima es necesario realizar la secuenciación del producto de amplificación considerada la técnica gold standard para conocer la secuencia de aminoácidos de la enzima en estudio

Sin embargo existen otros métodos que no usan la secuenciación para identificar la variante de las betalactamasas como son: análisis del polimorfismo del gen amplificado por PCR (PCR-RFLP)(29, 30), análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de ADN (SSCP por las siglas del inglés: Single Strand Chain Polymorphism), reacción en cadena ligasa(31), ensayos de restricción del producto de amplificación (32) y microarreglos. (ver glosario)

4.7.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica que permite la síntesis in vitro de grandes cantidades de un segmento o secuencia blanco de ácido nucleico. El procedimiento requiere ADN del organismo en estudio, dos oligonucleótidos iniciadores específicos (forward y reverse) diseñados para flanquear la secuencia en estudio en el ADN molde y una ADN polimerasa estable al calor. La reacción requiere de ciclos repetidos de tres pasos que incluyen cambios en temperatura para la denaturación del ácido nucleico, alineación y extensión (42)

En la PCR se puede analizar un único gen o segmento de ácido nucleico lo que se conoce como PCR simple, sin embargo para incrementar la eficiencia de la PCR y reducir costos es posible analizar diferentes genes en una sola reacción lo que se conoce como PCR múltiplex. En una PCR múltiplex es clave tener en cuenta los siguientes parámetros, el primero es el diseño de los oligonucleótidos

iniciadores, los cuales deben tener una óptima temperatura de alineación que debe ser muy cercana entre ellos y el segundo es que los productos de amplificación que se producen en la reacción deben tener unos tamaños diferentes para facilitar su interpretación en el momento del análisis (42).

4.7.1.1 Evaluación de productos obtenidos en una PCR convencional

En una PCR convencional la detección de los fragmentos de amplificación obtenidos son evaluados por electroforesis en geles de agarosa y visualizados a través de tinciones como bromuro de etidio o SYBR GREEN, sin embargo también pueden ser evaluados por hibridación utilizando sondas específicas (técnica Hyplex) .

Ejemplo PCR Simple:

A continuación se muestra un ejemplo de una PCR simple para la detección del gen *blaKPC* en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemes, positivos para la prueba de Hodge y negativos para prueba fenotípica de metaloenzimas.

1. Se utiliza un solo juego de oligonucleótidos iniciadores uno forward y uno reverse los cuales flanquean el gen *blaKPC* y permiten establecer su presencia:

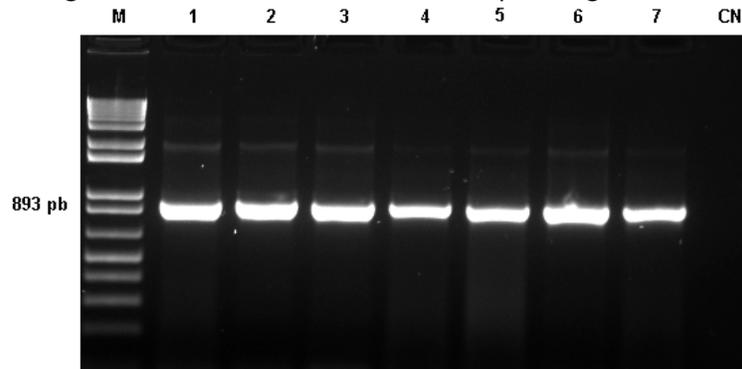
blaKPC Forward (5' ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT 3')

blaKPC Reverse (5' TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC 3') (30)

El tamaño del fragmento esperado es de 893pb

2. Posterior a la realización de la PCR los productos de amplificación se evalúan por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Figura No 4. Gel de electroforesis PCR para el gen *blaKPC*



Laboratorio de microbiología Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia
 M: Marcador de peso molecular 1 Kb Invitrogen
 1 a 7: Muestras positivas para el gen *blaKPC*
 CN: Control negativo

3. En la fotografía se visualiza la presencia de productos de amplificación, que cumplen con el tamaño esperado
4. El resultado que reportamos es aislamientos de *K. pneumoniae* positivos para el gen *blaKPC* sin establecer la variante de la enzima que poseen estos aislamientos, para esto es necesario realizar una reacción de secuenciación del producto de amplificación.

Ejemplo de PCR Multiplex:

A continuación se muestra un ejemplo de una PCR multiplex para detectar los genes codificantes de carbapenemasas tipo OXA en aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos.

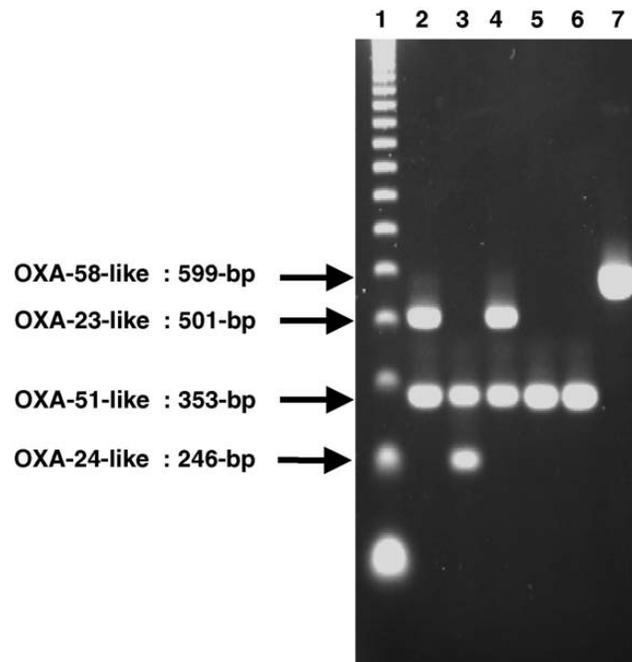
Se utilizara cuatro juegos de oligonucleótidos iniciadores cada uno con su forward y su reverse los cuales flanquearan los genes *blaOXA-23-like*, *blaOXA-24-Like*, *blaOXA-51-Like* y *blaOXA-58-Like*, para establecer que carbapenemasas tipo OXA tienen los aislamientos en estudio.

NOMBRE DE INICIADOR	SECUENCIA DE INICIADORES	TAMAÑO
<i>blaOXA-23-like</i>	Forward 5' GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA 3' Reverse 5'ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT 3'	501 pb
<i>blaOXA-24-Like</i>	Forward 5'GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA 3' Reverse 5' AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT 3'	246 pb
<i>blaOXA-51-Like</i>	Forward 5' TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG 3' Reverse 5'TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG 3'	353 pb
<i>blaOXA-58-Like</i>	Forward 5'AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG 3' Reverse 5' CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC 3'	599pb

(30)

Posterior a la realización de la PCR los productos de amplificación se evalúan por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Figura No. 5. Gel de electroforesis de PCR múltiplex para genes de carbapenemasas tipo OXA



Fotografía tomada Woorford 2006

- Muestra 1: Marcador de peso molecular
Muestra 2: aislamiento positivo para OXA-23-Like y OXA-51-Like.
Muestra 3: aislamiento positivo para OXA-24-Like y OXA-51-Like.
Muestra 4: aislamiento positivo para OXA-23-Like y OXA-51-Like.
Muestra 5: aislamiento positivo para OXA-51-Like
Muestra 6: aislamiento positivo para OXA-51-Like
Muestra 7: aislamiento positivo para OXA-58-Like

1. El resultado que reportamos en los aislamientos de *A. baumannii* analizados es:
 - Aislamientos 2 y 4 positivos para carbapenemasas del subgrupo OXA-23 Like y a la carbapenemasa de ocurrencia natural OXA-51 Like.
 - Aislamiento 3 positivo para carbapenemasas del subgrupo OXA-24 Like y a la carbapenemasa de ocurrencia natural OXA-51 like.
 - Aislamiento 5 y 6 positivo para carbapenemasa de ocurrencia natural OXA-51 like.
 - Aislamiento 7 positivo para carbapenemasa OXA-58 like.
2. Sin embargo para determinar específicamente que enzima OXA tipo carbapenemasa de cada subgrupo poseen los aislamientos en estudio es necesario realizar una reacción de secuenciación del producto de amplificación

4.7.1.2 Secuenciación:

Técnica utilizada para determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN en estudio. Esta técnica es considerada el gold estándar en la caracterización de secuencias de nucleótidos ya que nos permite detectar diferentes variantes de un gen que presenten desde un cambio en un nucleótido. Para realizar la secuenciación de ADN es necesario emplear los oligonucleótidos iniciadores (Forward y Reverse) que permitan amplificar y secuenciar el fragmento de ADN de interés, para analizar los resultados obtenidos de la secuenciación se requiere el uso de herramientas bioinformáticas para establecer los nucleótidos y la identidad de la secuencia evaluada (en el caso de las betalactamasas por ejemplo si sabemos que tenemos un amplimero del gen blaKPC posterior a la secuenciación podemos especificar que el aislamiento es portador de la enzima KPC variante 3 o KPC-3).

5 DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS

5.1 Generalidades

La amenaza emergente de la resistencia antimicrobiana en bacterias gram positivas se ha observado a nivel mundial; estos patógenos se encuentran implicados en infecciones hospitalarias y con frecuencia causantes de brotes. El manejo de esta resistencia a múltiples antimicrobianos implica un costo mayor en la salud, debido a que se requiere tomar medidas de prevención y control a nivel hospitalario.

Las infecciones son la causa más frecuente de muerte en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCI), los microorganismos causantes de estas infecciones han ido cambiando y desde los años 80 los Gram positivos son los agentes más comúnmente encontrados, dentro de los que se destacan *S. aureus* y *S. viridans*, principalmente en salas, *Staphylococcus* coagulasa negativa que se encuentran con frecuencia en cultivos de sangre de pacientes de UCI, y *Enterococcus* spp se puede aislar de pacientes de UCI ó de sala de cirugía. Este ultimo presenta una Resistencia creciente a los antimicrobianos incluyendo la vancomicina, lo que ha hecho más difícil el tratamiento de este tipo de infecciones. (43)

La utilización de catéteres intravasculares y sondas urinarias, favorecen las infecciones por gérmenes gram positivos como es el caso de *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.

Por otra parte es importante mencionar la presencia de *Streptococcus pneumoniae*, de diseminación mundial con clones multirresistentes a betalactámicos, macrólidos, trimetoprim sulfametoxazole, macrólidos y tetraciclina

5.2 Selección de antimicrobianos para Gram positivos

A continuación se presentará la lista de antimicrobianos de mayor importancia para el grupo de bacterias Gram positivas, de acuerdo a la norma CLSI M100-S20 2010.

