

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

26. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial

2 0 0 7

Coordinador: Luis Martínez Martínez

**Autores: María Eliecer Cano
M^a Ángeles Domínguez
Carmen Ezpeleta Baquedano
Luis Martínez Martínez
Belén Padilla Ortega
Encarnación Ramírez de Arellano**



ISBN-978-84-611-9636-4

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Muestras para cultivos de vigilancia: consideraciones generales

3. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

- 3.1. Consideraciones clínicas
- 3.2. Recogida de la muestra
- 3.3. Transporte y conservación de la muestra
- 3.4. Procesamiento de la muestra
- 3.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 3.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 3.7. Información de los resultados
- 3.8. Técnicas rápidas de diagnóstico

4. *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos

- 4.1. Consideraciones clínicas
- 4.2. Recogida de la muestra
- 4.3. Transporte y conservación de la muestra
- 4.4. Procesamiento de la muestra
- 4.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 4.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 4.7. Información de los resultados
- 4.8. Técnicas rápidas de diagnóstico

5. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

- 5.1. Consideraciones clínicas
- 5.2. Recogida de la muestra
- 5.3. Transporte y conservación de la muestra
- 5.4. Procesamiento de la muestra
- 5.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 5.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 5.7. Información de los resultados
- 5.8. Procedimientos adicionales

6. *Acinetobacter baumannii* multirresistente

- 6.1. Consideraciones clínicas
- 6.2. Recogida de la muestra
- 6.3. Transporte y conservación de la muestra
- 6.4. Procesamiento de la muestra
- 6.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 6.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 6.7. Información de los resultados

7. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa

- 7.1. Consideraciones clínicas
- 7.2. Recogida de la muestra
- 7.3. Transporte y conservación de la muestra.
- 7.4. Procesamiento de la muestra
- 7.5. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación
- 7.6. Criterios para la interpretación de los resultados
- 7.7. Información de los resultados

8. Bibliografía

- 8.1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
- 8.2. *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos
- 8.3. Enterobacterias productoras de BLEEs
- 8.4. *Acinetobacter baumannii* multirresistente
- 8.5. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT-EPI-01.** DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
- 2. PNT-EPI-02.** DETECCIÓN DE *Enterococcus spp.* RESISTENTE A LOS GLUCOPÉPTIDOS EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
- 3. PNT-EPI-03.** DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
- 4. PNT-EPI-04.** DETECCIÓN DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA
- 5. PNT-EPI-05.** DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORA DE METALO-BETA-LACTAMASA

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

26. CULTIVOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BACTERIAS RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS DE INTERÉS NOSOCOMIAL. 2007

Coordinador: Luis Martínez Martínez

**Autores: María Eliécer Cano
M^a Ángeles Domínguez
Carmen Ezpeleta Baquedano
Luis Martínez Martínez
Belén Padilla Ortega
Encarnación Ramírez de Arellano**

1. INTRODUCCIÓN

La infección nosocomial es en la actualidad uno de los principales problemas sanitarios, teniendo particular importancia las infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Aunque no hay una definición precisa de bacteria multirresistente, se ha sugerido que el término debiera aplicarse a aquellos microorganismos que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos habitualmente empleados en el tratamiento de las infecciones producidas por el microorganismo considerado y que esta resistencia tenga relevancia clínica. Probablemente es también razonable aplicar el término a los microorganismos que presentan de forma natural resistencia a múltiples antimicrobianos de uso clínico habitual y que han sido capaces de adquirir resistencia a alguno de los restantes grupos de antimicrobianos con posible utilidad clínica.

La multirresistencia aparece como consecuencia de mecanismos bioquímicos codificados a nivel del cromosoma o por diversos elementos móviles. Esta última posibilidad añade mayor gravedad al problema, pues la diseminación del correspondiente elemento móvil favorece la aparición de brotes nosocomiales.

Muchos estudios han demostrado que es útil realizar cultivos de vigilancia epidemiológica para conocer la verdadera dimensión del problema de la multirresistencia en un centro o en una unidad, pues la información que puede inferirse de los resultados de los cultivos de muestras clínicas obtenidas con fines diagnósticos sólo representa una parte (con frecuencia la menor) de este. Estos estudios deben considerarse una herramienta adicional en los programas de control de la transmisión nosocomial de estos microorganismos. Desgraciadamente la puesta en marcha de estos programas supone una carga económica importante, tanto en personal como en medios materiales, por lo que debieran aplicarse en el contexto de un programa global, encaminado en última instancia al control de la infección nosocomial.

Sería demasiado complejo intentar abordar en este documento todos los agentes etiológicos implicados (por la gran diversidad de los mismos), pero de entre ellos, los de mayor interés por su frecuencia y por las dificultades terapéuticas que suponen incluyen:

1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)
2. *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos
3. Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE)
4. *Acinetobacter baumannii* multirresistente
5. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemas

La importancia de SARM y de las enterobacterias con BLEE es relevante en España. Sin embargo, por el momento las infecciones por *Enterococcus* spp. resistentes a los glucopéptidos son las de menor importancia cuantitativa en nuestro país (a diferencia

de lo que sucede en EE.UU. y en algunos otros países europeos), pero bien es cierto que la situación está cambiando y que en los últimos años se han descrito ya varios brotes en distintos centros españoles.

De entre los diversos problemas de multirresistencia de *P. aeruginosa*, la resistencia a carbapenemas es quizá el más complejo desde un punto de vista microbiológico o epidemiológico. Esta resistencia con frecuencia se debe a la coexistencia de varios mecanismos bioquímicos, incluyendo la producción de beta-lactamasas (AmpC, metalo-enzimas,...), alteraciones de la permeabilidad y expresión de bombas de expulsión activa. Para el propósito de este documento el análisis de la detección de metalo-beta-lactamasas (MBL) es el de mayor interés, por su novedad, las dificultades para su detección y la trascendencia epidemiológica.

No se abordará el estudio de otros microorganismos que en determinadas circunstancias pueden tener especial importancia en un centro dado, como las enterobacterias productoras de beta-lactamasa cromosómica o plasmídica de clase C, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus coagulasa* negativa resistentes a meticilina o *Clostridium difficile*.

En este documento se expondrán los métodos que permiten la detección de los diferentes microorganismos antes considerados mediante técnicas microbiológicas convencionales, basadas en el cultivo de muestras clínicas. Aunque en muchos casos se han desarrollado métodos moleculares (incluyendo la PCR en tiempo real) que permiten la detección en tiempos más cortos, aún no hay tanta información como la referida a la detección por cultivo, y además, es posible que estas técnicas no estén disponibles en todos los laboratorios en los que sí se pueden aplicar los métodos basados en cultivo. Además, la detección mediante cultivo tiene la ventaja adicional de permitir realizar estudios posteriores de tipificación molecular con fines epidemiológicos.

Caben múltiples posibilidades metodológicas para realizar cultivos de vigilancia, que estarán en consonancia con las necesidades a cubrir en cada caso. La información que se recoge en este documento pretende aportar una aproximación general al problema y puede considerarse como punto de partida para que cada laboratorio pueda desarrollar sus propias directrices, en función de las necesidades acordadas con el equipo multidisciplinar de control de la infección nosocomial del centro.

2. MUESTRAS PARA CULTIVOS DE VIGILANCIA: CONSIDERACIONES GENERALES

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia epidemiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su documento "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología" (<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/>).

En el momento de la recepción de las correspondientes muestras en el laboratorio de microbiología se comprobará si el tipo de muestra es el adecuado para cultivo de vigilancia que se pretende realizar. Además, se llevarán a cabo las comprobaciones habituales de cualquier otra muestra incluyendo la correcta identificación, la comprobación de que se recibe cantidad necesaria y que se han observado las condiciones de transporte y conservación adecuadas, así como la correcta cumplimentación del volante de petición en el que se

debe hacer constar explícitamente que la solicitud corresponde a un “cultivo de vigilancia epidemiológica”. Si tras estas comprobaciones no existen motivos para el rechazo de la muestra se procederá a su numeración y registro en el sistema de gestión del laboratorio.

A título orientativo, en la tabla 1 se recogen las localizaciones de mayor interés para la búsqueda con fines epidemiológicos de los patógenos multirresistentes considerados.

Tabla 1. Indicaciones orientativas sobre el interés cualitativo de diferentes muestras clínicas para la investigación de patógenos multirresistentes con fines epidemiológicos.

Organismo	Muestras clínicas				
	Heces/Rectal	Perineal	Faringe	Nasal	Otras
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	+ ^a	+++	+++	++++	++ ^b
<i>Enterococcus</i> spp. resistente a glucopéptidos	++++	++++	(+)	-	++
Enterobacterias productoras de BLEE	++++	++++	+	-	++
<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente	++++	++	++++ ^c	-	+++ ^{d, e}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenemas por producción de MBL	+	+++	++++ ^c	-	+++ ^d

^aNo parece de interés para su estudio sistemático, aunque algunos estudios sí recogen esta utilidad.

^bAspirado traqueal en pacientes con ventilación mecánica (++) , úlceras crónicas (+++), orina en pacientes sondados (++) .

^cMás habitual: esputo, exudado de traqueostomía, etc. en vez de muestras faríngeas.

^dEn especial muestras de exudado de herida (+++).

^eMuestra perineal (++++).

3. *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)

Se definen como SARM las cepas para las que la correspondiente CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L o la de meticilina es ≥ 16 mg/L. La resistencia es cromosómica y se debe a la transcripción del gen *mecA* que genera una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP) denominada PBP2a o 2', con muy baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos actualmente disponibles para uso clínico. El gen *mecA* es transportado por un elemento genético móvil denominado cassette cromosómico *mec* (SCC*mec*).

Los primeros aislamientos de SARM se comunicaron en 1961, poco tiempo después de comenzar a usar en clínica la meticilina y otras penicilinas resistentes a penicilinasas. En las últimas dos décadas la expansión y prevalencia de este microorganismo ha aumentado de forma importante en todos los países, convirtiéndose en uno de los patógenos nosocomiales de mayor trascendencia. En España, la prevalencia ha aumentado del 1,5% en 1986 al 31,2% en el 2002. La importancia de este microorganismo se debe a su resistencia a múltiples antimicrobianos (no sólo a beta-lactámicos), lo que hace difícil el tratamiento de las infecciones que produce.

SARM ocasiona brotes epidémicos en los hospitales y en muchos casos se está comportando ya como un microorganismo endémico, con el

consiguiente aumento de morbi-mortalidad y coste hospitalario.

En los últimos años se está documentando, de manera cada vez más frecuente, la aparición de infecciones extrahospitalarias causadas por SARM en pacientes ingresados en centros de crónicos, residencias, etc; estas infecciones, que muchos autores consideran “asociadas al sistema sanitario” se relacionan estrechamente, desde un punto de vista epidemiológico, con las infecciones clásicamente definidas como nosocomiales. Además, en la última década se están describiendo auténticas infecciones comunitarias por cepas de SARM pero con características microbiológicas (sensibilidad antimicrobiana, virulencia) y clínicas claramente diferentes a las cepas de adquisición nosocomial. Más recientemente, se está comprobando que estas cepas comunitarias están comenzando a describirse como causantes de infecciones nosocomiales.

3.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La colonización del hospedador juega un papel importante en la epidemiología de las infecciones causadas por *S. aureus*, tanto sensible como resistente a meticilina. En la figura 1 se muestra la importancia de la colonización en la transmisión desde los reservorios.