Tabla No.7 Selección de antibióticos *S. aureus* y *Enterococcus* sp

<i>S. aureus</i>		<i>Enterococcus</i> sp
Reporte	Grupo de antimicrobianos	
GRUPO A PROBAR Y REPORTAR PRIMARIAMENTE	Azitromicina Claritromicina Eritromicina	Ampicilina
	Clindamicina	
	Oxacilina	Penicilina
	Penicilina	
	Trimetoprim sulfametoxazol	
GRUPO B PROBAR PRIMARIAMENTE Y REPORTAR SELECTIVAMENTE	*Daptomicina	*Daptomicina
	Linezolid	Linezolid
	Telitromicina	Quinuspristin dalfopristin
	Doxiciclina Tetraciclina Vancomicina	Vancomicina
	Rifampicina	
	Cloranfenicol	
GRUPO C COMPLEMENTARIOS REPORTAR SELECTIVAMENTE	Ciprofloxacina ó Levofloxacina u Ofloxacina Moxifloxacina	Gentamicina de alta carga
	Gentamicina	Estreptomina de alta carga
	Quinuspristin dalfopristin	
	Lomefloxacina Norfloxacina	Ciprofloxacina Levofloxacina Norfloxacina
	Nitrofurantoina	Nitrofurantoina
	Sulfisoxazol	Tetraciclina
	Trimetoprim	

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

*Solamente se realiza CIM, difusión en disco no es confiable

Tabla No.8 Selección de antibióticos *S. pneumoniae*, *Streptococcus* Grupo β hemólito y *Streptococcus* Grupo viridans

<i>S. pneumoniae</i>		<i>Streptococcus</i> spp Grupo β hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp Grupo viridans
Reporte	Grupo de antimicrobianos		
GRUPO A PROBAR Y REPORTAR PRIMARIAMENTE	Eritromicina	Clindamicina Eritromicina	
	Penicilina (disco Oxacilina)	Penicilina ó Ampicilina	*Ampicilina *Penicilina
	Trimetoprim sulfametoxazol		
GRUPO B PROBAR PRIMARIAMENTE Y REPORTAR SELECTIVAMENTE	*Cefepime *Cefotaxima *Ceftriaxona	Cefepime ó Cefotaxima ó Ceftriaxona	Cefepime ó Cefotaxima ó Ceftriaxona
	Clindamicina		
	Gemifloxacina Levofloxacina Moxifloxacina Ofloxacina		
	Doxiciclina Tetraciclina		
	*Meropenem	Vancomicina	Vancomicina
	Telitromicina		
	Tetraciclina		
	Vancomicina		
GRUPO C COMPLEMENTARIOS REPORTAR SELECTIVAMENTE	*Amoxicilina *Amoxicilina clavulánico	Cloranfenicol	Cloranfenicol
	*Cefuroxima	*Daptomicina	Clindamicina
	Cloranfenicol	Levofloxacina Ofloxacina	
	*Ertapenem *Imipenem	Linezolid	Eritromicina
	Linezolid		
	Rifampicina	Quinuspristin Dalfopristin	Linezolid

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

*Solamente se realiza CIM, difusión en disco no es confiable

5.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en Gram positivos

- a. Alteración y producción de nuevas proteínas con baja afinidad de unión de los antibióticos (por ejemplo producción de proteínas de unión a la penicilina (PBPs) alteradas)
- b. Expresión de enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos, inactivándolos. Estas enzimas pueden ser plasmídicas, inducibles y extracelulares.
- c. Alteraciones de la estructura del antibiótico o del sitio blanco de acción por medio de la adición de grupos prostéticos (metilaciones, fosforilaciones o adenilaciones)
- d. Expulsión del antibiótico desde el interior de la célula bacteriana por medio de bombas de eflujo, lo cual evita que el antibiótico alcance el sitio blanco de inhibición. (44)

5.4 Detección de la Resistencia en Gram positivos

5.4.1 *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (CoNS)

S. aureus puede causar una gran variedad de infecciones tanto en individuos sanos como en inmunodeficientes. A nivel hospitalario es la principal causa de infecciones quirúrgicas cardiovasculares y del tracto respiratorio bajo. Es un patógeno que puede colonizar la piel y las fosas nasales facilitando su transmisión en particular en ambientes hospitalarios.

Históricamente, los antibióticos β -lactámicos han presentado buena actividad frente a *S. aureus*, convirtiéndose en los agentes de primera elección para el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus*. Sin embargo con la presión selectiva ejercida por el uso de estos antimicrobianos, se empezó a reflejar muy temprano la aparición de resistencia en *Staphylococcus spp.*, seguida por la resistencia a otras clases de antibióticos.(45)

El primer caso de *S. aureus* metilino resistentes (MRSA) fue reportado en Reino Unido en 1961, después de la introducción de la metilina; el primer reporte de MRSA en USA fue en 1968 y en ese mismo periodo de tiempo se empezaron a reportar brotes de infección nosocomial en diferentes países principalmente en la unidad de cuidados intensivos, posteriormente empezó a aparecer MRSA en la comunidad.(46)

La preocupación actualmente es el incremento de MRSA en hospitales y comunidad asociado a infecciones. El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos β -lactámicos con simultánea resistencia a otros agentes antimicrobianos, plantea un gran desafío en la prevención y al tratamiento de las infecciones *S. aureus*.(45)

Staphylococcus coagulasa negativa (CoNS) son habitantes normales de la piel, membranas mucosas y el tracto urinario humano, su aislamiento en los cultivos por lo general indica contaminación. Pero estos pueden ser patógenos en pacientes con inmunodeficiencias y en aquellos con catéteres intravenosos y dispositivos médicos. El primer reporte de un aislamiento causando septicemia fue publicado en 1958 (47). también han sido relacionados con endocarditis, infecciones del tracto urinario e infecciones de sitio quirúrgico(48). Los pacientes con infecciones causadas por CoNS por lo general presentan factores de riesgo como inmunocompromiso y uso de dispositivos. La distinción entre aislamientos de relevancia clínica, patogenicidad y contaminación es difícil y aun en la actualidad sigue siendo complicada.

A pesar de que hay muchas especies de CoNS, el que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas es *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* una causa importante de infecciones urinarias agudas no complicadas. Los CoNS aislados son típicamente más resistentes que *S. aureus* a agentes antimicrobianos con una prevalencia de resistencia a los beta-lactámicos que llega al 60-70%. Por ende, la vancomicina se usa con frecuencia para tratar las infecciones por CoNS. (4)

Actualmente han sido identificadas 37 especies de CoNS de las cuales 16 han sido reportadas de origen humano (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. xylois*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*) (49). La especie de CoNS más frecuentemente encontrada es *S. epidermidis* y se asocia principalmente a bacteriemia nosocomial, heridas quirúrgicas, catéteres intravasculares y dispositivos protésicos (50).

5.4.1.1 Detección de la Resistencia a Penicilina en *Staphylococcus* spp

Se recomienda realizar la prueba utilizando el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton, siguiendo las recomendaciones de CLSI, con un disco de penicilina de 10U en vez del disco de ampicilina para *Staphylococcus*.

Staphylococcus susceptibles a penicilina son también susceptibles a otras penicilinas, combinaciones de inhibidores de β lactámicos, cefems y carbapenems aprobados por FDA para infecciones por *Staphylococcus*. Aislamientos resistentes a penicilina y susceptibles a oxacilina son susceptibles a penicilinas lábil a penicilinas pero resistentes a otras penicilinas estable a penicilina y combinaciones de inhibidores de β lactámicos cefems y carbapenems. *Staphylococcus* resistentes a oxacilina son resistentes a los antimicrobianos β láctamicos **con la excepción de las nuevas cefalosporinas con actividad anti MRSA**. Esta susceptibilidad o resistencia a una amplia variedad de β lactámicos puede ser deducido de la prueba solo con penicilina, **ó cualquiera de los dos cefoxitin u oxacilina**. (1)

Si una penicilinas estable a penicilina es probada, el agente de elección es la oxacilina y los resultados se pueden aplicar a otras penicilinas estables como son cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, metilina y nafcilina. (1)

CLSI recomienda

Prueba de β -lactamasa inducida puede ser realizado en *Staphylococcus* con una CIM a penicilina $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ ó diámetro del halo ≥ 29 mm antes de reportar el aislamiento como susceptible a penicilina.

Sin embargo la prevalencia de *S.aureus* susceptible a penicilina es baja, aislamientos que son susceptibles a penicilina pueden producir una β lactamasa, que solamente puede ser detectada con una prueba de β lactamasa inducida- Algunos aislamientos ocasionalmente no son detectados con la prueba de β lactamasa inducida.

Para infecciones severas, el laboratorio podría considerar realizar CIM a penicilina y la prueba de β lactamasa inducida en aislamientos del mismo paciente

5.4.1.2 Detección de Resistencia a Oxacilina

Esta prueba se realiza para *S. aureus*, *S. lugdunensis* y *Staphylococcus* coagulasa negativa, para lo cual se utiliza un disco de oxacilina 1µg ó un disco de cefoxitin de 30 µg por el método de difusión en disco siguiendo las recomendaciones de CLSI. También se puede realizar utilizando el método de microdilución en caldo utilizando cefoxitin u oxacilina.

Históricamente la resistencia a penicilinas estable a penicilina ha sido denominada como resistencia a penicilina **ó resistencia a oxacilina.**

La prueba de cefoxitin en disco ó en CIM puede ser utilizada para predecir la presencia de *mecA* que media la resistencia a oxacilina en *S. aureus* y *S. lugdunensis*. Para *Staphylococcus* coagulasa negativa a excepción de *S. lugdunensis* el disco de cefoxitin es el método recomendado para la detección de *mecA* que media la resistencia a oxacilina. Cefoxitin es utilizado como un sustituto para determinar la resistencia a oxacilina.

CLSI recomienda

Si se utilizan cefoxitin y oxacilina frente a *S. aureus* y *S. lugdunensis* y ambos resultados son resistentes, el microorganismo puede ser reportado como resistente a oxacilina.

Criterios de interpretación para oxacilina pueden sobreponer resistencia en algunos *Staphylococcus* coagulasa negativa, debido a que algunos aislamientos que no son *S. epidermidis* presentan una CIM de oxacilina entre 0.5 a 2µg/mL con ausencia de *mecA*. Para infecciones severas causadas por *Staphylococcus* coagulasa negativa y otros que no son *S. epidermidis*, las pruebas para *mecA* ó PBP2a ó disco de cefoxitin pueden ser apropiadas en aislamientos que presenten una CIM de oxacilina entre 0.5 a 2µg/mL

La detección del fenotipo de resistencia a meticilina en *S. aureus* no es fácil debido a que no todas las poblaciones expresan resistencia a meticilina. Este fenotipo de expresión de resistencia es llamado “heterorresistente” ó “heterogéneo” y los métodos de detección son difíciles. La

expresión de poblaciones heteroresistentes se alcanza con altas concentraciones de sales y bajas temperaturas. Para el método de microdilución en caldo se suplementa con 2% de NaCl. (2)

CLSI recomienda el uso de cefoxitin de 30µg utilizando el método de difusión en disco ó el método de microdilución en caldo. También recomienda una prueba tamiz donde utiliza Mueller Hinton Agar que contiene oxacilina 6 µg/mL y suplementado con NaCl 4%. A continuación se presentará las indicaciones para realizar estas pruebas.

Tabla No. 9 Prueba tamiz para producción de β-lactamasa, resistencia a oxacilina y resistencia a oxacilina mediada por *mecA* para *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa (excepto *S.*

lugdunensis)

Microorganismo	β -lactamasa	Resistencia a oxacilina	Resistencia a oxacilina mediada por <i>mecA</i> utilizando cefoxitin	
	<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i> con CIM a penicilina $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ ó $\geq 29\text{mm}$ <i>Staphylococcus coagula</i> negativa con CIM a penicilina $\leq 0.12\mu\text{g/mL}$ ó $\geq 29\text{mm}$		<i>S. aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa	<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i> <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa
Método	Disco Nitrocefín	Agar dilución	Difusión en disco	Dilución en caldo
Medio	NA	Mueller Hinton 4% NaCl	Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes
Concentración antimicrobiana	NA	6 $\mu\text{g/mL}$ oxacilina	30 μg cefoxitin	4 $\mu\text{g/mL}$ cefoxitin
Inoculo	Crecimiento tomado del borde del disco de cefoxitin u oxacilina y cultivado en un agar sangre o Mueller Hinton e incubado de 16 a 18h	Suspensión 0.5 McFarland. Colocar 1 μl de la suspensión sobre el agar	Recomendaciones para el método de difusión en disco	Recomendaciones para el método de microdilución en caldo
Incubación	Temperatura ambiente	33 a 35°C por 24 h. Temperatura por encima de 35°C no permite detección MRSA y MRS	33 a 35°C. Temperatura por encima de 35°C no permite detección MRSA. Incubación por 16 a 18h	33 a 35°C. Temperatura por encima de 35°C no permite detección MRSA. Incubación por 16 a 20h
Resultado	Color rosado en el disco de nitrocefín	Leer con luz transmitida >1 colonia es positivo	<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i> $\leq 21\text{mm}$ <i>mecA</i> positivo $\geq 22\text{mm}$ <i>mecA</i> negativo <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa $\leq 24\text{mm}$ <i>mecA</i> positivo $\geq 25\text{mm}$ <i>mecA</i> negativo	>4 $\mu\text{g/mL}$ <i>mecA</i> positivo $\leq 4\mu\text{g/mL}$ <i>mecA</i> negativo
Reporte	<i>Staphylococcus</i> resistentes a penicilinas, amino, carboxy y ureidopenicilinas	<i>Staphylococcus</i> resistentes a los β -lactámicos, otros agentes β -lactámicos pueden ser reportados como resistentes o pueden no ser reportados	Un resultado positivo para <i>mecA</i> puede ser reportado como oxacilina (no cefoxitin) resistente. Otros agentes β -lactámicos pueden ser reportados como resistentes ó puede no ser reportados. Mecanismos que presentan una prueba para <i>mecA</i> negativa pero la CIM de oxacilina es resistente, pueden ser reportados como oxacilina resistente; debido a que puede tener otro mecanismo diferente al <i>mecA</i>	
Control de calidad	<i>S. aureus</i> ATCC 29213: Positivo <i>S. aureus</i> ATCC 25923: Negativo	<i>S. aureus</i> ATCC 29213: Susceptible <i>S. aureus</i> ATCC 43300: Resistente	<i>S. aureus</i> ATCC 29213: <i>mecA</i> negativo <i>S. aureus</i> ATCC 43300: <i>mecA</i> positivo	

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

5.4.1.3 Detección de Resistencia a Vancomicina

Desde que se realizó la transmisión experimental del gen *vanA* de *E. faecalis* a *S. aureus* en 1994, comenzó a temerse que esto podría también ocurrir bajo condiciones naturales, lo cual se convirtió en realidad en 2004.

MRSA con susceptibilidad intermedia a vancomicina (VISA) fue reportado por primera vez en Japón en el año 1997 y después comenzó a reportarse en varios países del mundo. Aún no se conoce con certeza el mecanismo del fenotipo VISA, sin embargo, muy probablemente, el engrosamiento de la pared celular lleva a la captación de las moléculas de vancomicina antes que alcancen el sitio blanco en la membrana citoplásmica. (46)

CLSI recomienda que para determinar la susceptibilidad a vancomicina de *Staphylococcus* se debe realizar por CIM. **El disco no diferencia aislamientos de *S. aureus* susceptibles a vancomicina de aislamientos intermedios.** Tampoco permite diferenciar aislamientos de *Staphylococcus coagulasa negativa* de susceptibles, intermedios y resistentes, los cuales podrían dar zonas similares de inhibición.

Tabla No.10 Criterios de interpretación para vancomicina *Staphylococcus* spp

Antimicrobiano/microorganismo	Criterios de Interpretación					
	Difusión en disco (mm)			Concentración Inhibitoria Mínima (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Vancomicina <i>S. aureus</i>	--	--	--	≤ 2	4-8	≥ 16
Vancomicina <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	--	--	--	≤ 4	8-16	≥ 32

CLSI Recomienda

Aislamientos de *S. aureus* con una CIM para vancomicina $\geq 8\mu\text{g/mL}$ deben ser enviados al laboratorio de referencia para confirmación.

Aislamientos de *Staphylococcus coagulasa negativa* con una CIM para vancomicina $\geq 32\mu\text{g/mL}$ deben ser enviados al laboratorio de referencia para confirmación.

Tabla No. 11 Prueba tamiz para detección de vancomicina en *S. aureus*
Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI M100 S20, 2010*

Microorganismo	Vancomicina CIM \geq 8 μ g/mL
	<i>S. aureus</i>
Método	Agar dilución
Medio	Agar BHI
Concentración antimicrobiana	6 μ g/mL vancomicina
Inóculo	Suspensión 0.5 McFarland. Colocar 10 μ l de la suspensión sobre la superficie del agar
Incubación	35 \pm 2°C por 24 h.
Resultado	Leer con luz transmitida >1 colonia es positivo
Reporte	Realizar CIM para vancomicina cuando la prueba tamiz de vancomicina es positiva en <i>S. aureus</i> . Esta prueba tamiz de vancomicina no es confiable para detectar <i>S. aureus</i> Intermedios a vancomicina.
Control de calidad	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212: Susceptible <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299: Resistente

Existen otras pruebas para la detección de la resistencia a vancomicina

Prueba de E test

La manufactura recomienda realizar la prueba de E test para la detección en *S. aureus* de: Resistencia intermedia a glicopéptidos/ Resistencia y Heterorresistencia intermedia (GISA)/ y resistencia. Para la detección se utiliza un agar BHI, el inóculo se ajusta al 2 McFarland en caldo, lo que permite detectar la heterorresistencia. Se incuba a 35°C en aerobiosis. La lectura se realiza a las 24 h y se confirma a las 48h. Se observa la inhibición completa del crecimiento en vancomicina y teicoplanina, cuando colonias mutantes están presentes en la inhibición de la elipse, se debe leer la CIM donde estas colonias están completamente inhibidas.

5.4.1.4 Detección de Resistencia a Macrólidos

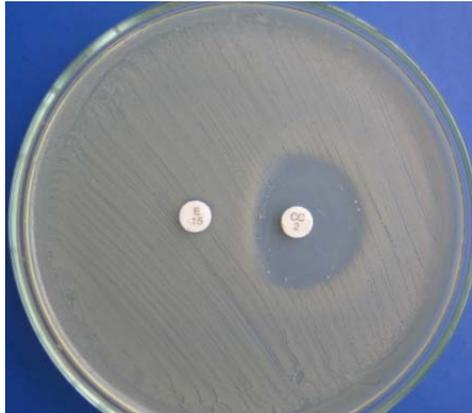
Los aislamientos de *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa pueden presentar resistencia constitutiva o inducible a clindamicina y esta resistencia esta codificada por los genes *ermA* y *ermC*, lo cual confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas y streptograminas. El tratamiento con clindamicina en aislamientos que presentan resistencia inducible a macrolidos-lincosamida-streptogramina puede llevar a un fracaso terapéutico. (2)

Tabla No. 12 Prueba tamiz para detección de resistencia inducible a clindamicina en *S. aureus*

Microorganismo	Resistencia inducible a clindamicina	
		<i>S. aureus</i> y <i>S. lugdunensis</i> resistentes a eritromicina y susceptible ó intermedio a clindamicina
Método	Difusión en disco	Dilución en caldo
Medio	Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes
Concentración antimicrobiana	15µg eritromicina y 2µg clindamicina Separación entre los discos de 15 a 26 mm	4µg/mL eritromicina y 0.5µg/mL clindamicina
Inóculo	Recomendaciones para el método de difusión en disco	Recomendaciones para el método de dilución en caldo
Incubación	35 ±2°C en aerobiosis por 16 a 18h.	35 ±2°C en aerobiosis por 18 a 24h.
Resultado	Achatamiento en la zona de inhibición adyacente al disco de eritromicina (zona D)= resistencia inducible a clindamicina Crecimiento no claro dentro de la zona de inhibición alrededor de clindamicina = clindamicina resistente aun si la zona D no aparece	Cualquier crecimiento = resistencia inducible a clindamicina Ningún crecimiento = no inducible resistencia a clindamicina
Reporte	Reportar aislamientos con resistencia inducible a clindamicina como clindamicina resistente	
Control de calidad	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC BAA ó <i>S. aureus</i> ATCC 25923: No crecimiento <i>S. aureus</i> ATCC BAA 977: Crecimiento

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

Figura 6. Prueba D positiva



Laboratorio Universidad Nacional

CLSI recomienda lo siguiente para los reportes generados por el laboratorio:

- Prueba de β -lactámase: *Staphylococcus* β -lactámase positiva son resistentes a penicilinas, amino (ej ampicilina), carboxy (ej.ticarcilina) y ureidopencilinas (ej.piperacilina).
- Prueba tamiz a oxacilina: *Staphylococcus* resistentes a oxacilina, son resistentes a todos los agentes β -lactámicos, los otros agentes β -lactámicos pueden ser reportados como resistentes o no ser reportados
- Para *Staphylococcus* resistentes a oxacilina, la penicilina puede ser reportada como resistente o no ser reportada.
- Prueba tamiz a oxacilina utilizando cefoxitin (*mecA*): El reporte de oxacilina resistente esta basado en el resultado del disco de cefoxitin. Si se utilizan cefoxitin y oxacilina frente a *S. aureus* y *S. lugdunensis* y ambos resultados son resistentes, el microorganismo puede ser reportado como resistente a oxacilina.
- Prueba tamiz para resistencia a vancomicina: Se debe confirmar con la CIM a vancomicina
- Prueba tamiz para resistencia inducible a clindamicina: Aislamientos con resistencia inducible a clindamicina deben ser reportados como resistentes a clindamicina. “Este aislamiento se presume que es resistente basado en la detección de resistencia inducible a clindamicina. La clindamicina puede ser todavía efectiva en algunos pacientes, puede ser incluida”

5.4.1.5 Detección de Resistencia a Linezolid

CLSI estableció nuevos puntos de corte para linezolid por el método de difusión en disco y microdilución en caldo. Con el método de difusión en disco se utiliza luz transmitida para su lectura y cuando da un resultado resistente este debe ser confirmado utilizando CIM.