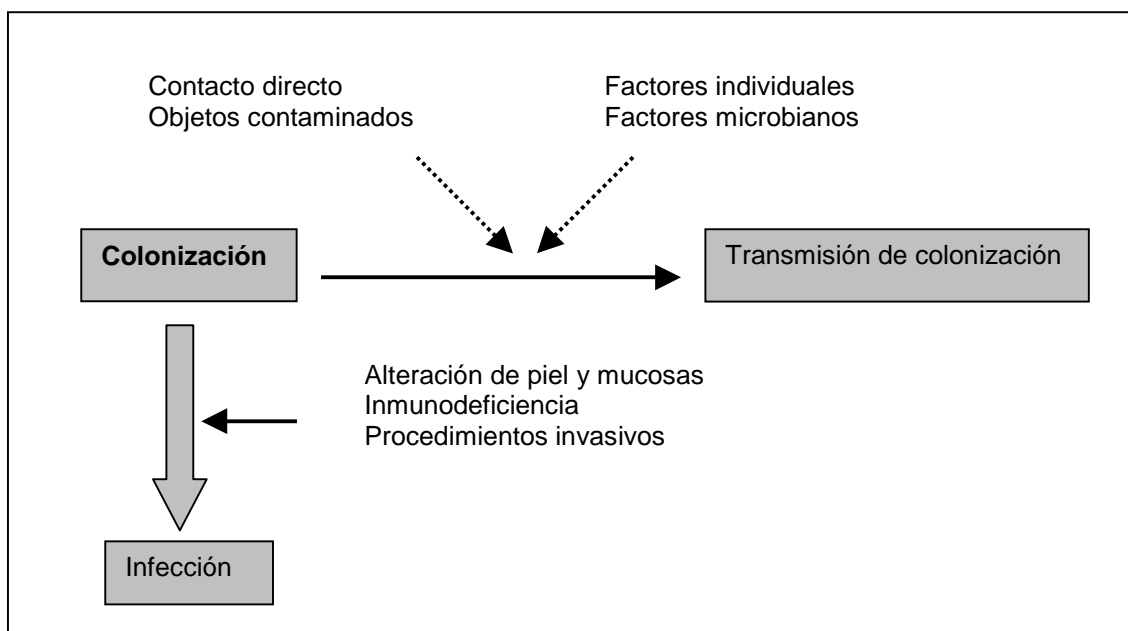


Figura 1. Papel de la colonización en la epidemiología de las infecciones por *S. aureus*.

Los reservorios son principalmente los pacientes colonizados, pero el personal sanitario (que puede estar colonizado de forma permanente o temporal) también puede actuar como tal. La transmisión se produce fundamentalmente de forma cruzada, a través de las manos del personal sanitario. No obstante, no hay que olvidar, aunque con menor importancia, el papel que juega el propio ambiente hospitalario (superficies, objetos de uso común, etc).

Los tipos de infecciones causadas por SARM no son diferentes de las causadas por *S. aureus* sensible a meticilina. Sin embargo, los pacientes hospitalizados con infecciones por SARM suelen estar graves y presentan una mayor comorbilidad. Las infecciones más importantes en las que está implicado SARM son la bacteriemia primaria, la relacionada con catéter, o secundaria, la infección quirúrgica, la neumonía, especialmente la asociada a ventilación mecánica y otras infecciones (infección de piel y tejidos blandos, osteomielitis, endocarditis, etc).

El papel del laboratorio de microbiología es importante en dos sentidos: (1) identificación de SARM en las muestras clínicas y (2) detección de SARM en las muestras de vigilancia epidemiológica, que es el objetivo de este documento.

3.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La toma de muestras en la vigilancia epidemiológica de SARM va encaminada a detectar pacientes o personal sanitario colonizados por este microorganismo. En diferentes estudios, se han evaluado múltiples muestras, desde el exudado nasal y faríngeo, perineal, axilar, hasta orina, heces, o exudado vaginal. Aunque muchas de estas muestras pueden ser válidas, es aconsejable emplear las que son más rentables para el objetivo perseguido (que no incluye en este caso el diagnóstico etiológico de un cuadro concreto, sino sólo la vigilancia de la situación

en el conjunto de una unidad o de un centro). En un estudio de colonización por SARM, la sensibilidad de las muestras tomadas fue la siguiente: exudado nasal 78,5%, nasal y faríngeo 85,6%, nasal y perineal 93,4%, nasal, faríngeo y perineal 98,3%. Con menos sensibilidad, como muestras únicas aparecían el exudado inguinal 15,6%, el axilar 10,1%, el perineal 38,1% y el faríngeo 30,8%. Teniendo en cuenta estos resultados se recomiendan las siguientes muestras:

- Exudado nasal: es la más adecuada si se elige una única muestra para los cultivos de vigilancia. En ocasiones, podría sustituirse por un exudado faríngeo, pero la toma de esta muestra es más incómoda para el paciente. Con una mayor sensibilidad está la triple muestra de exudados nasal, faríngeo y perirrectal o perineal.
- Exudado de piel de la zona perineal-perirrectal: tiene una alta sensibilidad, pero no se aconseja como muestra única.
- Muestras respiratorias: en pacientes con ventilación mecánica o traqueostomía.
- Exudados de úlceras o heridas: en pacientes con solución de continuidad en la piel.
- Urocultivo: en pacientes con sonda vesical.

3.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Para los exudados nasal, faríngeo y de piel se empleará una torunda con medio de transporte. Estas muestras se pueden conservar durante un tiempo inferior o igual a 24 horas a temperatura ambiente o en nevera entre 2-8°C.

3.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras de vigilancia epidemiológica para detectar SARM no precisan la realización de tinción de Gram, dado que los cocos grampositivos en racimos forman parte de la microbiota normal de la mayoría de las localizaciones de interés para estos

cultivos. Las muestras no precisan ningún tipo de preparación ni pretratamiento (centrifugación, homogeneización) previo a la inoculación de los medios de cultivo.

Para realizar la siembra se procederá a rotular los medios adecuados (previamente atemperados) para la búsqueda de SARM con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra. Con la torunda se descargará la muestra en aproximadamente un tercio de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma, y finalmente se procederá a extender la muestra con un asa estéril de manera cualitativa para obtener colonias aisladas.

3.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Se deben emplear medios selectivos y, preferiblemente diferenciales, donde SARM se identifique fácil y rápidamente. De entre las múltiples posibilidades existentes, los medios más empleados son el de agar manitol-sal (medio de Chapman) y los de agar cromogénico. Aunque se dispone de distintos tipos de medios cromogénicos, para el propósito que nos ocupa es recomendable usar los medios selectivos que están suplementados con oxacilina (o con cefoxitina), que actúa como agente selectivo impidiendo el crecimiento de las cepas de *S. aureus* sensibles a metilicina. Se han usado diferentes concentraciones de oxacilina (desde 0,5 a 6 mg/L) o de cefoxitina (desde 4 a 8 mg/L) como agentes selectivos para las cepas resistentes a metilicina. Estos medios selectivos son de gran utilidad en la detección de SARM en pacientes que también están colonizados por *S. aureus* sensible a metilicina, en estos casos los medios selectivos ponen de manifiesto la presencia de colonias de SARM que, de otro modo, podrían pasar desapercibidas entre la masa estafilocócica obtenida en un medio no selectivo sin oxacilina o cefoxitina. Los medios cromogénicos tienen la ventaja sobre el medio de manitol-sal de una identificación presuntiva más rápida de SARM. Estos medios existen ya preparados comercialmente.

Los medios se almacenarán a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad. Las placas inoculadas deben incubarse en estufa a 35-37°C. La elección de uno de estos medios de cultivo para la siembra primaria se basará en la organización interna de cada servicio y en la tasa de incidencia de SARM en el hospital.

Se recomienda realizar controles de calidad de los medios con las cepas *S. aureus* ATCC 29213 (sensible a metilicina) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a metilicina).

3.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizará una primera lectura a las 24 horas del cultivo; si en las placas no se detecta crecimiento de microorganismos, se prolongará la incubación hasta las 48 horas, y se volverá a realizar la lectura de las placas en ese momento.

Si se ha empleado agar manitol-sal:

1. A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos. Cualquier organismo manitol positivo (color amarillo) será sospechoso de ser *S. aureus*.
2. Se realizará un subcultivo de la colonia sospechosa en medio de agar sangre y en agar MRSA (*Methicillin-resistant-screening-agar*) que se leerá 24 horas después. El crecimiento en agar MRSA nos indicará que el microorganismo es resistente a metilicina.
3. El microorganismo en agar sangre se someterá a identificación definitiva realizando tinción de Gram, catalasa y coagulasa (en tubo o mediante aglutinación). En caso de resultar un coco grampositivo, catalasa y coagulasa positivo con crecimiento en agar MRSA, el microorganismo se identificará como SARM y se podrán realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y los estudios que se consideren oportunos (tipificación molecular, etc).

Si se ha empleado agar cromogénico selectivo:

1. A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos. Dependiendo del proveedor comercial que haya suministrado el medio de cultivo, cualquier microorganismo con una coloración compatible con lo especificado por el fabricante, se identificará como SARM.
2. Se realizará un subcultivo de esta cepa en agar sangre para realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y los estudios que se consideren oportunos (tipificación molecular, etc). Algunos autores recomiendan, en cualquier caso, una identificación definitiva, siguiendo un esquema similar al señalado previamente, al menos cuando se detecte el microorganismo en un paciente por primera vez.

Para la confirmación de la resistencia a metilicina mediante el método de disco-difusión, es importante recordar la utilidad del disco de cefoxitina (30 µg) recomendado por el CLSI. La cefoxitina es un potente inductor de la producción de PBP2a, ello hace que sea más precoz que la propia oxacilina en la detección de resistencias a la vez que la lectura de su halo de inhibición es más fácil. Además, no se han observado diferencias en relación a variaciones en el inóculo, temperatura de incubación o medio de cultivo, lo cual es de gran utilidad en la detección de cepas de SARM con expresión heterogénea de la resistencia a metilicina. La presencia de un halo de inhibición a cefoxitina inferior o igual a 21 mm en *S. aureus* significa que la cepa en estudio es un SARM (CLSI, 2007).

Muchos laboratorios de microbiología utilizan sistemas automatizados o comerciales para el estudio de la sensibilidad a antibióticos en *S. aureus*. La mayoría de estos sistemas utilizan sólo oxacilina para la detección de SARM, sólo los sistemas Vitek 2 (BioMérieux) y Phoenix (BD) han incluido cefoxitina con este propósito. Para el estudio de la sensibilidad

a oxacilina en *S. aureus* en general, los sistemas que contienen oxacilina ofrecen buenos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo, en cepas con una expresión heterogénea de la resistencia (*mecA* positivas) la capacidad de estos sistemas puede verse disminuida. Por tanto, se debería contemplar la necesidad de confirmar la resistencia o sensibilidad obtenida por estos sistemas en determinadas circunstancias como por ejemplo ante aislamientos importantes (obtenidos de hemocultivos, líquidos estériles), sospecha de fallo terapéutico o cuando se aíslan cepas con resistencias asociadas a otros grupos de antibióticos. Una forma de confirmación recomendable sería el uso de un disco de cefoxitina o alguno de los métodos rápidos que se exponen a continuación.

Con independencia de estos métodos fenotípicos, la confirmación de la resistencia a meticilina en *S. aureus* en una placa de cultivo se puede realizar detectando el gen *mecA* por PCR convencional o en tiempo real (método que en la actualidad se considera de referencia). Esta metodología además de tener el potencial de disminuir el tiempo de detección, es muy sensible y específica. Las cepas de SARM también se pueden reconocer más rápidamente mediante la aglutinación con látex para detectar la presencia de la PBP2a. Ésta es una prueba que no precisa de un equipo especial y que puede facilitar una respuesta rápida, siendo así un buen “informe preliminar” de un estudio de sensibilidad más completo que incluya, por ejemplo, la sensibilidad a cefoxitina.

Tanto la confirmación de la resistencia a meticilina mediante PCR del gen *mecA* como mediante la detección de la PBP2a requieren de una identificación previa del microorganismo a nivel de especie (*S. aureus*), puesto que la resistencia a meticilina en cepas de estafilococos coagulasa negativa también está mediada por el gen *mecA* y su producto, la PBP2a.

3.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

La información de los resultados dependerá de las placas utilizadas en la detección de este microorganismo.

Si se ha empleado agar manitol-sal:

1. Si a las 48 horas no hay colonias manitol positivas, ni compatibles con *S. aureus* se informará: “No se aísla *S. aureus*”
2. En caso de aislarse un microorganismo manitol positivo, coco en racimo grampositivo, catalasa y coagulasa positivos sin crecimiento en agar MRSA, se informará: “Se aísla *S. aureus* sensible a meticilina”.
3. Si se aísla un microorganismo manitol positivo, coco grampositivo en racimo, catalasa y coagulasa positivo con crecimiento en agar MRSA, se informará: “Se aísla *S. aureus* resistente a meticilina”

Sí se ha empleado agar cromogénico selectivo:

1. Sí a las 48 horas no hay colonias con la coloración característica definida por el

fabricante para *S. aureus* resistente a meticilina, se informará: “No se aísla *S. aureus*”.

2. En caso de aislarse un microorganismo con la coloración característica definida por el fabricante para *S. aureus*, se informará: “Se aísla *S. aureus* resistente a meticilina”.

3.8. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

La identificación de SARM por métodos tradicionales de cultivo es lenta. Con los cultivos en medio cromogénico este tiempo se ha acortado a 24-48 horas. Debido al aumento de las infecciones nosocomiales causadas por SARM y con la consiguiente necesidad de establecer aislamiento de contacto para limitar su expansión y pautar un tratamiento antimicrobiano adecuado, en la última década se han empezado a describir métodos rápidos, con resultados disponibles en horas. Estos métodos incluyen esencialmente la PCR a tiempo real en muestras clínicas para detectar SARM. Los estudios realizados hasta el momento dan a esta técnica una sensibilidad y especificidad muy altas (>90%). Uno de los problemas de esta aproximación es que al realizar la toma de exudado nasal o de piel, pueden coexistir de forma habitual, cepas de *S. aureus* sensible a meticilina y de *Staphylococcus* coagulasa negativo resistente a meticilina. Si se emplea el gen *mecA* para realizar la detección, la técnica puede ser positiva tanto en ese caso como en el caso de que existiera verdaderamente SARM. Por este motivo, algunos estudios se basan en la detección del *cassette* cromosómico SCC*mecA*, con una sensibilidad del 98% y una especificidad prácticamente del 100%. Probablemente, a nivel de vigilancia epidemiológica, este sea el futuro en la detección rápida de SARM en cultivos de vigilancia.

4. *Enterococcus* spp. RESISTENTE A LOS GLUCOPÉPTIDOS

El género *Enterococcus* está integrado por más de 20 especies, de las que *E. faecalis* es la que se ha venido aislando con mayor frecuencia en muestras clínicas (80-90%), seguida de *E. faecium* (5-10%). En los últimos años, sin embargo, se viene observando un aumento en el aislamiento de *E. faecium*, llegando a suponer hasta un 20% de los aislados.

Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal normal del ser humano. *E. faecalis* se aísla en altas concentraciones en el colon en más del 90% de los individuos sanos, mientras que el resto de especies se encuentran menos frecuentemente y en menor cantidad. También se pueden encontrar colonizando la cavidad oral, vagina, área perineal, tracto hepatobiliar y tracto respiratorio superior. Otros reservorios en pacientes hospitalizados incluyen la piel, las heridas abiertas y las úlceras de decúbito.

El enterococo posee la capacidad de sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables, por lo que también puede recuperarse del suelo, alimentos y agua. En los hospitales, tanto el equipamiento médico como el

ambiente que rodea a pacientes colonizados o infectados constituyen otro reservorio.

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a un gran número de antibióticos, incluyendo los beta-lactámicos, lincosamidas, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol. Además han adquirido resistencia a otros muchos antibióticos, tanto por mutaciones como por su elevada capacidad para intercambiar material genético con otros microorganismos mediante transferencia de plásmidos o transposones.

En 1988 se describen las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos (ERG) en Europa. En la actualidad se conocen diferentes fenotipos de resistencia a los glucopéptidos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG) con distinto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina. Los fenotipos más frecuentes son el VanA (alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina) y el VanB (resistencia de moderado a alto nivel a vancomicina pero no a teicoplanina). En ambos casos el fenotipo se debe a un mecanismo adquirido, inducible y capaz de ser transferido a otros cocos grampositivos, incluyendo *S. aureus*. El gen *vanA* (asociado al fenotipo VanA) se encuentra en el transposón *Tn1546* o en elementos relacionados y suele localizarse en plásmidos, lo que facilita su diseminación. El gen *vanB* (asociado al fenotipo VanB) se localiza habitualmente en el transposón compuesto *Tn1547* o en el transposón conjugativo *Tn5382*. Este último se suele insertar cerca del gen *pbp5* (que confiere resistencia a penicilina y ampicilina), lo que ayuda a explicar la transferencia simultánea de resistencia a vancomicina y ampicilina en cepas de *E. faecium*.

Algunas especies, como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a vancomicina, mediada por el gen *vanC*, y carecen de la importancia epidemiológica en el ambiente hospitalario que tienen *E. faecium* y *E. faecalis* cuando adquieren resistencia a glucopéptidos.

La mayor parte de los ERG corresponden a *E. faecium* con el genotipo *vanA*, pero también se han descrito epidemias debidas a esta especie con el genotipo *vanB* y a *E. faecalis*, en el que son igualmente más frecuentes esos dos genotipos. En nuestro país, donde por el momento los ERG son poco frecuentes, las cepas más habituales han sido *E. faecium vanA*.

Se ha prestado particular atención en los últimos años a los *E. faecium vanA* incluidos en el denominado complejo clonal 17 (CC17), que además de resistencia a los glucopéptidos presentan resistencia a ampicilina y a fluoroquinolonas, varios determinantes de patogenicidad y están particularmente bien adaptados al entorno hospitalario.

4.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

A pesar de que a los enterococos se les ha atribuido una escasa virulencia, estos se han considerado como microorganismos de importancia

creciente en la infección nosocomial, fundamentalmente en pacientes críticos, quirúrgicos o de áreas especiales como quemados, hemato-oncológicos y trasplantados. Causan infecciones urinarias, bacteriemias, infecciones de herida quirúrgica y de quemaduras, úlceras de pie diabético y úlceras de decúbito.

La vía más importante de transmisión nosocomial de ERG es el contacto directo o indirecto a través de las manos contaminadas del personal sanitario. Otras vías incluyen el contacto paciente-paciente y el contacto con el equipamiento médico y las superficies que rodean al paciente. En el caso de pacientes colonizados que presentan diarrea el riesgo de transmisión aumenta.

El papel del laboratorio en la prevención y control de la diseminación de estos microorganismos pasa necesariamente por la correcta identificación de las cepas de ERG en las muestras clínicas que se procesan diariamente, así como su detección en muestras de vigilancia epidemiológica dentro de programas de control de la transmisión nosocomial.

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

El tracto gastrointestinal de los pacientes ingresados constituye sin duda el principal reservorio de ERG en el ambiente hospitalario. Por este motivo, las muestras más habituales para el cultivo de vigilancia epidemiológica de ERG son las muestras de frotis rectal o perianal y las muestras de heces. En ocasiones se pueden aceptar otras muestras como la orina y los exudados de herida. En circunstancias especiales en que se requiera el estudio de contaminación ambiental se analizarán muestras procedentes de las superficies próximas al paciente y del instrumental médico en contacto con él.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Enterococcus spp. puede sobrevivir durante mucho tiempo en ambientes desfavorables por lo que la muestra no va a requerir condiciones especiales de transporte y conservación. Si embargo debido a las características de las muestras habitualmente seleccionadas para su detección (heces o frotis rectal), si el procesamiento no va a ser inmediato se recomienda su conservación a 4°C para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota comensal acompañante.

4.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras para vigilancia epidemiológica de ERG se inocularán directamente en los medios de cultivo, ya que no requieren la realización de medidas previas de pretratamiento.

Los medios de cultivo se identificarán con el número de la muestra y la fecha. La inoculación de los medios de cultivo sólidos debe realizarse por agotamiento con el fin de obtener colonias aisladas. Para ello se realiza la descarga de la muestra en un cuadrante de la placa, rotando el hisopo por la superficie del agar, y a continuación se extiende en zigzag con asa estéril por el resto de la placa.

4.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Los medios más frecuentemente utilizados son los selectivos y diferenciales que permiten la detección rápida de ERG a partir de muestras altamente contaminadas. Estos últimos contienen vancomicina (como agente selectivo, habitualmente a concentración de 6 a 8 mg/L) y esculina, que es hidrolizada por enterococos y estreptococos grupo D dando lugar a esculetina, que al reaccionar con el citrato férrico del medio forma un complejo de color negro o marrón. Este fenómeno se traduce en un oscurecimiento del medio que rodea a las colonias crecidas en medio sólido, y un oscurecimiento completo del caldo si se trata de medios líquidos. Además contienen sales biliares para inhibir el crecimiento de otras bacterias grampositivas y azida sódica para inhibir el crecimiento de bacterias gramnegativas. En función de la concentración de vancomicina presente en el medio podrá inhibirse o no el crecimiento de enterococos con bajo nivel de resistencia, como algunos aislamientos con fenotipos VanB o VanC.

Existen diferentes tipos de medios comercializados, líquidos y sólidos, que se pueden utilizar en el cribado de ERG. Aunque existen medios cromogénicos que permiten la detección de *Enterococcus* spp. (con independencia de su sensibilidad a glucopéptidos), no se dispone de información suficiente sobre el empleo de los mismos para el reconocimiento específico de ERG. Las placas inoculadas deben incubarse a 35-37 °C durante 48 h y se deben realizar lecturas a las 24 y 48 h.

Se recomienda realizar controles de calidad de los medios con las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (sensible a vancomicina).

4.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

En el medio de cultivo selectivo y diferencial anteriormente descrito, la aparición de pequeñas colonias translúcidas acompañadas de una pigmentación negra o marrón a su alrededor hará sospechar de la presencia de ERG. Si se ha empleado caldo de cultivo se observará un oscurecimiento del medio. Si se utiliza otro medio de cultivo se buscarán colonias con las características que especifique el fabricante.

Las colonias sospechosas se someterán a tinción de Gram y catalasa. Si se trata de cocos grampositivos, catalasa negativo, serán subcultivadas en una placa de agar sangre y en otra de cribado de resistencia a vancomicina (agar BHI suplementado con 6 mg/L de vancomicina) según las recomendaciones del CLSI.

A partir del crecimiento en agar sangre se realizarán los estudios oportunos para su identificación a nivel de especie y estudios de sensibilidad. La identificación definitiva se llevará a cabo mediante la utilización de pruebas clásicas

(PYR, LAP, movilidad, pigmentación, fermentación de azúcares), utilizando galerías comerciales o sistemas automatizados de identificación, o bien mediante técnicas de microbiología molecular.