Tabla No. 13 Puntos de corte para linezolid

Método	Linezolid		
	S	I	R
Difusión en disco	≥ 21	--	≤20
Microdilución en caldo	≤4	--	≥ 8

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI M100 S20, 2010*

5.4.2 Enterococcus spp

Son parte de la flora normal gastrointestinal, sin embargo son una importante causa de enfermedad invasiva incluyendo bacteremia, meningitis y endocarditis. Actualmente hay 23 especies de *Enterococcus spp.*, pero los de mayor importancia clínica son *E. faecalis* y *E. faecium*. Las infecciones causadas por *E. faecium* son más preocupantes debido a su alta multiresistencia a diferentes antimicrobianos. (51)

Todos los *Enterococcus* son intrínsecamente resistentes a cefalosporinas, trimetoprim sulfametoxazol y clindamicina, estos agentes pueden parecer activos *in vitro* pero no son efectivos para el tratamiento del paciente. El mayor problema de estos microorganismos es su habilidad para adquirir resistencia horizontal, lo cual genera que la terapia antimicrobiana no sea efectiva.

Enterococcus puede adquirir determinantes que confieren resistencia a muchas clases de antibióticos, pero estos son los responsables de la resistencia a aminoglucósidos y glicopeptidos. (51)

Enterococcus spp. es un grupo importante, diverso y complejo de bacterias que interactúan con humanos..

5.4.2.1 Detección de la Resistencia a Penicilina

La resistencia a penicilina presenta dos mecanismos diferentes: β-lactamasas e hiperproducción de PBPs de baja afinidad.

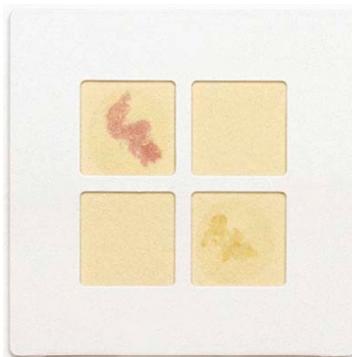
Las cepas productoras de penicilinasas son raras y suelen aparecer en *E. faecalis*. Estas cepas son resistentes a penicilina, ampicilina y ureidopenicilinas. *E. faecium* suele ser resistente a penicilina por hiperproducción de PBPs con baja afinidad.

La detección de β -lactamasa se realiza utilizando un disco de nitrocefín, sobre el cual se coloca el microorganismo a probar a partir de un cultivo fresco y puro. La presencia de un color rosado indica una prueba de β -lactamasa positiva.

CLSI

Es muy raro el reporte de aislamientos resistentes a penicilina y ampicilina en *Enterococcus* debida a producción de β -lactamasa. Aislamientos resistentes a penicilina ó ampicilina debida a producción de β -lactamasa, no se detecta con métodos de rutina como el método de disco o de dilución, pero se puede detectar con un método directo como es el uso del disco de nitrocefín. Debido a que es muy raro encontrar *Enterococcus* con β -lactamasa positiva, esta prueba no necesita ser realizada de rutina, sino se puede realizar en casos especiales. Una prueba de β -lactamasa positiva predice resistencia a penicilina, amino(ampicilina, amoxicilina) y ureidopenicilinas (piperacilina).

Figura No. 7 Prueba betalactamasa cromogénica



<http://www.bd.com/ds/productCenter/231749.asp>

5.4.2.2 Detección de la Resistencia a Vancomicina

El primer reporte de *Enterococcus* resistentes a vancomicina fue en Europa 1988 y se ha diseminado a nivel mundial. La resistencia de *Enterococcus* a vancomicina es una de las más estudiadas, hasta el punto de que se han descrito cinco fenotipos de resistencia a vancomicina: uno es intrínseco (*VanC*) y cuatro son adquiridos (*VanA*, *VanB*, *VanD* y *VanE*). El gen responsable de la alta resistencia a vancomicina en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son *vanA* y *vanB*.

Tabla No. 14 Prueba tamiz para detección de resistencia vancomicina en *Enterococcus* spp

Microorganismo	Resistencia a vancomicina
	<i>Enterococcus</i>
Método	Agar dilución
Medio	Agar BHI
Concentración antimicrobiana	6µg/mL vancomicina
Inóculo	Suspensión 0.5 McFarland. Colocar 1 a 10µl de la suspensión sobre la superficie del agar
Incubación	35 ±2°C por 24 h.
Resultado	Leer con luz transmitida >1 colonia es positivo
Reporte	Realizar CIM para vancomicina, prueba de motilidad y producción de pigmento para diferenciar las especies con resistencia adquirida (<i>vanA</i> y <i>vanB</i>) de la intrínseca y nivel de resistencia intermedio a vancomicina como son <i>E. gallinarum</i> y <i>E. casseliflavus</i> que con frecuencia crecen en el agar de tamizaje. <i>E. gallinarum</i> y <i>E. casseliflavus</i> con CIM de vancomicina 8-16µg/mL difieren de los <i>Enterococcus</i> resistentes a vancomicina (VRE) para el control de infecciones
Control de calidad	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212: Susceptible <i>E. faecalis</i> ATCC 51299: Resistente

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

5.4.2.3 Detección de la Resistencia a Gentamicina y Streptomicina de alta concentración

Los aminoglucosidos no son clínicamente activos para *Enterococcus* excepto cuando se usa en conjunto con un agente activo contra la pared celular.

El uso de la prueba de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos es predictivo de la sinergia de aminoglucósidos y agentes que actúan contra la pared celular. Esta prueba se debe realizar en *E. faecium* y *E. faecalis*, siguiendo las indicaciones de CLSI para la realización de la prueba, que se especifican a continuación:

Tabla No. 15 Prueba tamiz para detección de altos niveles de resistencia a aminoglucósidos en

Enterococcus spp

	Gentamicina de alta carga			Streptomcina de alta carga		
Microorganismo	<i>Enterococcus spp</i>					
Método	Difusión en disco	Dilución en caldo	Agar dilución	Difusión en disco	Dilución en caldo	Agar dilución
Medio	Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes	Agar BHI	Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes	Agar BHI
Concentración antimicrobiana	120µg gentamicina	Gentamicina 500µg/mL	Gentamicina 500µg/mL	300µg Streptomcina	Streptomcina 1000µg/mL	Streptomcina 2000µg/mL
Inoculo	Recomendaciones para el método de difusión en disco	Recomendaciones para el método de dilución en caldo	10µl de una suspensión del microorganismo al 0.5 MacFarland	Recomendaciones para el método de difusión en disco	Recomendaciones para el método de dilución en caldo	10µl de una suspensión del microorganismo al 0.5 MacFarland
Incubación	35 ±2°C en aerobiosis 16-18 h	35 ±2°C en aerobiosis 24h	35 ±2°C en aerobiosis 24h	35 ±2°C en aerobiosis 16 a 18h.	35 ±2°C en aerobiosis por 24 a 48h (si a las 24h es susceptible se reincuba).	35 ±2°C en aerobiosis por 24 a 48h (si a las 24h es susceptible se reincuba).
Resultado	Resistente= No hay sinergismo entre la pared celular y el agente activo (ampicilina, penicilina y vancomicina) Sensible= Hay sinergismo entre la pared celular y el agente activo (ampicilina, penicilina y vancomicina) Si el resultado de difusión en disco es inconcluso, realizar agar dilución ó dilución en caldo para confirmar					
Control de calidad	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> = Susceptible ATCC 51299 <i>Enterococcus faecalis</i> = Resistente	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> = Susceptible ATCC 51299 <i>Enterococcus faecalis</i> = Resistente	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> = Susceptible ATCC 51299 <i>Enterococcus faecalis</i> = Resistente	ATCC 29212 <i>Enterococcus faecalis</i> = Susceptible ATCC 51299 <i>Enterococcus faecalis</i> = Resistente

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

5.4.3 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es la bacteria causante de neumonía adquirida en la comunidad y meningitis bacteriana. Actualmente es muy importante la emergencia de la resistencia a penicilina, lo cual se ha convertido en un problema a nivel mundial. La resistencia es el resultado de alteración de las PBPs afectando la afinidad por los antibióticos β lactámicos, de la adquisición de transposones que confieren resistencia a macrólidos, tetraciclinas y aminoglucósidos.

Las pruebas de susceptibilidad para este microorganismo requieren condiciones especiales para las pruebas de difusión en disco ó dilución en agar, como son el uso de Agar Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero y atmósfera de CO₂ para su incubación. Para las pruebas de dilución en caldo se requiere utilizar Caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y suplementado con sangre de caballo 3% y atmósfera aeróbica para su incubación.

La CIM para penicilina es reportada basada en el criterio de meningitis y no meningitis. Es importante realizar prueba tamiz de oxacilina para predecir resistencia a penicilina. Aislamientos de *S. pneumoniae* con una zona de inhibición a oxacilina ≥ 20 mm son susceptibles a penicilina.

Aislamientos de *S. pneumoniae* con una zona de inhibición a oxacilina ≤ 19 mm, se puede realizar CIM para cefotaxima ó ceftriaxona ó meropenem, debido a que pueden ser aislamientos que sean resistentes, intermedios o susceptibles a penicilina.

Un halo a oxacilina ≤ 19 mm no debe reportarse como resistente a penicilina sin haber realizado la CIM para penicilina.

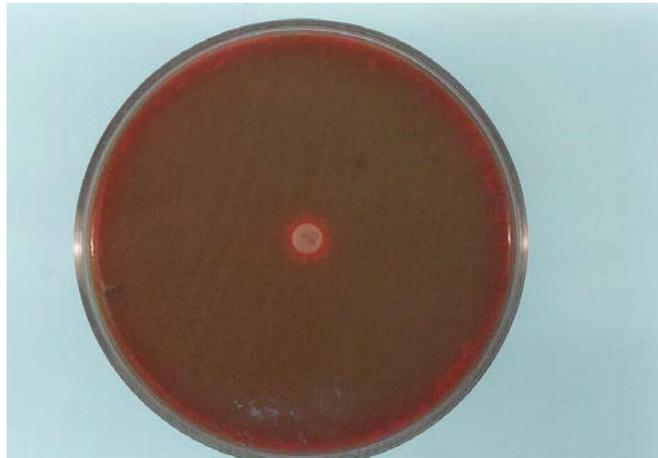
5.4.3.1 Detección de Resistencia a Penicilina

Prueba tamiz a oxacilina

Esta prueba se utiliza para predecir la resistencia a penicilina; debido a que esta prueba no discrimina los aislamientos con resistencia intermedia o alta resistencia, es indispensable realizar el método de dilución en caldo para poder cuantificar la resistencia.

Se realiza utilizando el método de difusión en disco, se coloca el disco de oxacilina de $1\mu\text{g}$ sobre el medio de Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero y se incuba a 35°C por 20-24 horas en atmósfera de CO_2 .

Figura No. 8 Prueba tamiz a oxacilina



Laboratorio Microbiología Universidad Nacional de Colombia

La resistencia a cefalosporinas se debe detectar con el método de dilución en caldo, debido a que no está estandarizado el método de difusión en disco para cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima y cefepime.

5.4.4 *Streptococcus spp* β hemolíticos

Los *Streptococcus* β hemolíticos se clasifican en 4 grupos:

Grupo A

Denominado *S. pyogenes*, es el agente causal en las infecciones estreptocócicas del Grupo A, incluyendo faringitis estreptocócica, fiebre reumática aguda, fiebre escarlata, glomerulonefritis aguda y fascitis necrotizante.

El método más comúnmente empleado en los laboratorios clínicos para la identificación presuntiva de *Streptococcus* β hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) es la prueba de susceptibilidad a la bacitracina.