4.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si el cultivo es positivo para ERG se informará como “se aísla *Enterococcus* resistente a glucopéptidos”.

Si después de 48 horas el cultivo es negativo para ERG se informará como “no se aísla *Enterococcus* resistente a glucopéptidos”.

El aislamiento de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, con bajo nivel de resistencia intrínseca a vancomicina (*vanC*), no debe informarse como *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos cuando se aislen en cultivos de vigilancia, por no conocerse su verdadero significado epidemiológico ni su trascendencia clínica.

4.8. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

En los últimos años se han desarrollado técnicas de PCR a tiempo real que permiten detectar la presencia de los genes *vanA* y *vanB* directamente de muestras clínicas. Los diferentes estudios realizados al respecto parecen demostrar una mayor sensibilidad de estas técnicas con respecto al método de cultivo en medios selectivos, además de una mayor rapidez en la obtención de los resultados y la posibilidad añadida de detectar ERG tanto de la muestra directa como del crecimiento en cultivo convencional.

5. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

El mecanismo de resistencia más frecuente a beta-lactámicos en enterobacterias es la producción de beta-lactamasas. Las dos principales clasificaciones de estas enzimas son la de Ambler, basada en homología estructural (similitud de aminoácidos), y la de Bush-Jacoby-Medeiros, que se basa en homología funcional (perfil de sustrato e inhibidores). La clasificación de Ambler considera cuatro clases moleculares: A, B, C y D; las clases A, C y D corresponden a las beta-lactamasas que presentan una serina en su centro activo y la clase B a las metalo-beta-lactamasas (ver apartado 7). La clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros divide a las beta-lactamasas en cuatro grupos principales y múltiples subgrupos funcionales.

Uno de los grupos de beta-lactamasas con mayor trascendencia clínica es el de las BLEE, codificadas por plásmidos. Estas enzimas se inhiben por los denominados inhibidores de beta-lactamasas de serina (como ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) e hidrolizan in vitro todos los beta-lactámicos de uso clínico, salvo las carbapenemas y las cefamicinas. Las BLEEs corresponden a la clase molecular A (grupos funcionales 2be) y D (grupo funcional 2de).

La mayoría de los autores coinciden en que las enzimas plasmídicas que estructuralmente se relacionan con las beta-lactamasas de clase C de algunas enterobacterias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*,...) no

deben considerarse estrictamente BLEEs, pues a diferencia de estas enzimas no hidrolizan con eficacia las cefalosporinas anfóteras (como cefepima) y además no se inhiben por inhibidores de serina (con algunas excepciones para tazobactam). De igual forma, aunque se han descrito beta-lactamasas de clase A que hidrolizan carbapenemas y que se inhiben parcialmente por el ácido clavulánico, estas otras enzimas deben considerarse genéricamente carbapenemasas, y tampoco se incluirían dentro de las BLEEs.

La primera BLEE se describió en Alemania en los primeros años de la década de los años 1980, derivaba de la beta-lactamasa de amplio espectro SHV-1 y fue denominada SHV-2. Esta BLEE difiere de su progenitor en el cambio de una serina en la posición 238. Posteriormente se describieron nuevas BLEEs derivadas de las beta-lactamasas TEM-1 y TEM-2, de las que también se diferenciaban por cambios puntuales en un aminoácido. Existen en la actualidad infinidad de BLEEs incluidas en estas dos grandes familias SHV y TEM. Más recientemente se ha descrito un nuevo gran grupo de BLEEs genéricamente conocido como CTX-M, cuyo origen se relaciona con la beta-lactamasa cromosómica de *Kluyvera* spp. y que recibieron este nombre por una mayor actividad hidrolítica sobre cefotaxima que sobre ceftazidima, aun cuando con posterioridad se describieron enzimas CTX-M que también hidrolizan ceftazidima muy eficazmente. Se han descrito otras BLEE aisladas con menor frecuencia que pertenecen a diferentes familias como OXA, PER, VEB, BES, GES, SFO, IBC, etc. Aunque las BLEEs son en su gran mayoría sensibles al ácido clavulánico, se han descrito variantes que siendo capaces de hidrolizar oxiiimino-beta-lactámicos no se inhiben por los inhibidores de serina habituales. Puede encontrarse una relación detallada de las diferentes enzimas incluidas en las distintas familias de BLEEs en la dirección de internet:

<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>

Es importante tener en cuenta que en un mismo microorganismo pueden coexistir una o más BLEEs con otras beta-lactamasas de amplio espectro (TEM-1, TEM-2, SHV-1), con beta-lactamasas de tipo AmpC (cromosómicas o plasmídicas) o con otros mecanismos de resistencia, como pérdida de porinas, lo que ocasiona una modificación del patrón fenotípico de resistencia habitual en las cepas que tan sólo expresan una BLEE determinada.

5.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Tras su detección inicial en Alemania y posteriormente en Francia, las BLEEs se describieron también en un breve espacio de tiempo, en el resto de Europa (en España en 1988), y con posterioridad se han reconocido en todas las regiones de América, en el norte de África, Oriente Medio, Asia y Australia.

Hasta hace pocos años la mayoría de las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE estaban causadas por *K. pneumoniae* o por *E. coli*, y se producían en pacientes hospitalizados o en

centros de enfermos crónicos. Sin embargo, en los últimos años han cobrando gran relevancia las infecciones de origen estrictamente comunitario producidas por estos microorganismos, en particular *E. coli* productor de enzimas de la familia CTX-M. También están adquiriendo importancia creciente las infecciones producidas por otras especies de enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*,...) que presentan estos enzimas. En un estudio multicéntrico sobre microorganismos productores de BLEE realizado en España en el año 2000, el 93% de las *K. pneumoniae* se aislaron en pacientes hospitalizados, pero el 51% de *E. coli* con BLEE se aislaron en pacientes que en el momento de toma de la muestra clínica no estaban hospitalizados.

La causa del súbito aumento de microorganismos productores de BLEE en la comunidad no está clara pero podría estar relacionada con la co-selección y el amplio uso de antimicrobianos (incluyendo su uso en animales), la mayor eficacia de los elementos genéticos que albergan los genes que codifican las BLEE para su transmisión entre diferentes microorganismos y la mayor utilización de los servicios sanitarios hospitalarios por parte de la población general. Varios autores han descrito un aumento del número de portadores fecales de BLEE en la comunidad, lo que podría incrementar la probabilidad de colonización en otros individuos.

El principal mecanismo de transmisión de estos microorganismos se produce a través de las manos del personal sanitario, que se coloniza cuando entra en contacto con pacientes que a su vez están colonizados. El aparato digestivo es el principal reservorio de estas cepas. La tasa de portadores fecales en situaciones de epidemia en unidades de cuidados intensivos puede llegar a ser del 30-70% de los pacientes ingresados, de ahí la importancia que tiene detectar los portadores fecales, ya que no sólo son una fuente de infección para otros enfermos, sino que es más probable que los enfermos colonizados sufran una infección por estos microorganismos. Se han descrito otros mecanismos de transmisión que incluyen los objetos que rodean a los pacientes o los productos utilizados en la higiene de los mismos, pero la contribución real de estas fuentes en el desarrollo del brote es difícil de determinar.

Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar colonización o infección por microorganismos productores de BLEE son aquellos que tienen una enfermedad de base grave, estancias prolongadas en el hospital, diferentes objetos médicos de soporte vital (sonda urinaria, catéteres intravasculares, tubos endotraqueales) y reciben tratamiento antimicrobiano durante periodos prolongados. Varios estudios han relacionado el uso de cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos con la adquisición de infección por cepas productoras de BLEE. En el caso particular de las infecciones causadas por *E. coli* productor de CTX-M, los factores de riesgo asociados con mayor

frecuencia incluyen diabetes, uso previo de quinolonas, infección urinaria de repetición, estancias previas en el hospital y edad avanzada.

El laboratorio de microbiología tiene un papel relevante en el control de las enterobacterias productoras de BLEE, siendo responsable de la identificación de los microorganismos productores de estas enzimas tanto en muestras diagnósticas como en las obtenidas de portadores asintomáticos. En situaciones de brote epidémico es útil investigar posibles fuentes ambientales de la infección.

5.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Muchos pacientes sufren una colonización asintomática por enterobacterias productoras de BLEEs, siendo el principal reservorio el aparato digestivo, por lo que las muestras de elección son el frotis rectal o las heces.

En algunos centros tras producirse una epidemia inicial por estos microorganismos se llega a una situación de endemia, que con frecuencia representa una situación de muy difícil control. En una unidad en la que no se hubieran detectado previamente cepas productoras de BLEE se aconseja tomar un frotis rectal/heces de los pacientes ingresados para determinar el grado de colonización. También deben tomarse muestras ambientales para evaluar la posible presencia de una fuente común, que en caso de poder determinarse (lo que pocas veces suele ocurrir) resulta fundamental para controlar el brote. La identificación de pacientes colonizados permite poner en marcha medidas de control de infección (aislamiento de contacto) que ayudarán a frenar la expansión del problema. Una vez que la situación se hace endémica, el control es mucho más complejo, pero la toma de muestras de vigilancia sigue siendo importante para determinar la utilidad de las medidas de control que puedan implementarse.

5.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

No se precisan condiciones especiales de transporte y conservación para el cultivo de enterobacterias productoras de BLEE.

5.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez seleccionados los medios de cultivo en los que se va a inocular la muestra (ver más adelante), estos se inocularán siguiendo las directrices habituales que ya se han indicado en apartados anteriores para otras bacterias multirresistentes.

5.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Para asegurar un rendimiento óptimo en la recuperación de enterobacterias productoras de BLEE a partir de frotis rectales y heces es necesario emplear medios selectivos, que eviten el crecimiento de la microbiota sensible. Hay descritos en la literatura diferentes medios de este tipo, siendo los más habituales los que están suplementados con cefotaxima o ceftazidima. Los medios base a los que

se añaden estos antibióticos suelen ser agar MacConkey, agar de Driglasky o agar nutritivo con vancomicina y anfotericina B. También se ha comercializado recientemente un medio cromogénico (ESBL-Bx) que permite una identificación preliminar de las enterobacterias productoras de BLEE en 24 horas y que, en función de la coloración de las colonias, disminuye la necesidad de identificar algunos de los microorganismos que crecen en el medio.

Se han publicado estudios en los que las concentraciones de cefotaxima o ceftazidima empleadas han oscilado entre 0,5 y 4 mg/L, aunque una concentración demasiado alta (4 mg/L) podría determinar una menor sensibilidad en la detección. La elección del medio y del agente de selección debe tener en cuenta la situación epidemiológica de la unidad o el centro donde se lleve a cabo el estudio. Aunque las BLEEs hidrolizan con mayor o menor eficacia tanto cefotaxima como ceftazidima, debe tenerse en cuenta que algunas enzimas del grupo CTX-M hidrolizan muy poco este último.

Las placas se incubarán a 35°C en aerobiosis, y se realizarán lecturas a las 24 y 48 horas de la siembra.

Como cepas control se pueden utilizar *E. coli* ATCC 25922 (no productor de BLEE) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (productor de BLEE).

5.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Aunque los medios selectivos están diseñados para garantizar una alta sensibilidad en la detección de cepas con BLEE, es obvio que el criterio de selección resulta poco específico, pues los microorganismos que crezcan en las placas pueden haberlo hecho como consecuencia de muy diferentes mecanismos de resistencia, y desde luego, no todos ellos serán necesariamente enterobacterias. Es fundamental, por tanto, cuando se emplee un medio selectivo de los anteriormente descritos, seleccionar las colonias con morfología de enterobacteria, y proceder a su identificación a nivel de especie, lo que puede realizarse mediante pruebas bioquímicas convencionales, galerías comerciales o paneles de sistemas (semi)automatizados. Esta información será de gran ayuda para evaluar la posible presencia de BLEE en el microorganismo estudiado.

El CLSI ha estandarizado métodos de cribado y de confirmación fenotípica de producción de BLEE en *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis*. La caracterización de la presencia de BLEE en otras enterobacterias (o incluso en bacterias gramnegativas no fermentadoras) es mucho más compleja y no se desarrollará en este documento. En cualquier caso, la detección de BLEE en otras especies sin AmpC cromosómica, como *Salmonella enterica*, podría estar basada en los criterios que se exponen a continuación, mientras que en aquellos microorganismos que expresan habitualmente AmpC (*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morgani*, *S. marcescens*) la sospecha de BLEE puede inferirse (entre otros marcadores) de la actividad comparada

de cefepima y cefepima con ácido clavulánico, de forma similar a como se interpretan las pruebas con cefotaxima/ceftazidima solas y con ácido clavulánico que se exponen a continuación. La demostración de que una cepa aislada en las placas de selección es capaz de transferir el fenotipo BLEE a una cepa receptora mediante un experimento de conjugación es una demostración definitiva de la presencia del enzima en la cepa parental, con independencia de la especie considerada. Desgraciadamente este tipo de estudios escapa a las necesidades del trabajo diario en un laboratorio clínico, pero puede plantearse como una medida necesaria a desarrollar en el propio laboratorio o con la ayuda de un centro de referencia.

Para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, el CLSI ha propuesto sendos métodos de cribado para la detección de BLEEs mediante la realización de un antibiograma por el método de disco difusión o mediante el método de dilución. En este último caso se indica el uso de ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona a una concentración de 1 mg/L. Puesto que las placas con medio selectivo de alguna forma remedan esta última situación, es razonable asumir que los microorganismos que crecen en las placas selectivas son sospechosos de producir BLEE, por lo que es aconsejable realizar directamente una prueba de confirmación de la producción de BLEE. Para llevar a cabo esta confirmación el CLSI también propone dos opciones, basadas en los métodos de disco difusión y de microdilución, respectivamente.

Para la confirmación de la producción de BLEE mediante disco difusión, se recomienda la utilización de discos de cefotaxima (30 µg) o ceftazidima (30 µg) con y sin ácido clavulánico (10 µg). La prueba se realiza en agar Mueller-Hinton con un inóculo de 0,5 McFarland y un tiempo de incubación de 16-18 horas. Una diferencia de ≥ 5 mm en el diámetro del halo de cualquiera de las cefalosporinas y el correspondiente halo del disco con ácido clavulánico confirma la producción de BLEE. Los resultados de los trabajos realizados para determinar la eficacia de este método en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* indican que en el 89% de los casos la producción de BLEE se confirma con cefotaxima y ceftazidima; en el 9% se confirma con ceftazidima solamente, y en el 2% con cefotaxima solamente. Atendiendo a los resultados de estos trabajos y teniendo presente que si sólo se utiliza el disco de ceftazidima podrían no detectarse cepas con producción de CTX-M, es necesario utilizar las dos cefalosporinas en las pruebas fenotípicas de confirmación.

La confirmación mediante microdilución en caldo se basa en el uso de ceftazidima (0,25 -128 mg/L) y cefotaxima (0,25-64 mg/L) con y sin ácido clavulánico a una concentración fija de 4 mg/L. Se considera que la prueba es positiva cuando la CMI de una o de las dos cefalosporinas disminuye 3 ó más diluciones en presencia de ácido clavulánico.

Igual que en el método de disco difusión es necesario utilizar las dos cefalosporinas.

Las cepas recomendadas por el CLSI para el control de calidad tanto en la prueba de cribado como en la de confirmación son *E. coli* ATCC 25922 (cepa no productora de BLEE) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (cepa productora de SHV-18, que además presenta pérdida de porinas *Omp K35* y *Omp K37*).

La confirmación fenotípica puede ocasionar falsos positivos en cepas de *K. pneumoniae* y de *E. coli* que hiperproducen SHV-1 y que han sufrido una pérdida de porinas y en cepas de *Klebsiella oxytoca* que hiperproducen la beta-lactamasa cromosómica K1, enzima que tiene una actividad hidrolítica similar a la de las BLEE. El incremento de la CMI de aztreonam junto con CMIs de ceftriaxona y de cefotaxima mucho mayores que la CMI de ceftazidima ayuda a sospechar esta última posibilidad. Se han descrito falsos negativos en cepas de *K. pneumoniae* que producen además de BLEE una beta-lactamasa plasmídica de tipo AmpC, por la incapacidad del ácido clavulánico para inhibir este último enzima. El uso de inóculos inferiores al recomendado también es una causa de falsos negativos en la prueba de confirmación.

Con independencia de los métodos propuestos por el CLSI, la detección de BLEE se puede determinar también con otras pruebas (difusión del doble disco, difusión con discos comparando los resultados en agar Mueller-Hinton y en agar Mueller-Hinton suplementado con ácido clavulánico, prueba tridimensional) o mediante pruebas comerciales diseñadas específicamente con este fin. Entre estas últimas se incluyen las tiras de Etest que contienen ceftazidima o cefotaxima (0,5-32 mg/L) en un extremo y la misma cefalosporina con ácido clavulánico (4 mg/L) en el otro. El fabricante recomienda que para considerar el resultado como positivo, se produzca una disminución de ≥ 8 veces en la CMI de la cefalosporina en presencia de ácido clavulánico. Existe también una tira de cefepima con y sin ácido clavulánico. El principal inconveniente de este método es su elevado coste. Varios sistemas automatizados de antibiograma como Vitek (BioMerieux), MicroScan (Dade Behring) y BD Phoenix (Becton Dickinson Biosciences) disponen en sus paneles/tarjetas comerciales de pocillos específicamente diseñados para el reconocimiento de enterobacterias productoras de BLEEs. En general se obtienen buenos resultados con estos sistemas, que además suelen disponer de un sistema experto que alerta de la presencia de este mecanismo de resistencia.

5.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si el cultivo es positivo para *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *P. mirabilis* y se confirma la producción de BLEE se informará como "se aísla [nombre de especie] productora de BLEE".

Si tras 48 horas el cultivo es negativo, o si en algunas de las tres especies indicadas no se demuestra

la producción de BLEE se informará como “no se aísla *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *P. mirabilis* productores de BLEE”.

La identificación de alguna otra enterobacteria en la que sin género de duda se haya demostrado la presencia de BLEE se informará de igual forma “se aísla [nombre de especie] productora de BLEE”, teniendo en cuenta los objetivos perseguidos en el programa de vigilancia que se esté llevando a cabo.

5.8. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES

Para el propósito de la vigilancia de la infección nosocomial es suficiente en la mayoría de los casos conocer si un determinado microorganismo produce o no BLEE, sin requerirse la identificación del enzima en cuestión. Esto último puede ser necesario para analizar en detalle los aspectos moleculares de la situación epidémica o endémica que pueda existir en un centro, contribuyendo a aclarar si los microorganismos productores de BLEE están relacionados clonalmente entre sí y si todos ellos producen el mismo enzima.

Este tipo de estudios no suelen realizarse en todos los centros donde es posible llevar a cabo los métodos que se han descrito sucintamente en este documento y que se detallan en el correspondiente documento técnico.

La caracterización de la relación clonal puede realizarse por alguno de los métodos que se detallan en el correspondiente procedimiento microbiológico de la SEIMC

(<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/>). La caracterización de los plásmidos que contienen el gen que codifica la BLEE también puede ayudar a analizar la epidemiología molecular del problema. Mediante isoelectrofoque se puede determinar el punto isoelectrofoque de las beta-lactamasas (BLEEs y de otro tipo) que puedan existir en la cepa clínica estudiada. La caracterización de la BLEE se lleva a cabo habitualmente mediante secuenciación del gen que codifica la enzima, partiendo preferiblemente de un transconjugante que contenga el plásmido correspondiente, lo que evita la interferencia de otros genes de beta-lactamasas de la cepa parental.

6. *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

El género *Acinetobacter* incluye un amplio número de especies/genospecies entre las que destaca *Acinetobacter baumannii* por su mayor importancia clínica. La compleja taxonomía de estos microorganismos dificulta bastante su identificación precisa a nivel de especie, lo que con frecuencia requiere el uso de métodos moleculares que pudieran no estar disponibles en todos los laboratorios clínicos. Muchos métodos bioquímicos (tanto convencionales como comerciales) que con frecuencia se emplean con éxito para identificar a nivel de especie bacterias gramnegativas de interés clínico son insuficientes para identificar con fiabilidad *A. baumannii*, y a lo sumo permiten definir el llamado “complejo *A. baumannii*”, del que además de *A. baumannii* también forma parte *Acinetobacter calcoaceticus* y las especies 3 y 13 de Tjerneberg y Ursing.

Hasta hace algunas décadas las especies de *Acinetobacter*, incluyendo *A. baumannii*, se aislaban con poca frecuencia de muestras clínicas. Se acepta que, en general, estos microorganismos tienen un bajo poder patógeno, y suelen actuar como oportunistas, sobre todo en unidades de cuidados intensivos. Desgraciadamente, *A. baumannii* ha sido capaz de desarrollar resistencia a los antimicrobianos, de persistir en el medio ambiente durante largos períodos y de extenderse a la gran mayoría de los (grandes) hospitales, donde ha ocasionado graves epidemias y situaciones de endemia. Con gran frecuencia las cepas de *A. baumannii* nosocomiales son resistentes a beta-lactámicos (incluyendo las carbapenemas en bastantes ocasiones), fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cotrimoxazol y otros antimicrobianos. Algunas cepas sólo son sensibles a las polimixinas, pero incluso se han descrito aislados resistentes también a estos compuestos.

Las cepas de *A. baumannii* multirresistente presentan simultáneamente varios mecanismos de resistencia expresados a partir de genes tanto cromosómicos como adquiridos. La resistencia a beta-lactámicos se relaciona con la producción de diferentes beta-lactamasas (AmpC, oxacilinas, metalo-beta-lactamasas), con alteraciones de la permeabilidad y con la expresión de PBPs de baja afinidad. La producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y de mecanismos de expulsión activa se relaciona con la resistencia a aminoglucósidos. En el caso de la resistencia a las fluoroquinolonas se han descrito mutaciones cromosómicas que conducen a alteraciones de las topoisomerasas de clase II (ADN-girasa y topoisomerasa IV) y mecanismos de expulsión activa. Muchas cepas albergan integrones de clase 1 que contienen los genes que codifican oxacilinas, metaloenzimas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Los porcentajes de sensibilidad a distintos antimicrobianos entre 211 aislados de *A. baumannii* procedentes de un estudio multicéntrico español (25 centros), en el que se recogieron microorganismos en noviembre de 2000 fueron: polimixina B 100%, minociclina 66%, imipenem 52%, rifampicina 49%, sulbactam 47%, meropenem 43%, ampicilina 35%, doxiciclina 32%, tobramicina 21% y para piperacilina, ceftazidima, cefepima, gentamicina, cotrimoxazol, tetraciclina, ciprofloxacino y gemifloxacino la sensibilidad fue inferior al 20%. Esta situación de multirresistencia recuerda un tanto lo que sucede en SARM, y de hecho algunos autores consideran que *A. baumannii* podría ser considerado como un “SARM gramnegativo”. Afortunadamente, su importancia en términos de morbilidad y de mortalidad es mucho menor que la de *S. aureus*.