Grupo B

Denominado *S. agalactiae*, causa neumonía y meningitis en neonatos y en algunas ocasiones bacteremia. Estos también pueden colonizar el intestino y el tracto reproductor femenino, incrementando el riesgo de ruptura prematura de membranas y la transmisión al neonato.

Grupo C y G

Particularmente los *Streptococcus* de los grupos C y G han sido implicados como causa de faringitis aguda en niños y adultos, especialmente en los brotes de faringitis epidémicos, a menudo relacionados con los alimentos. Sin embargo, se desconoce la importancia de estos microorganismos como productores de episodios esporádicos de faringitis.

En cuanto a la parte de susceptibilidad CLSI recomienda:

CLSI

Streptococcus spp β hemolítico que son susceptibles a penicilina puede ser considerado susceptible a los agentes antimicrobianos mencionados cuando se utilizan las indicaciones aprobadas y no necesitan ser probados contra esos agentes. Para *Streptococcus* spp β hemolítico (Grupo A, B, C y G) se utiliza ampicilina, amoxicilina, amoxicilina clavulánico, ampicilina sulbactam, cefazolina, cefepime, ceftizoxima, cefradina, cefalotina, cefotaxima, ceftriaxona, imipenem, ertapenem, meropenem; adicionalmente se usa para *Streptococcus* del Grupo A cefaclor, cefdinir, cefprozil, ceftibuten, cefuroxima, cefpodoxima y cefapirin.

5.4.5 Streptococcus Grupo viridans

Son flora normal de la mucosa oral, respiratoria y gastrointestinal de los mamíferos y del tracto genital en la mujer, donde juegan un papel importante en la prevención de la colonización de patógenos potenciales. Microorganismos de este grupo como son *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*, tienen la capacidad de producir dextranos extracelulares que actúan como mediadores en los mecanismos de fijación, favoreciendo el establecimiento de nichos en diferentes superficies como son, por ejemplo, los dientes y las válvulas cardíacas.

S. mutans, son los agentes más importantes implicados en la caries dental que, sin ser una entidad que comprometa la vida, constituye una de las patologías actuales más frecuentes y costosas. Por otro lado, *Streptococcus* del grupo viridans pueden invadir el torrente sanguíneo tras un traumatismo u otros procesos, que incluirían las manipulaciones dentales, cirugía del tracto respiratorio superior o cirugía e instrumentalización del aparato genitourinario o del tracto

intestinal. *Streptococcus anginosus/milleri* tiene una clara tendencia a producir infecciones supurativas.(52)

CLSI

Streptococcus grupo viridans incluye cinco grupos con varias especies en cada grupo: Grupo *mutans*, Grupo *bovis*, Grupo *anginosus* (antes *S. milleri*) y Grupo mitis. El grupo *anginosus* forma colonias pequeñas.

5.5 Panorama Global de la Resistencia en Gram positivos

Las bacterias gram positivas en especial *S. aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativas y *Enterococcus* sp son los patógenos más importantes asociados con infección intrahospitalaria y son los responsables de más del 60% de las infecciones nosocomiales provenientes de sangre.

Durante los últimos 20 años se ha hecho frente a la resistencia antimicrobiana que es cada vez mayor en bacterias Gram positivas, lo que ha ocasionado que el tratamiento sea cada vez más difícil y las tasas de morbilidad y mortalidad se incrementen.

Muchos agentes antibacterianos han sido lanzados en una interminable lucha frente a estos patógenos, los cuales han mostrado su adaptabilidad con el desarrollo de resistencia a casi todos los agentes antimicrobianos.(51)

Existen varios factores que han contribuido al incremento de cepas multiresistentes a antibióticos, uno de los más importantes es el uso inadecuado, de antimicrobianos. Paradójicamente, al aumentar las bacterias resistentes, también lo ha hecho el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana, por lo que se detectan nuevos blancos terapéuticos y se generan pocos fármacos nuevos. (44)

La ruptura de barreras naturales, como es el caso de los catéteres intravasculares, permite que gérmenes como los *Staphylococcus coagulasa* negativos sean cada vez más frecuentes en casos de bacteriemias, neumonías e incluso infecciones del sistema nervioso central. El uso prolongado de sondas urinarias favorece las infecciones por *Enterococcus* spp. Por otra parte, la aparición y diseminación mundial de clones de *Streptococcus pneumoniae* multiresistentes a betalactámicos, macrólidos, trimetoprim sulfametoxazol, tetraciclinas, etc, representa un serio problema para el manejo de infecciones adquiridas en la comunidad.

De acuerdo al sistema de vigilancia de antimicrobianos SENTRY, la resistencia de *S. aureus* a oxacilina para el año 2008 en USA es de 57,3% y para la Región del pacífico es de 61,5%, también se observa una mayor resistencia a gentamicina en la Región del pacífico comparada con USA. (53)

Con respecto a *Staphylococcus coagulasa* negativa, la resistencia a oxacilina es mucho mayor en la Región del pacífico presentándose una resistencia de 83.3% comparada con 70,6% en USA para el año 2008. En *Enterococcus* spp la resistencia a vancomicina esta alrededor del 31,8% en USA y de 28,9% en la Región del pacífico para el año 2008. (54).

Datos del Grupo GREBO para el año 2008 muestran una resistencia en *S aureus* a oxacilina de 37,5% y para *Staphylococcus coagulasa* negativa de 76%. Con respecto a *Enterococcus* spp los

datos arrojan una resistencia para vancomicina de 0.5% para *E. faecalis* y 18% para *E. faecium*. (28)

El sistema de vigilancia epidemiológica para la resistencia bacteriana de la secretaria de salud distrital (SIVIBAC) para el año 2009 en el nivel de complejidad III, reporto en UCI una resistencia en *S. aureus* a oxacilina de 27%, en SCN de 79% y *E. faecium* resistente a vancomicina de 27%.

Staphylococcus aureus de comunidad

En la última década ha cobrado mayor importancia la emergencia de infecciones causadas por aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina en pacientes saludables sin factores de riesgo asociados (SARM-AC) como uso de dispositivos o ingreso a hospitales, debido a la mayor virulencia, patogenicidad y transmisibilidad de los aislamientos que producen este tipo de infecciones. A causa de la alta capacidad de diseminación que presenta la cepa USA300 SARM-AC, es posible encontrarla en la mayoría de países del mundo, inclusive en Colombia encontramos aislamientos con características genotípicas y fenotípicas muy similares a las de este clon pandémico (57). Aunque la epidemiología de CA-MRSA depende de la región en particular, comparten características generales. La mayoría de los aislamientos CA-MRSA presentan sensibilidad a la mayoría de los antibióticos. Otra característica importante es la presencia de PVL un profago que codifica una toxina bicomponente con la capacidad de lisar leucocitos, relacionada con neumonía necrotizante (58), la cual está presente en la mayoría de los aislamientos de comunidad. SCCmec tipo IV y PVL son marcadores moleculares asociados con la diseminación de CA-MRSA en el mundo.

5.6 Detección Molecular de la Resistencia en Gram positivos

5.6.1 Detección Molecular de *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (CoNS)

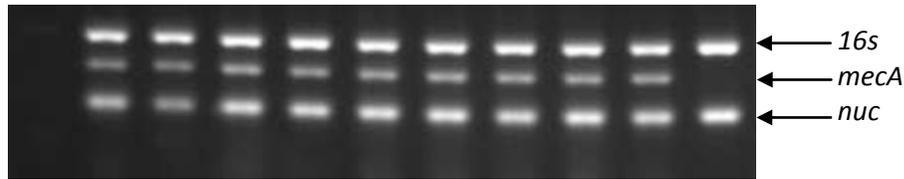
Para diferenciar los CoNS de *S. aureus* a nivel de laboratorio se utilizan técnicas basadas en la producción de enzimas como coagulasa y termonucleasa, ya que son exclusivas de *S. aureus* y *S. intermedius* (55). La producción de coagulasa se determina por la coagulación del plasma sanguíneo, y la producción de termonucleasa se determina por la degradación de DNA en medios suplementados con este y azul de toluidino.

En el caso de *S. aureus* la identificación a nivel molecular se hace por medio de PCR determinando la presencia del gen *nuc*, que codifica para la enzima termonucleasa mencionada anteriormente.

En la figura N° 1 se muestra un ejemplo de la amplificación de este gen simultáneamente con el gen *16s rRNA*, el cual codifica para la subunidad del rRNA ribosomal 16S, específico para bacterias; adicionalmente se amplifica el gen *mecA* que confiere resistencia a los beta-lactámicos en *S. aureus* (Fig. 9).

Figura No 9. PCR para la identificación de *S. aureus* y resistencia a meticilina

(-) ————— Aislamientos MRSA ————— MSSA



En el último carril se observa el perfil de amplificación para una muestra sensible a meticilina, las muestras que no amplifique la banda del gen *nuc* no corresponden a *S. aureus*.

Para la identificación a nivel de especie de los CoNS han sido reportados métodos basados en la secuenciación de fragmentos amplificados por PCR. Los principales genes utilizados para este propósito son *16S rRNA*, *sodA* y *tuf* (50). El gen *16S rRNA* está presente con muchas copias en el genoma de la bacteria con una alta conservación. El gen *sodA* codifica una superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la cual inactiva los radicales superóxido tóxicos para la bacteria. El gen *tuf* codifica un factor de elongación involucrado en la síntesis de proteínas. Estos genes son esenciales para la bacteria motivo por el cual son utilizados con fines de identificación y diagnóstico.

Para la identificación de *S. epidermidis* ha sido reportado un método basado en PCR que no requiere secuenciación y se basa en la amplificación del gen *nrde*, el cual codifica para una ribonucleasa-difosfato reductasa la cual cataliza la síntesis de deoxiribonucleótidos a partir de los respectivos ribonucleótidos (56).

5.6.1.1 Detección molecular de resistencia a Oxacilina

Una resistencia importante en los *Staphylococci* es a β -lactámicos. Dicha resistencia en algunos casos es causada por la expresión de una proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a). Las PBPs son enzimas que catalizan la transpeptidación que entrecruza los peptidoglicanos de la pared celular, en *S. aureus* hay por lo menos cuatro PBPs que son inhibidas por el antibiótico, ya que este se une covalentemente al sitio activo de la PBP. El mecanismo de acción de estos antibióticos se centra en la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que la bacteria sintetiza una proteína de baja afinidad al antibiótico (PBP2a) codificada por el gen *mecA*. Este gen se encuentra en un elemento genético móvil conocido como casete staphylococcico cromosomal (SCC*mec*), existe evidencia de la transferencia horizontal de este elemento móvil entre especies *Staphylococcicas* por lo que se cree que los CoNS pueden servir de reservorios para la diseminación de esta resistencia a *S. aureus* ((59). La identificación genotípica del principal mecanismo de resistencia a la mayoría de Beta-lactámicos esta dada por la amplificación del gen *mecA* en los aislamientos de *Staphylococcus spp.*

5.6.1.2 Detección molecular de resistencia a vancomicina

El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en el bloqueo del sustrato de la glicosil-transferasa (enzima importante para la síntesis de la pared celular), en los residuos D-alanil-D-alanina (DDR) del precursor lípido II, inhibiendo la utilización del sustrato por parte de la enzima.