En la mayoría de los centros, tras una primera fase de epidemia que no llega a controlarse se produce una situación de endemidad. Los estudios de epidemiología molecular indican que incluso en esta última situación sólo persisten uno o dos clones mayoritarios, aunque también se han descrito

situaciones en las que en un mismo centro coexisten múltiples clones.

6.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Como *A. baumannii* es capaz de sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos, la contaminación ambiental es importante porque permite la transmisión del patógeno al paciente directamente o a través de las manos del personal sanitario, que suele estar colonizado sólo de forma transitoria. Además, los pacientes colonizados o infectados son un importante reservorio del microorganismo.

A. baumannii puede causar una amplia variedad de infecciones, incluyendo la bacteriemia, neumonía nosocomial (en particular en el paciente con ventilación mecánica), meningitis, infecciones urinarias, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones de tejidos blandos.

A. baumannii es típicamente un patógeno nosocomial. Aunque se han descrito brotes en unidades médicas y quirúrgicas, la mayoría han tenido lugar en UCIs. Los factores de riesgo relacionados con su adquisición incluyen una estancia hospitalaria prolongada, empleo de maniobras invasoras, inmunosupresión, enfermedad de base grave y uso previo de antimicrobianos. Cuando se consideran las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas, los resultados de un estudio de cohortes en España han demostrado que los factores de riesgo relacionados eran: hospitalización en centros con más de 500 camas, tratamiento antimicrobiano previo, intervención quirúrgica previa y uso de sonda urinaria.

Se ha observado que las infecciones nosocomiales por *A. baumannii* (y en particular la bacteriemia) siguen cierta estacionalidad, con un incremento de casos en los meses de verano. Tal vez ello guarde relación con los cambios de temperatura y humedad, sin descartar el posible papel de los cambios en el personal sanitario durante esa época del año.

A diferencia de lo que ocurre con SARM, no parece que la expansión de *A. baumannii* multirresistente al medio extrahospitalario haya sido muy importante. Aun así, recientemente se han documentado infecciones por este patógeno en pacientes traumatizados tras terremotos y en soldados de las recientes guerras del Golfo, de Afganistán y de Irak.

El papel del laboratorio de microbiología en el control de las infecciones por *A. baumannii* multirresistente, como en los casos anteriormente indicados, se relaciona con la identificación del patógeno en muestras clínicas con fines diagnósticos y en muestras obtenidas de pacientes que puedan estar colonizados o del medio ambiente hospitalario. Para establecer el origen de los brotes es conveniente realizar estudios de epidemiología molecular con los aislados que se obtengan tanto de muestras clínicas como de cultivos de vigilancia.

6.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Dada la complejidad de la epidemiología de las infecciones por *A. baumannii* multirresistente, es adecuado considerar la toma de muestras tanto del paciente como de muestras ambientales.

Las muestras de vigilancia en pacientes que se han evaluado más frecuentemente incluyen esputo y exudado de traqueostomía, heridas, axila/ingle y frotis rectal. En un estudio español sobre detección de *A. baumannii* en distintas muestras de vigilancia en pacientes de UCI, se identificó el microorganismo en el 75% de las muestras axilares o faríngeas y en el 77% de los frotis rectales; la combinación de muestras axilar-faríngea y axilar-rectal permitió la identificación en un 90% de los pacientes, cifra que alcanzó el 96% para la combinación de muestra faríngea-rectal.

Las muestras ambientales a considerar pueden ser muy diversas. Se ha descrito contaminación por *A. baumannii* en componentes de los equipos de respiración asistida, líquidos diversos, medicaciones multidosis, ropa de cama, transductores de presión no desechables y se ha encontrado también en las superficies de mobiliario (carros de curas o de medicación) que rodea a los pacientes.

6.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Como hemos indicado, *A. baumannii* logra sobrevivir fácilmente en el medio ambiente, por lo que no es necesario observar condiciones especiales de transporte y conservación de las muestras de vigilancia epidemiológica. Como en otros casos, si el procesamiento de los frotis rectales no va a ser inmediato se recomienda su conservación a 4°C para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota comensal acompañante

6.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras procedentes de pacientes se procesarán siguiendo las pautas habituales. Las muestras ambientales tomadas con torunda en medio líquido se cultivarán en un medio sólido para identificación de colonias, manteniendo la punta de la torunda en el tubo con medio líquido para asegurar el crecimiento de pequeñas cantidades de inóculo que pudieran no detectarse en el subcultivo.

6.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

A. baumannii crece sin dificultad en los medios de cultivo habituales. Las muestras de vigilancia procedentes de los pacientes se pueden sembrar en cualquiera de los medios selectivos habituales para bacterias gramnegativas, por ejemplo agar MacConkey. Ahora bien, teniendo en cuenta que el objetivo del estudio es la detección de las cepas multirresistentes es preferible emplear medios de cultivo diferenciales suplementados con un antimicrobiano al que el microorganismo sea resistente. Se ha empleado el medio LAM (Leeds Acinetobacter Medium), que está suplementado de vancomicina (10 mg/L), cefsulodina (15 mg/L) y

cefradina (50 mg/L) para el aislamiento selectivo de *Acinetobacter* en muestras clínicas o ambientales. Como una gran mayoría de cepas son resistentes a gentamicina, muchos protocolos aconsejan también el uso de agar MacConkey suplementado con gentamicina a una concentración de 8 mg/L.

Con independencia de ello, es posible que el laboratorio esté interesado no sólo en la detección de *A. baumannii* multirresistente, sino también de otros gramnegativos de interés nosocomial; en estos casos podría aprovecharse el uso de placas de agar MacConkey suplementado con cefalosporinas de amplio espectro (cefotaxima o ceftazidima; ver anteriormente) para aislar el microorganismo, sin necesidad de emplear una placa selectiva adicional. A la hora de diseñar la estrategia más pertinente se podrán tener en cuenta, si es que son conocidas, las características microbiológicas del clon o clones objeto de estudio, junto con los aspectos económicos y de carga de trabajo más razonables. Las muestras ambientales pueden procesarse en caldo BHI, y el subcultivo puede realizarse en el mismo tipo de medio sólido empleado para las muestras clínicas descritas en el párrafo anterior. Como en otros casos, los medios de cultivo se incubarán en aerobiosis a 35°C durante 48 horas.

6.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizará lectura de los cultivos a las 24 y a las 48 horas de su inoculación. La identificación presuntiva de las colonias de *A. baumannii* se basará en la morfología de las colonias, que suelen ser brillantes, a veces de aspecto mucoso, y de color blanco amarillento, a veces ligeramente marrónáceo. El microorganismo es productor de catalasa pero no de oxidasa.

La identificación a nivel de especie, como se ha dicho, es compleja y mediante el uso de galerías o de paneles comerciales no se garantiza completamente. Por esta razón en muchos laboratorios la identificación bioquímica se completa sólo con un tubo de TSI (*A. baumannii* es no fermentador y crece visiblemente en la superficie de la lengüeta del medio) y a lo sumo de movilidad (*A. baumannii* es inmóvil). Si se emplean los referidos métodos bioquímicos comerciales y el método en cuestión señala la identificación de *A. baumannii*, es recomendable casi siempre hacer referencia en la identificación al "complejo *A. baumannii*" antes que a la especie *A. baumannii* propiamente dicha. La identificación de especie definitiva se realiza mediante métodos moleculares, habitualmente en centros de referencia.

Una vez que se ha identificado "*A. baumannii*", o simplemente "*Acinetobacter* spp.", los resultados del antibiograma (ya sea por difusión con disco, o los procedentes de paneles comerciales si se ha considerado su uso) permitirán definir el fenotipo de resistencia y en función del mismo la catalogación del aislado como multirresistente.

6.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

La identificación de *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii* si se ha realizado una identificación precisa) multirresistente se informará: "se aísla *Acinetobacter* spp. multirresistente".

Si tras 48 horas de incubación no se aísla el microorganismo, se informará "no se aísla *Acinetobacter* spp."

Si la cepa aislada no fuera multirresistente se informará "no se aísla *Acinetobacter* spp. multirresistente".

7. *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE PRODUCTORA DE METALO-BETA-LACTAMASA (MBL).

P. aeruginosa es la especie de mayor importancia clínica del género *Pseudomonas*. Es un microorganismo que sobrevive fácilmente en el ambiente hospitalario, y en la actualidad constituye uno de los principales patógenos nosocomiales oportunistas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos y grandes quemados.

P. aeruginosa presenta resistencia natural a muchos antimicrobianos (la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y muchas de las de tercera generación, tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol, rifampicina), y con gran facilidad desarrolla mutaciones cromosómicas y adquiere material genético que incrementan su resistencia.

En un estudio multicéntrico español sobre 1.014 cepas procedentes de 136 hospitales se comprobó que ninguno de los antimicrobianos evaluados era activo frente a todos los aislados. Las tasas de resistencia para los principales compuestos fueron: piperacilina-tazobactam 7%, meropenem 8%, ampicacina 9%, tobramicina 10%, imipenem 14%, ceftazidima 15%, cefepima 17%, aztreonam y ciprofloxacino 23% y gentamicina 31%. Las cepas comunitarias eran más frecuentemente resistentes a fluoroquinolonas, mientras que las resistentes a carbapenemas procedían del entorno hospitalario. Las cifras de resistencia son similares, aunque algo inferiores, a las que se conocen en otros países como Francia o Italia, pero suponen un incremento en los niveles de resistencia con respecto a lo observado en estudios previos realizados en nuestro país.

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* depende de la baja permeabilidad de su membrana externa y de varios sistemas de expulsión activa. Casi la totalidad de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* expresan la beta-lactamasa AmpC, cuya desrepresión puede ser parcial o total, lo que se traduce en la expresión constitutiva de niveles altos o muy altos, respectivamente, del enzima y por tanto en un nivel variable de resistencia a penicilinas y cefalosporinas. La práctica totalidad de cepas clínicas poseen también el enzima OXA-50, aunque su contribución a la resistencia parece irrelevante. Algunas cepas producen, además, otras beta-lactamasas adquiridas, de las que son particularmente importantes las MBL,

carbapenemasas que se inhiben por EDTA pero no por ácido clavulánico. En *P. aeruginosa* se han descrito varios grupos de MBL: IMP, VIM, SPM, GIM y SIM; de ellos los de mayor importancia son IMP y VIM.

La pérdida de la porina OprD causa una disminución drástica en la penetración de carbapenemas, lo que junto con la expresión de AmpC y de sistemas de expulsión activa acaba determinando también la aparición de resistencia clínica a estos compuestos.

El sistema de expulsión MexAB-OprM se expresa de forma basal y su actividad afecta a meropenem, pero no a imipenem. Las cepas que sobreexpresan el sistema MexEF-OprN, también suelen ser resistentes a imipenem, pero ello no se debe a la eliminación del antibiótico por el sistema de expulsión sino a que en estas mutantes no se expresa OprD, probablemente por la acción de un único regulador que activa la producción de la bomba e inhibe la expresión de la porina. Los mecanismos de resistencia expuestos previamente se combinan de forma variable en aislamientos clínicos; ello explica que muchas cepas de *P. aeruginosa* deficientes en OprD sean a la vez resistentes a imipenem y a meropenem, pero que algunas sólo sean resistentes a una de las dos carbapenemas. Como la desrepresión de AmpC es más frecuente que la hiperexpresión de MexAB-OprM, en cepas clínicas la frecuencia de resistencia a imipenem es mayor que la de resistencia a meropenem.

La resistencia a aminoglucósidos se debe a la producción de enzimas modificadoras y al sistema de expulsión activa MexXY-OprM mientras que la resistencia a quinolonas depende de de las citadas bombas de expulsión y de alteraciones en las topoisomerasas.

Como en el caso de *A. baumannii* la multiresistencia en *P. aeruginosa* es consecuencia de la expresión de múltiples mecanismos que, frecuentemente, interactúan de forma sinérgica para incrementar el nivel de resistencia a un compuesto o grupo de compuestos. La combinación de estas múltiples posibilidades se traduce en distintos fenotipos de multiresistencia. Como en otros patógenos nosocomiales una de las circunstancias más desfavorables es el desarrollo de resistencia a carbapenemas, que no necesariamente se acompaña de resistencia a cefalosporinas anti-*Pseudomonas* (ceftazidima o cefepima), pues la pérdida de OprD no supone una disminución de la penetración de estos últimos compuestos. Aunque la detección de resistencia a carbapenemas en *P. aeruginosa* no es difícil empleando los métodos estandarizados habituales en el laboratorio clínico, sí es complejo precisar cual es el mecanismo subyacente. La caracterización de estos mecanismos tiene importantes implicaciones epidemiológicas, siendo deseable aclarar si obedecen a mutaciones cromosómicas (hiperproducción de AmpC, hiperexpresión de MexAB-OprM, pérdida de OprD) o a la producción de carbapenemasas, en especial de

MBL, cuyos correspondiente genes suelen estar codificados por elementos móviles, en especial integrones (de clase 1 y en ocasiones de clase 3) y transposones.

Las MBL no hidrolizan las monobactamas, por lo que la combinación de resistencia a carbapenemas y sensibilidad a aztreonam sugiere la presencia de estas enzimas. Por desgracia, el microorganismo puede expresar otros mecanismos que, independientemente, causan resistencia a aztreonam; por ello, no siempre que existen MBL se observa el fenotipo indicado. Se han desarrollado diferentes métodos que permiten la detección fenotípica de MBL en *P. aeruginosa* (y por analogía en otros microorganismos), basados en la inhibición del enzima por EDTA o por otro tipo de inhibidores (fenantrolina, derivados del ácido mercaptoacético, del ácido mercaptopropiónico, etc). A diferencia de lo que sucede con la detección de BLEEs en enterobacterias, no se dispone de un método perfectamente estandarizado para la detección de MBL, y además los métodos fenotípicos indicados no son completamente sensibles ni específicos, por lo que la confirmación definitiva de la presencia del enzima depende por el momento de métodos moleculares.

7.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

P. aeruginosa posee múltiples factores de virulencia, en ocasiones redundantes desde el punto de vista funcional, pero más allá de su producción, la patogenia de las infecciones por este agente se relaciona estrechamente con la situación del huésped. Son importantes en este sentido la rotura de la barrea cutáneo-mucosa, los trastornos de la inmunidad humoral y la neutropenia.

El análisis de los factores de riesgo para la aparición de multiresistencia en *P. aeruginosa* es muy complejo, dada la diversidad de los mecanismos implicados y la variabilidad de las bases genéticas que los sustentan. De forma genérica, los principales factores relacionados con la multiresistencia han sido la gravedad de la infección, el uso de dispositivos invasores, la hospitalización prolongada y la exposición previa a antimicrobianos, en particular (y como para otras bacterias gramnegativas) a beta-lactámicos y a quinolonas.

P. aeruginosa puede producir una amplísima variedad de infecciones, como bacteriemia, neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística y neumonía de la comunidad, infecciones urinarias, endocarditis, meningitis, diversas formas de otitis, queratitis y endoftalmitis, osteomielitis, enterocolitis, infecciones perianales, etc.

Aunque el microorganismo no suele formar parte de la microbiota normal del ser humano, puede producirse la colonización a nivel del tracto gastrointestinal y de otras zonas, como faringe, axila, y periné. Puede producirse contaminación de productos y equipos hospitalarios, en particular de aquellos que poseen componentes en contacto con la

humedad. También puede encontrarse en la superficie de frutas y verduras.

A pesar de la amplia distribución que puede tener *P. aeruginosa* en el medio ambiente, varios estudios sugieren que el reservorio de los pacientes colonizados es de gran importancia para el ulterior desarrollo de brotes epidémicos.

El laboratorio de microbiología es fundamental para detectar la aparición de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* en muestras clínicas, y, al igual que para otros microorganismos multirresistentes, contribuir al diseño e implementación de programas de vigilancia y control. La aplicación de métodos de epidemiología molecular que ayuden a establecer la relación clonal de los aislamientos, y la caracterización de los mecanismos de resistencia implicados y de los elementos genéticos que los codifican son también de gran utilidad en este caso.

7.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Los cultivos de vigilancia epidemiológica para *P. aeruginosa* multirresistente deben contemplar la toma de muestras de pacientes y muestras del medio ambiente y equipos de atención sanitaria. Son válidas las consideraciones realizadas para *A. baumannii*.

7.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

No son necesarias consideraciones especiales para *P. aeruginosa* multirresistente aunque, como en los casos anteriores, debe evitarse el retraso de la siembra para impedir el sobrecrecimiento de posibles microorganismos acompañantes.

7.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras de vigilancia epidemiológica se procesarán siguiendo las pautas habituales. Son válidas las mismas consideraciones realizadas para *A. baumannii*.

7.5. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

P. aeruginosa sobrevive en la mayoría de ambientes y temperaturas propias del entorno clínico y crece con facilidad en los medios de cultivo habituales, incluyendo los diferenciales para bacterias gramnegativas, como agar MacConkey. Se han diseñado medios con agentes selectivos (esencialmente con ceftrimida) para favorecer el crecimiento de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas que puedan contener microbiota mixta y muestras ambientales. El uso de medios que incluyan antimicrobianos como agentes selectivos estará guiado por los fines de los cultivos de vigilancia. La gran mayoría de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son resistentes a las concentraciones de cefotaxima que habitualmente se emplean en los medios selectivos de vigilancia epidemiológica diseñados para el aislamiento de otros microorganismos multirresistentes, por lo que su uso garantizaría el crecimiento de *P. aeruginosa* con independencia de si el correspondiente aislado es o no multirresistente. La

adición de ceftazidima, aminoglucósidos o carbapenemas al agar MacConkey u otro medio equivalente favorecerá específicamente la selección de cepas con mayor nivel de resistencia.

Para el cultivo de muestras ambientales y de equipos médicos pueden seguirse las recomendaciones señaladas para *A. baumannii*, con las particularidades que acaban de indicarse.

Los medios de cultivo deben incubarse en aerobiosis a 35°C durante 48 horas.

7.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La lectura de los medios de cultivo en busca de *P. aeruginosa* (de cepas resistentes al antimicrobiano deseado si se han empleado medios selectivos específicos) se realizará a las 24 y a las 48 horas.

P. aeruginosa se identifica fácilmente en función del aspecto de la colonia, la pigmentación y algunas pruebas bioquímicas sencillas: producción de oxidasa, oxidación de la glucosa pero no fermentación de la misma, presencia de arginina-dehidrolasa y crecimiento a 42°C. Los sistemas comerciales de identificación habitualmente empleados en el laboratorio son también bastante fiables para la identificación del microorganismo, excepto en el caso de cepas mucoides.

La confirmación de la resistencia a los diferentes antimicrobianos (y de la multirresistencia, por tanto) se hará en función de los resultados del antibiograma.

La identificación de cepas que presuntamente producen MBL se basará en los resultados de pruebas fenotípicas. En ausencia de un método estandarizado para llevar a cabo esta detección se han empleado múltiples ensayos, basados en la capacidad de inhibir la actividad de la MBL con un agente quelante. Como agente indicador se han usado las carbapenemas, pero también ceftazidima (que es hidrolizada por la MBL) lo que aumenta la sensibilidad del estudio. Con relación a los métodos de difusión, se han empleado el método de doble disco con EDTA e imipenem o ceftazidima, o con ácido mercaptopropiónico e imipenem o ceftazidima, comprobando que el EDTA es capaz de aumentar el diámetro del halo del beta-lactámico. En otros casos, empleando una aproximación similar a la que recomienda el CLSI para la detección de BLEE, se han usado discos que incorporan simultáneamente EDTA y una carbapenema o ceftazidima, comparando el diámetro del halo de inhibición con el del correspondiente disco sin EDTA. En otros casos, en vez de inocular la placa de cultivo con el microorganismo a evaluar, se ha obtenido un extracto del mismo por sonicación y este material se ha usado para impregnar discos de la carbapenema o de ceftazidima con y sin EDTA, comparando luego los correspondientes halos de inhibición.

Otro método alternativo basado en la microdilución se basa en la comparación de la CMI de imipenem solo y en combinación con dos inhibidores, EDTA (0,4 mM) y 1,10 fenantrolina (0,04

mM). Por analogía con el ensayo de detección de BLEE, la disminución de la CMI de imipenem en combinación con los quelantes de al menos 8 veces sugiere la presencia de MBL. Con el mismo fundamento metodológico se dispone de tiras de Etest que contienen imipenem e imipenem+EDTA. Una disminución de la CMI de imipenem en presencia de EDTA de al menos 8 veces es sugestivo de la presencia de MBL. Como en otros casos el principal inconveniente de esta opción es el elevado precio de las tiras.

Estos métodos no son completamente sensibles ni específicos y en ciertos casos tienen una difícil interpretación, con frecuencia subjetiva. Por esta razón se han puesto a punto métodos de detección molecular de IMP y de VIM (en principio sería extensible a otros grupos de MBL) mediante PCR. Además, como las MBL suelen estar incluidas en integrones, también se ha demostrado la presencia de un gen que codifica MBL empleando cebadores específicos para los integrones de clase 1 en combinación con cebadores específicos para MBL. Aun con las limitaciones de los métodos genéticos de detección de mecanismos de resistencia, la demostración del gen de una MBL puede considerarse suficientemente específico para aceptar la presencia del enzima correspondiente.

7.7. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

En función de la metodología empleada el informe de resultados cuando se haya identificado *P. aeruginosa* será: "Se aísla *Pseudomonas aeruginosa* [multirresistente/productoras de metalo-beta-lactamasa]".

Si tras 48 horas de incubación no se aísla el microorganismo se informará "No se aísla *Pseudomonas aeruginosa*".

8. BIBLIOGRAFÍA

8.1. *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA

- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- Domínguez Luzón MA, Rodríguez Baño J. Infecciones por estafilococos. En: V. Ausina Ruiz y S. Moreno Guillén. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid. 2006, capítulo 22: 263-282.
- Flayhart D. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. J Clin Microbiol 2005; 43:5536-5540.
- Hagen RM, Seegmuller I, Navai J, Kappstein I, Lehn N, Miethke T. Development of a real-time PCR assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. Int J Med Microbiol 2005; 2:77-86.
- Huletsky A, Giroux R, Rossbach V et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol 2004; 42:1875-1884.

- Muto CA, Jeringan JA, Ostrowsky BE et al. SHEA Guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:362-386.
- Perry et al. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42:4519-4523.
- Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne M Jr. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2004; 42:5578-5581.
- Wenzel RP, Reagan DR, Bertino JS, Baron EJ, Arias K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. Am J Infect Control 1998; 26:102-110.
- Working Party Report. Revised guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitals. J Hosp Infect 1998; 39:253-290.