Según el mecanismo de resistencia, se pueden observar fenotipos de resistencia fuertes o intermedios, por ejemplo cuando se da la modificación del sitio de acción del antibiótico (síntesis de peptidoglicanos), en aislamientos que presentan los genes *vanA*, *vanB* o *vanD* que tienen la capacidad de modificar un extremo del precursor del peptidoglicano (disminuyendo la capacidad

de unión del antibiótico), es asociado a una resistencia fuerte, este fenotipo se relaciona mucho con *Enterococci*, no con *Staphylococci*, aunque ha sido encontrado en este género. En CoNS y *S. aureus* se ha documentado la aparición de aislamientos con resistencia intermedia (60) que no es asociada con la presencia de los genes *van* descritos para *Enterococci*. Estos aislamientos presentan susceptibilidad a glicopeptidos cuando son evaluados con métodos de referencia sin embargo son capaces de crecer en altas concentraciones del antibiótico. Dicha resistencia puede estar mediada por el engrosamiento de la pared celular o por la presencia de subpoblaciones con resistencia dentro de la población general.

5.6.1.3 Detección molecular de resistencia a macrólidos

Los macrolidos y lincosamidas no se relacionan molecularmente, sin embargo se relacionan microbiológicamente por su modo de acción. Dichos antibióticos inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria por unión a la subunidad 23S del ARNr, el cual hace parte de la subunidad grande del ribosoma.

Un mecanismo de resistencia a estos antibióticos ocurre cuando la bacteria adquiere la capacidad de modificar el sitio de unión del antibiótico en el ribosoma disminuyendo la afinidad del mismo. Esta modificación es sitio-específica, el residuo A2058 localizado en el dominio V del ARNr 23S, es metilado por la acción de una Eritromicina Ribosoma Metilasa, codificada por el gen *erm* (12). Han sido reportados por lo menos 30 tipos de este gen (61), siendo los más prevalentes *erm*(A), *erm*(B) y *erm*(C) en especies de *Staphylococcus spp.*

Otro mecanismo de resistencia a macrolidos y lincosamidas es la producción de bombas de eflujo, las cuales favorecen la salida del antibiótico a la matriz extracelular, en *Staphylococci* esta bomba es codificada principalmente por el gen *msr*(A), aunque solo se encuentra resistencia cuando este gen está acompañado de alguno de los genes *erm* (62).

5.6.2 Detección Molecular de *Enterococcus spp*

La identificación molecular a nivel de especie de *E. faecalis* y *E. faecium* se realiza a través de la amplificación por PCR y posterior secuenciación de fragmentos de los genes *16S rRNA* (codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal), del dominio V del gen *23S rRNA* (subunidad 23S del RNA ribosomal), amplificación por PCR los genes *ddl* (codifica para las ligasas D-ala:D-ala), *sodA* (codifica una superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la cual inactiva los radicales superóxido tóxicos para la bacteria) y *tuf* (codifica para el factor Tu, un factor de elongación involucrado en la síntesis de proteínas) (6). Se amplifican por PCR los genes *VanC1* y *VanC2/C3* (genes involucrados en resistencia a vancomicina) para la confirmación molecular de aislamientos de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, respectivamente.

5.6.2.1 Detección molecular de resistencia a vancomicina

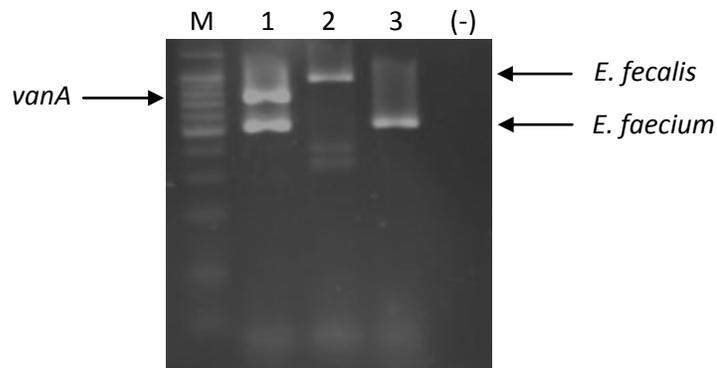
Múltiples técnicas se utilizan para determinar los marcadores moleculares responsables de la resistencia a Vancomicina en *E. faecalis* y *E. faecium*; pero la más frecuentemente usada es la amplificación, por PCR, de los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* y *vanC2/C3*, los cuales codifican para una enzima que altera la biosíntesis del péptidoglicano, evitando la unión del antibiótico. Algunos

autores han realizado la amplificación simultánea de los genes *ddl* (especie específicos) con los genes *van* (PCR múltiple), para identificar la especie de *Enterococcus* y determinar su posible resistencia a vancomicina (Dukta-Malen et al. 1995. Detection of glycopeptide resistant

genotypes.

En la figura N° 10 se puede observar la identificación de aislamientos clínicos de *E. Faecium* resistentes a vancomicina (carril 1) o sensibles a vancomicina (carril 2) y *E. Faecium* sensibles a vancomicina (carril 3).

Figura No. 10 PCR para la determinación de especie *E. faecium* o *E. faecalis* y resistencia a vancomicina codificada por los genes *van*.

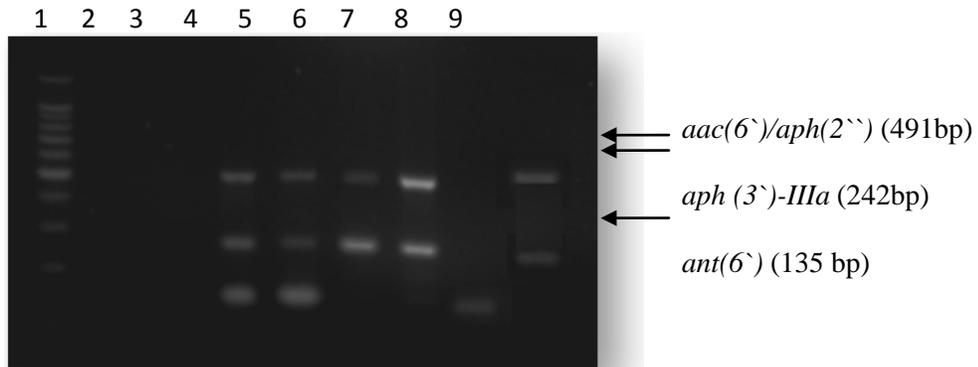


Carril 1 muestra de *E. faecium* resistente a vancomicina con el gen *vanA*. Carril 2 y 3 aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium* sensible a vancomicina.

5.6.2.2 Detección molecular de resistencia a macrólidos

Sondas genéticas (secuencias de ADN específicas para detectar genes) y ensayos de PCR son útiles para caracterizar aislamientos de *Enterococcus spp.* que albergan genes que codifican enzimas para la alta resistencia a aminoglicosidos. La PCR múltiple se utiliza para detectar la presencia de los genes *ant6'* (involucrado en la resistencia a streptomycin), *aac6''-aph2''* (que codifica para una enzima bifuncional responsable de la alta resistencia a gentamicina) y el gen *aphA3* (media la resistencia a amikacina, kanamicina y streptomycin). En la figura N°10 se muestra la detección de estos tres genes en aislamientos clínicos de *Enterococcus faecalis*.

Figura No. 10. Productos de amplificación de la PCR múltiple del los genes *aac(6'')/aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* y *ant(6')* en aislamientos de *E. Faecalis*



1. Marcador de peso molecular (100 pb), 2-9. Aislamientos clínicos de *E. faecalis*. Los productos fueron separados en gel de agarosa al 1.5%, y teñidos con solución de bromuro de etidio al 0.01%.

5.6.3 Detección Molecular de *Streptococcus pneumoniae*

5.6.3.1 Detección Molecular de la resistencia a β lactámicos

La resistencia mediada por PBP se puede ocurrir por diferentes formas como: Superproducción de PBP, adquisición de PBP foráneas de baja afinidad, recombinación de PBP susceptibles con variantes resistentes y mutaciones puntuales.

En el caso de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans* la resistencia a estos antibióticos implica principalmente la alteración de PBP, reduciendo la afinidad por la molécula del antibiótico, esto se puede dar por recombinación de PBP en microorganismos susceptibles que tienen la capacidad de adquirir DNA de medio ambiente (63).

En *S. pneumoniae* se han descrito cinco PBP de alto peso molecular (1a, 1b, 2a, 2b y 2x) y una de bajo peso como PBP3. Las alternaciones de PBP2x, PBP2a y PBP2b están involucradas en los bajos niveles de resistencia a penicilinas y PBP1a y PBP2x son requeridas para la resistencia a cefalosporinas (64).

6 Control de calidad en las pruebas de susceptibilidad

La determinación y reporte de la susceptibilidad antimicrobiana en los microorganismos de importancia en salud pública es una de las principales funciones del laboratorio de microbiología clínica, por esta razón es muy importante que el laboratorio cuente con un control de calidad interno y externo que garantice la calidad de los procedimientos y confiabilidad de los resultados informados a los pacientes.

Los laboratorios disponen de las normas y recomendaciones establecidas por el Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico (CLSI) para implementar y estandarizar todos los procesos relacionados con el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

6.1 Control de calidad

Conjunto de acciones que se aplican en el laboratorio durante la ejecución de cada prueba para asegurar que las mismas están llevándose a cabo de la manera correcta.

Para el control de calidad en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se debe tener en cuenta:

6.1.1 Control de calidad del medio

Se recomienda el uso de Agar Mueller Hinton:

- Altamente reproducible
- Bajo en inhibidores que afectan las tetraciclina, sulfonamidas y trimetoprim sulfametoxazol
- Permite el crecimiento de microorganismos no fastidiosos
- Debe tener una profundidad de 4mm

6.1.1.1 Ph

El Ph del medio debe estar entre 7.2 y 7.4

6.1.1.2 Concentración de cationes

Las variaciones de cationes divalentes, principalmente calcio y magnesio, afectará los resultados con aminoglicósidos, tetraciclina y colistina. Un contenido excesivo en catión, reducirá la zona de inhibición, mientras que un escaso contenido en catión, puede dar un inaceptable aumento en el tamaño de la zona.

La cantidad de timina y timidina pueden afectar las sulfonamidas y trimetoprim dando falsa sensibilidad o falsa resistencia.

6.1.2 Inóculo

Se debe utilizar un inóculo con una turbidez al 0.5 de la escala de McFarland. Esta escala debe conservarse a temperatura ambiente y en oscuridad

6.1.3 Incubación

La temperatura y tiempo de incubación dependen del microorganismo a probar.

Tabla No. 16 Condiciones para realizar la prueba de difusión en disco para microorganismos fastidiosos

Microorganismo	<i>H. influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus N.meningitidis</i>
Medio	Agar HTM	Agar base GC suplementado	Agar Mueller Hinton suplementado con 5% sangre de cordero
Inóculo	Suspensión directa	Suspensión directa	Suspensión directa
Incubación	5% CO ₂ 16 a 18h, 35°C	5% CO ₂ 20 a 24h, 35°C	5% CO ₂ 20 a 24h, 35°C

Tabla No. 17 Condiciones para realizar la prueba de difusión en disco para microorganismos no fastidiosos

Microorganismo	Enterobacteriaceae	No Enterobacteriaceae	<i>Acinetobacter spp</i> <i>Stenotrophomona maltophilia</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Enterococcus spp</i>
Medio	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton	Agar Mueller Hinton
Inóculo	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa	Suspensión directa ó método de crecimiento
Incubación	16 a 18h, 35°C	16 a 20h, 35°C	20 a 24h, 35°C	16 a 20h, 35°C 24h para vancomicina y metilicina	16 a 18h, 35°C 24h para vancomicina

Tabla No. 18 Condiciones para realizar la prueba de microdilución en caldo para microorganismos fastidiosos

Microorganismo	<i>H. influenzae</i>	<i>Streptococcus S. pneumoniae</i> <i>N.meningitidis</i>
Medio	HTM caldo	Caldo Mueller Hinton suplementado con sangre lisada de caballo
Inóculo	Suspensión directa	Suspensión directa
Incubación	Aerobiosis 20 a 24h, 35°C	Aerobiosis 20 a 24h, 35°C

Tabla No. 19 Condiciones para realizar la prueba de microdilución en caldo para microorganismos no fastidiosos

Microorganismo	<i>Enterobacteriaceae</i>	No <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Enterococcus</i> spp
Medio	Caldo Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton	Caldo Mueller Hinton suplementado con 2% NaCl (oxacilina y metilicina) suplementado con 50µg/mL Ca para daptomicina	Caldo Mueller Hinton suplementado con 50µg/mL Ca para daptomicina
Inóculo	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa ó método de crecimiento	Suspensión directa	Suspensión directa ó método de crecimiento
Incubación	16 a 20h, 35°C	16 a 20h, 35°C	20 a 24h, 35°C	16 a 20h, 35°C 24h para vancomicina y metilicina	16 a 20h, 35°C 24h para vancomicina

6.1.4 Sensidiscos

- Los discos se deben almacenar a -8°C ó en congelación a -14°C hasta su uso sobre todo en antibióticos que son lábiles como son losβ lactámicos, imipenem, cefaclor y combinaciones con el acido clavulánico.
- Sacar los discos 2 horas antes de su uso para equilibrar su temperatura al ambiente.
- Utilizar discos con fecha de expiración adecuada
- Almacenarlos con desecante

6.1.5 Cepas ATCC

Estas cepas de referencia ATCC han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad ó resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y a su confiabilidad en los métodos de referencia. De acuerdo a la prueba de susceptibilidad (método de difusión en disco, dilución en agar y microdilución) y al agente antimicrobiano se selecciona la cepa ATCC.

6.2 Aseguramiento de la calidad

Programa diseñado para dar seguimiento y evaluar la calidad en el transcurso del proceso de cada prueba y en forma global en la totalidad del proceso, incluyendo la fase pre-analítica, analítica y post-analítica. Este concepto incluye entrenamiento y calificación del personal, evaluación de los reportes, rapidez y seguridad diagnóstica, certificación de los laboratorios, controles externos, etc

6.2.1 Toma y selección de la muestra

Deben establecerse criterios para asegurar, que se obtiene la muestra ideal para la prueba que se va a realizar, que se obtiene de la manera correcta, que es transportada al laboratorio en el medio de transporte adecuado y que llega al laboratorio en el tiempo asignado.

6.2.2 Procesamiento de la muestra.

El procesamiento optimiza la visualización y la recuperación del patógeno. En los casos en que es apropiado se puede juzgar la calidad de la muestra.

6.2.3 Medios y reactivos

Se debe realizar regularmente el control de calidad de los medios y reactivos.

6.2.4 Equipos

Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio clínico, deben estar amparados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. El chequeo periódico recomendado es importante para minimizar el daño o la necesidad de servicio y reparación.

6.2.5 Personal

El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio de microbiología. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor

6.3 Sistema de calidad

Programa que abarca toda la institución para asegurar que todos los procedimientos relacionados con cualquier prueba estén de acuerdo con los criterios preestablecidos

6.4 Evaluación de la calidad

Control de calidad interno: Consiste en supervisar diariamente los procedimientos y cada una de las pruebas realizadas en el laboratorio para cumplir con los requisitos de calidad, lo cual incluye la utilización de controles en las pruebas positivos y negativos en las pruebas.

Control de calidad externo: Los laboratorios de microbiología deben participar en programas de evaluación externa del desempeño. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para identificar un microorganismo desconocido, pruebas utilizadas para el diagnóstico etiológico y sensibilidad a los antibióticos.

6.5 Acciones correctivas

Es la respuesta a un problema que se ha identificado a través del control de calidad o de la garantía de la calidad.

6.6 Guía de Referencia de la frecuencia del control de calidad para CIM

Esta tabla sugiere la frecuencia del control de calidad para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Esto aplica solo a los agentes antimicrobianos para los cuales las pruebas consecutivas de 20 ó 30 días para el control de calidad produce resultados satisfactorios.

Tabla No. 20 Frecuencia de las pruebas de control de calidad en CIM

Modificación	Número de días consecutivos para control de calidad requerido		
	1d	5d	20 ó 30 d
CIM			
Nuevo lote	X		
Ampliar rango de dilución	X		
Reducir el rango de dilución	X		
Uso de un nuevo método			X
Uso de nueva manufactura CIM			X
Uso de nueva manufactura de Agar o Caldo		X	
Preparación del Inóculo			
Convierta la estandarización de la preparación del inóculo	X		
Convierta la estandarización de la preparación del inóculo a un método que sea dependiente de la técnica usada			X
Software			
Actualización del software que afecta los resultados AST		X	
Reparación del instrumento	X		

Tabla No. 21 Frecuencia de las pruebas de control de calidad en Kirby Bauer

Modificación	Número de días consecutivos para control de calidad requerido		
	1d	5d	20 ó 30 d
Disco			
Nuevo lote	X		
Nueva manufactura	X		
Medio			
Nuevo lote	X		
Nueva manufactura		X	
Preparación del inóculo			
Convierta la estandarización de la preparación del inóculo		X	
Convierta la estandarización de la preparación del inóculo a un método que sea dependiente de la técnica usada			X
Medición de la zona			
Cambios en el método de lectura de la zona			X
Software			
Actualización del software que afecta los resultados AST		X	
Reparación del instrumento	X		

Nota 1: Adición de un nuevo antibiotico probarse de 20 a 30 dias consecutivos para resultados satisfactorios

Nota 2: El control de calidad puede realizarse antes o al mismo tiempo de procesar los aislamientos. El resultado de los pacientes puede ser reportado si el control de calidad da dentro de los límites aceptables

Nota 3. Manufactura comercial ó pruebas hechas en casa puede seguir sus propios procedimientos internos y regulaciones

Nota 4. Los límites aceptables para el control de calidad de la CIM por FDA puede diferir ligeramente de los límites aceptables para el control de calidad de CLSI

7 Resumen de cambios en CLSI 2010

A continuación se describe un breve resumen de los cambios realizados por CLSI 2010 en el documento M100-S20:

1. Revisión de la definición de “No Sensible”
2. Nueva sección de Pruebas de tamizaje

Las pruebas de screenig caracterizan a un aislamiento como sensible o resistente a uno o más agentes antimicrobianos basados en su mecanismo o fenotipo de resistencia. Algunas pruebas de screening tienen suficiente sensibilidad y especificidad y sus resultados pueden ser informados sin ninguna prueba adicional. Otras requieren pruebas adicionales para confirmar los resultados presuntivos del tamizaje.

Tabla No. 22 Prueba de tamizaje

Grupo Microorganismo	Fenotipo ó mecanismo de resistencia	Prueba tamizaje	Se requiere pruebas adicionales o confirmación?
Enterobacterias	Producción BLEE	Microdilución en caldo y difusión en disco con varias cefalosporinas y aztreonam	Si confirmación. Cuando el tamizaje es positivo
	Producción de carbapenemasas	Microdilución en caldo y difusión en disco con varios carbapenemes	Si confirmación. Cuando el tamizaje es positivo
<i>S. aureus</i>	Producción de β lactamasa	Cefalosporina cromogénica u otro método	Si el tamizaje es negativo realizar CIM a penicilina y la prueba de la β lactamasa inducible (si la CIM es $< 12\mu\text{g/mL}$) en los subsecuentes aislamientos del mismo paciente
	Resistencia a oxacilina	Dilución en agar Mueller Hinton 4% NaCl y $6\mu\text{g/mL}$ oxacilina	No
	Resistencia a oxacilina mediada por <i>meca</i>	Microdilución en agar y difusión en disco con cefoxitin	No
	CIM a vancomicina $\geq 8\mu\text{g/mL}$	Dilución en agar BHI $6\mu\text{g/mL}$ vancomicina	Si confirmación. Cuando el tamizaje es positivo
	Resistencia inducible a clindamicina	Microdilución en caldo y difusión en disco con eritromicina y clindamicina	No
	Alto nivel de resistencia a mupirocina	Microdilución en caldo y difusión en disco con mupirocina	No
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	Producción de β lactamasa	Cefalosporina cromogénica u otro método	Si el tamizaje es negativo repetir la prueba en los subsecuentes aislamientos del mismo paciente
	Resistencia a oxacilina mediada por <i>meca</i>	Difusión en disco con cefoxitin	No
	Resistencia inducible a clindamicina	Microdilución en caldo y difusión en disco con eritromicina y clindamicina	No
<i>Enterococcus</i>	Resistencia a vancomicina	Dilución en agar con vancomicina	Si confirmación. Cuando el tamizaje es positivo

	Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos (HLAR)	Microdilución en caldo, dilución en agar y difusión en disco con gentamicina y streptomina	No se confirma para CIM, si se confirma para disco si el resultado no es concluyente
<i>S. pneumoniae</i>	Resistencia a penicilina	Difusión en disco con oxacilina	Si se confirma si no es sensible

Adaptado de *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100 S20. 2010*

3. Cambios en las pruebas y reporte de antimicrobianos

Cambios reportados para *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp*, *Staphylococcus spp*

4. Nuevos puntos de corte para cefalosporinas en *Enterobacteriaceae*

Se revisaron los nuevos puntos de corte para cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona y aztreonam. También se incluyeron las nuevas dosis en las cuales se basaron los nuevos puntos de corte.

Tabla 23. Nuevos puntos de corte *Enterobacteriaceae*

Antibiótico	Difusión en disco (mm)			Microdilución en caldo (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Cefazolina	ND	ND	ND	≤1	2	≥ 4
Cefotaxima	≥ 26	23-25	≤22	≤1	2	≥ 4
Ceftizoxima	≥ 25	22-24	≤21	≤1	2	≥ 4
Ceftriaxona	≥ 23	20-22	≤19	≤1	2	≥ 4
Ceftazidima	≥ 21	18-20	≤17	≤4	8	≥ 16
Aztreonam	≥ 21	18-20	≤17	≤4	8	≥ 16

5. Clarificar el reporte y criterios para *Staphylococcus spp*

Staphylococcus resistentes a los β-lactámicos, otros agentes β-lactámicos pueden ser reportados como resistentes o pueden no ser reportados, con la excepción de las nuevas cefalosporinas con actividad anti MRSA. Se aclara como informar la resistencia a oxacilina para *S. aureus* y *S. lugdunensis*, en el caso que se evalúe utilizando los discos de oxacilina y de cefoxitin

6. Remisión de *Staphylococcus* vancomicina resistentes al Laboratorio de Referencia

Se modifican los criterios de envío de los aislamientos de *S. aureus* con CIM a vancomicina ≥8µg/mL y aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa negativa ≥32µg/mL

7. *Staphylococcus spp* y Linezolid

Se han incorporado los puntos de corte de resistencia a linezolid en difusión en disco y CIM para *Staphylococcus*.

8. *Enterococcus spp* y β lactamasas

Enterococcus productores de β lactamasa y resistentes a penicilina ó ampicilina hay sido reportados poco frecuente. Esta prueba de β lactamasa no debe realizarse de rutina sin

embargo se puede utilizar en casos particulares.

9. *Streptococcus* grupo viridans

Se eliminó la sugerencia de que los aislamientos sensibles a penicilina pueden ser considerados sensibles a otros antibióticos β lactámicos. Se aclaró cuales son los organismos que estarían incluidos.

10. Cambio en rangos de control de calidad de cepas ATCC

Se modificaron algunos rangos de atnibióticos para el control de calidad de cepas ATCC

Tabla No.24 Rangos Control de Calidad

Antibiótico	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619
CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
Colistin	0.5-2	0.5-4		
Polimixina B		1-4		
Daptomicina			0.12-1	
Linezolid				0.25-2
Tetraciclina				0.06-0.5
Difusión en disco (mm)				
Doripenem	27-35	28-35		

8 Anexos

GLOSARIO DE TÉCNICAS MOLECULARES

HYPLEX : En la prueba Hyplex (PCR múltiple- ELISA), el primer paso realizado es una PCR multiplex para amplificar diferentes segmentos de ADN, en la segunda parte los productos de amplificación son detectados usando sondas altamente específicas que se unirán a su blanco por una hibridación reversa esto se realizara en placas de microtitulación y es similar a una reacción de ELISA de antígeno.

Microarreglos: Hibridación molecular invertida en la cual cientos de sondas marcadas (genes marcados) son inmovilizadas y fijadas sobre un soporte sólido el cual se pone en contacto con la muestra que contiene los ácidos nucleicos marcados con sustancias fluorescentes que permiten emitir señales en diferentes longitudes de onda; de esta manera es posible determinar la presencia de diferentes genes o sus transcritos) en un solo proceso. Para la lectura del microarreglo existen cientos de alternativas pero las más utilizadas para la detección de los marcadores fluorescentes son los escáneres láser y cámaras CCD para la detección de marcadores fluorescentes con los que se ha marcado la muestra.

PCR-RFLP: (del inglés restriction fragment length polymorphisms analysis), el análisis del polimorfismo del gen amplificado por PCR, es una técnica en la que se realiza digestión de los productos de amplificación, posteriormente estos productos obtenidos de la digestión son analizados por electroforesis con el fin de establecer diferentes variaciones en la longitud de los fragmentos generados los cuales corresponderán a diferentes variantes de un gen en este caso de una familia de betalactamasas.

PCR en tiempo real: Técnica en la cual los procesos de amplificación y detección de amplímeros se realizan de manera simultánea en un tubo cerrado a diferencia de la PCR convencional. Para establecer la cantidad de ADN sintetizada durante la reacción se utilizan moléculas fluorescentes ya sea agentes intercalantes como SYBR Green o sondas específicas marcadas con fluorocromos (como naranja de acridina, Cy3, cascada azul entre otros), la fluorescencia emitida durante la reacción es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado, lo que permite realizar un seguimiento a la cinética de la reacción, esta señal de fluorescencia es detectada por sensores incorporados en los termocicladores

Reacción en cadena ligasa: Conocida como LCR, es una técnica que permite la detección de mutaciones puntuales en un gen, en la cual se emplea una ligasa. En el procedimiento se utilizan dos pares de sondas para analizar ambas cadenas de manera simultánea, los productos de ligación formados en cada cadena sirven como molde para los siguientes pasos de amplificación de la secuencia, al finalizar la reacción la visualización de los productos de la LCR, puede ser realizada utilizando ensayos de microtitulación, electroforesis en gel o un analizador clínico automático.

RT-PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) es una variante de PCR, en la cual a partir de una hebra de ARN que es retrotranscrita se obtiene como producto ADN complementario (ADNc) mediante el uso de una enzima llamada transcriptasa reversa.

SSCP: Análisis del polimorfismo conformacional de cadenas sencillas de ADN (por las siglas del inglés: Single Strand Chain Polymorphism). En esta técnica se analizan fragmentos de ADN cortos (no mayores a 500pb) obtenidos por PCR, para la detección de mutaciones puntuales. Posterior a la PCR se realiza una restricción de los productos de amplificación; el producto de restricción obtenido es desnaturalizado permitiendo la separación de las cadenas de ADN quedando como resultado cadenas sencillas que serán analizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida para detectar cambios conformacionales en la secuencia de ADN de cadena sencilla.

9 Bibliografía

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA2010.
2. Holland TL, Woods CW, Joyce M. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. *Infect Dis Clin North Am*2009 Dec;23(4):757-90, vii.
3. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*2008 Mar;52(3):813-21.
4. Marie B. Coyle. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 2005.
5. Albarado Luzmila Sofia GJ, Rodriguez Eliosmar, Carpio Carmen, Salazar Elsa y colaboradores. Frecuencia de enterobacterias nosocomiales productoras de B-lactamasas de espectro extendido, Cumaná, Venezuela. *NOVA-Publicación científica en Ciencias Biomédicas*2008;7(11):1-110.
6. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*2010 Jan;23(1):160-201.
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*2010 Mar;54(3):969-76.
8. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*2005 Oct;18(4):657-86.
9. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*2008 Mar;8(3):159-66.
10. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*2009 Jan;22(1):161-82, Table of Contents.
11. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*2006 Sep 1;43 Suppl 2:S49-56.
12. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol*2010 Apr;48(4):1019-25.
13. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol*2005 Jul;43(7):3110-3.
14. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol*2000 May;38(5):1791-6.
15. Nasim K, Elsayed S, Pitout JD, Conly J, Church DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*2004 Oct;42(10):4799-802.
16. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*2007 Jul;20(3):440-58, table of contents.
17. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*2009 Apr;9(4):228-36.
18. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*2009 Nov;47(11):3420-6.
19. Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of

- chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*2007 Sep;45(9):2798-801.
20. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*2007 Apr;29(4):380-8.
 21. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*2010 Jan;54(1):24-38.
 22. Yagci D, Yoruk F, Azap A, Memikoglu O. Prevalence and risk factors for selection of quinolone-resistant *Escherichia coli* strains in fecal flora of patients receiving quinolone therapy. *Antimicrob Agents Chemother*2009 Mar;53(3):1287-9.
 23. Turrientes MC, Baquero MR, Sanchez MB, Valdezate S, Escudero E, Berg G, et al. Polymorphic mutation frequencies of clinical and environmental *Stenotrophomonas maltophilia* populations. *Appl Environ Microbiol* Mar;76(6):1746-58.
 24. Wilcox MH. The tide of antimicrobial resistance and selection. *Int J Antimicrob Agents*2009 Aug;34 Suppl 3:S6-10.
 25. Annual Report EARS. 2009.
 26. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother*2009 Aug;53(8):3280-4.
 27. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA*2008 Dec 24;300(24):2911-3.
 28. Grupo para el control de la resistencia bacteriana. Boletín Informativo GREBO. Bogotá2009.
 29. Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, et al. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett*1995 Dec 15;134(2-3):203-8.
 30. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
 31. Kim J, Lee HJ. Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV beta-lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother*2000 Jul;44(7):1860-4.
 32. Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, Nolte FS. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol*2009 Feb;47(2):322-6.
 33. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. *APMIS*2007 Dec;115(12):1400-8.
 34. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother*2006 Jan;57(1):154-5.
 35. Jemima SA, Verghese S. Multiplex PCR for bla(CTX-M) & bla(SHV) in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian J Med Res*2008 Sep;128(3):313-7.
 36. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*2002 Jun;40(6):2153-62.
 37. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob*

Agents Chemother2006 May;50(5):1633-41.

38. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother2010 Mar;65(3):490-5.
39. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother2004 Dec;48(12):4654-61.
40. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol2007 Feb;45(2):544-7.
41. Leinberger DM, Grimm V, Rubtsova M, Weile J, Schroppel K, Wichelhaus TA, et al. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. J Clin Microbiol2010 Feb;48(2):460-71.
42. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev2006 Jul;19(3):512-30.
43. Karchmer AW. Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors, and implications. Clin Infect Dis2000 Sep;31 Suppl 4:S139-43.
44. Becerra G, Plascencia AL, A. Dominguez, M. Hernandez, I. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología2009;29(2):70-6.
45. Llarrull LI, Fisher JF, Mobashery S. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in Staphylococcus aureus and insights into new beta-lactams that meet the challenge. Antimicrob Agents Chemother2009 Oct;53(10):4051-63.
46. Witte W, Cuny C, Klare I, Nubel U, Strommenger B, Werner G. Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. Int J Med Microbiol2008 Jul;298(5-6):365-77.
47. Smith IM, Beals PD, Kingsbury KR, Hasenclever HF. Observations on Staphylococcus albus septicemia in mice and men. AMA Arch Intern Med1958 Sep;102(3):375-88.
48. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev1994 Jan;7(1):117-40.
49. von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. Postgrad Med2001 Oct;110(4):63-4, 9-70, 3-6.
50. Heikens E, Flier A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol2005 May;43(5):2286-90.
51. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. J Infect2009 Sep;9 Suppl 1:S4-16.
52. . <http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/SGVirid.htm>. 2010.
53. <<http://www.gp-pathogens.com/data/summaryreport.cfm?page=1>>. 2010.
54. <<http://www.gp-pathogens.com/data/summaryreport.cfm?page=1>> 2010.
55. Madison BM, Baselski VS. Rapid identification of Staphylococcus aureus in blood cultures by thermonuclease testing. J Clin Microbiol1983 Sep;18(3):722-4.
56. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus epidermidis. J Clin Microbiol1996 Dec;34(12):2888-93.
57. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol2009 Sep;7(9):629-41.

58. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* May 1;375(9725):1557-68.
59. Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jan;48(1):285-96.
60. Nunes AP, Teixeira LM, Iorio NL, Bastos CC, de Sousa Fonseca L, Souto-Padron T, et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents* 2006 Apr;27(4):307-15.
61. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Mar;39(3):577-85.
62. Reyes J, Hidalgo M, Diaz L, Rincon S, Moreno J, Vanegas N, et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *Int J Infect Dis* 2007 Jul;11(4):329-36.
63. Charpentier E, Tuomanen E. Mechanisms of antibiotic resistance and tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbes Infect* 2000 Dec;2(15):1855-64.
64. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2009 Apr;15 Suppl 3:7-11.