8.2. *Enterococcus* spp. RESISTENTE A LOS GLUCOPÉPTIDOS

- Cetinkaya Y, Falk P, and Mayhall CG. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13:686-707.
- Francia MV. *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos en Europa: un problema hospitalario creciente. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23:457-459.
- Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B, Ditore V, Zaman M, et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1996; 34:751-752.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:362-386.
- Palladino S, Kay ID, Flexman JP, et al. Rapid detection of *vanA* and *vanB* genes directly from clinical specimens and enrichment broths by real-time multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41:2483-2486.
- Paule SM, Trick WE, Tenover FC, et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2003; 41:4805-4807.
- Reisner BS, Shaw S, Huber ME, et al. Comparison of three methods to recover vancomycin-resistant enterococci (VRE) from perianal and environmental samples collected during a hospital outbreak of VRE. Infect Control Hosp Epidemiol 2000; 21:775-779.
- Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 2001; 7: 183-187.
- Sloan LM, Uhl JR, Vetter EA, et al. Comparison of the Roche LightCycler *vanA/vanB* detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. J Clin Microbiol 2004; 42:2636-2643.

8.3. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEES

- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem J 1991; 276:269-270.
- Bush K, GA Jacoby, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-1233.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility

testing: 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.

- Glupczynski Y, Berhin C, Bauraing C, Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2007; 45:501-505.
- Hernández Bello JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L y Grupo de estudio de infección Hospitalaria (GEIH). *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). Enf Infecc Microbiol Clín 2003; 21:77-82.
- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A and the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2122-2125.
- Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, Vitek 1 and Vitek 2 automated instruments for detection of extended spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol 2000; 40:3703-3711.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18:657-686.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended spectrum beta-lactamases. Clin Infect Dis 2004; 39:31-37.
- Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 40:53-58.
- Rice LB, Carias LL, Hujer AM, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confers resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:362-367.
- Rodríguez Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniáin MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol 2004; 42: 1084-1094.
- Valverde A, Coque TM, Sánchez Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004; 42:4769-4775.

8.4. *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

- Ayats J, Corbella X, Ardanuy C, et al. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in UCI patients. J Hosp Infect 1997; 37:287-295.
- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microb Rev 1996; 9:148-165.
- Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, et al. Risk-factors for the acquisition of imipenem-

resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. Clin Microbiol Infect 2005; 11:874-879.

- Cisneros JM, Rodríguez-Baño. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 687-693.
- Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, et al. Diversidad clonal y sensibilidad a los antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii* aislados en hospitales españoles. Estudio multicéntrico nacional: proyecto GEIH-Ab 2000. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22:267-271.
- Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003; 51:565-574.
- Manikal VM, Landman D, Saurina G, et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. Clin Infect Dis 2000; 31:101-106.
- Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F, et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:364-365.
- Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25:819-824.
- Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks 1977-2000. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:284-296.
- Wise KA, Tosolini FA. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. J Hosp Infect 1990; 16:319-329.

8.5. *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE. RESISTENCIA A CARBAPENEMAS

- Bouza E, García-Garrote F, Cercenado E, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: estudio multicéntrico en 136 hospitales en España. Rev Esp Quimioter 2003; 16:41-52.
- Bratu S, Quale J, Cebular S, Heddurshetti R, Landman D. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24:196-201.
- Carmeli Y, Torillet N, Elliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1379-1382.
- Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, et al. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. J Hosp Infect 2004; 57:209-216.
- Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006; 44:3139-3144.
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001; 47:247-250.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem on waiting? Curr Opin Microbiol 2000; 3:489-495.
- Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic

resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 400-402.

- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid Detection and Identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. J Clin Microbiol 2007; 45:544-547.
- Prats G, Miró E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:932-923.
- Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res 2003; 2:48-62.
- Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. J Hosp Infect 2003; 53:274–282.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EPI-01
DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-01	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en muestras de pacientes recogidas para realizar vigilancia epidemiológica. Se describe el tipo de muestra y su procesamiento en el laboratorio. Este documento no se refiere al aislamiento de SARM en muestras clínicas para establecer un diagnóstico etiológico.

2. FUNDAMENTO

S. aureus es un coco grampositivo que se agrupa en racimos en la tinción de Gram, aerobio y que forma parte de la microbiota habitual de la piel. Produce infecciones nosocomiales, en su mayoría por cepas de SARM, lo que implica resistencia a todos los beta-lactámicos y generalmente también a otros antimicrobianos. En general produce infección, pero un porcentaje no despreciable de pacientes son portadores de este microorganismo, siendo muy importante su detección para establecer medidas de aislamiento y minimizar al máximo su transmisión dentro del hospital, así como establecer un tratamiento antimicrobiano empírico adecuado en el caso de que se produzca una infección. El cultivo es el método más utilizado para realizar el diagnóstico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 "Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana", 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement (M100-S17). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Pa. 2007.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

Muestras

Las muestras adecuadas para cultivo son las siguientes:

- Exudado nasal: es la muestra más adecuada si se elige una única muestra para realizar cultivos de vigilancia. Puede sustituirse, con la misma rentabilidad, por un exudado faríngeo, pero es más incómodo para el paciente.
- Exudado de piel del pliegue inguinal o perineal-perirrectal: tiene una alta sensibilidad pero no se aconseja como muestra única.
- Muestras respiratorias: en pacientes con ventilación mecánica o traqueostomía.

- Exudados de úlceras o heridas: en pacientes con solución de continuidad en la piel.

En general, se recomienda la realización de un exudado nasal, como muestra única, debido a su alta sensibilidad en la detección y su facilidad en la toma.

- Exudado nasal: introducir la torunda impregnada en solución salina estéril primero en una coana y después en la contralateral, realizando movimientos rotatorios a lo largo del tabique nasal. Se puede emplear la misma torunda para ambas fosas nasales.
- Exudado faríngeo, piel, herida, úlcera: realizar la toma de la muestra según lo indicado en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras".
- Muestras respiratorias: fundamentalmente esputos o broncoaspirados. Consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras".

Recipientes

Para exudado nasal, faríngeo, piel o herida: torunda con medio de transporte.

Para muestras respiratorias: envase estéril.

Conservación y transporte

Se puede conservar durante un tiempo inferior o igual a 24 horas a temperatura ambiente o en nevera entre 2-8°C. Las muestras respiratorias siempre deben conservarse en nevera entre 2-8°C.

Las muestras para cribado de SARM deben ir acompañadas de un volante de petición perfectamente cumplimentado en el que deberá constar que se solicita un cultivo de vigilancia epidemiológica además de incluir los datos de filiación del paciente, tipo de muestra, servicio de procedencia y código del clínico que realiza la petición.

4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

- Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o volante de petición mal cumplimentado.
- Muestras enviadas erróneamente, por ejemplo exudado nasal para diagnóstico de sinusitis.
- Mal estado de conservación de la muestra o recogida en recipiente no adecuado: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación, recipiente no estéril.
- Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.

Antes de rechazar una muestra se debe hacer un esfuerzo para contactar con el médico responsable del paciente o peticionario de la muestra.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-01	
		Edición 01	Página 3 de 4

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 . MEDIOS DE CULTIVO

- Agar manitol-sal. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad del fabricante. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente.
- Agar cromogénico. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad del fabricante. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente.
- Medio MRSA (*methicillin-resistant screening agar*). Existe medio comercializado.
- Medio para conservación de cepas (en su caso). Se realizarán los controles especificados en el apartado C.2.1.4. del Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 12.

5.2. REACTIVOS

- Colorantes para tinción de Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Reactivos para la realización de la prueba de la coagulasa
- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos
- Reactivos para la detección de PBP2a mediante aglutinación con látex y/o para la detección del gen *mecA* por método molecular (en su caso; no desarrollado en este procedimiento).

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Estufa de 35°C
- Cabina de seguridad biológica
- Agitador vortex
- Nevera de 4°C

6.2. MATERIAL

- Pipetas Pasteur estériles
- Asas de siembra
- Contenedores para desechar material infeccioso
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso.
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular los medios correspondientes adecuados para la búsqueda de SARM con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias.

Incubar las placas inoculadas en estufa, a 35-37°C.

7.2. CONTROLES

- S. aureus* ATCC 29213 (sensible a meticilina)
- S. aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina).

7.3. EXAMEN DE LAS PLACAS

Realizar lectura a las 24 horas del cultivo de las muestras. Si en las placas no se detecta aislamiento de microorganismos, prolongar la incubación hasta las 48 horas. Volver a leerlas en ese momento.

7.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *S. AUREUS*

7.4.1. Agar manitol-sal:

1. A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos de agar manitol-sal. Cualquier organismo manitol positivo (color amarillo) será sospechoso de ser *S. aureus*.
2. Se realizará un subcultivo de la cepa sospechosa a agar sangre y a agar MRSA (*methicillin-resistant-screening-agar*) que se leerá 24 horas después. El crecimiento en agar MRSA indica que es un microorganismo resistente a meticilina.
3. El microorganismo en agar sangre se someterá a identificación definitiva realizando tinción de Gram, catalasa y coagulasa en tubo o aglutinación. En caso de resultar un coco grampositivo, catalasa y coagulasa positivo con crecimiento en agar MRSA se realizará sensibilidad a antimicrobianos y los estudios que se crean oportunos (tipado molecular).

7.4.2. Agar cromogénico:

1. A las 24 y 48 horas se realizará lectura de los cultivos de agar cromogénico. Dependiendo de la casa comercial que haya suministrado el medio de cultivo, cualquier microorganismo con una coloración compatible con lo especificado con el fabricante (por ejemplo, color verde) se identificará como *S. aureus* resistente a meticilina.
2. Se realizará un subcultivo de esta cepa en agar sangre para realizar las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y los estudios que se crean oportunos (tipado molecular).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. AGAR MANITOL-SAL:

1. Si a las 48 horas no hay colonias manitol positivas ni compatibles con *S. aureus* se informará: "No se aísla *S. aureus*".
2. En caso de aislarse un microorganismo manitol positivo, coco grampositivo en racimos, catalasa y coagulasa positivos sin crecimiento en agar MRSA, se informará: "Se aísla *S. aureus* sensible a meticilina".
3. Si se aísla un microorganismo manitol positivo, cocos grampositivo en racimos, catalasa y coagulasa positivo con crecimiento en agar MRSA, se informará: "Se aísla *S. aureus* resistente a meticilina".

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-01	
		Edición 01	Página 4 de 4

8.2. AGAR CROMOGÉNICO:

1. Sí a las 48 horas no hay colonias con la coloración característica definida por el fabricante para *S. aureus* resistente a meticilina, se informará: "No se aísla *S.aureus*".
2. En caso de aislarse un microorganismo con la coloración característica definida por el fabricante para *S. aureus* resistente a meticilina, se informará: "Se aísla *S. aureus* resistente a meticilina".

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del Servicio peticionario o del Servicio de Microbiología cuando se realice en éste la recogida de la muestra.

El procesamiento de la muestra, la realización de las técnicas y la validación de los resultados en función de los controles, es responsabilidad del personal técnico.

El facultativo especialista será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los cultivos de exudados nasales sólo son útiles para la detección del estado de portador de *S. aureus*. No son muestras válidas para el diagnóstico de sinusitis.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Algunas especies de estafilococo coagulasa negativa pueden crecer en el medio de manitol-sal ofreciendo un viraje del medio de cultivo a color amarillo similar al que se produce cuando está presente *S. aureus*.

En el medio MRSA crece cualquier especie de estafilococo que sea resistente a meticilina.

Ocasionalmente se ha observado el crecimiento de algunas enterobacterias en los medios cromogénicos con una coloración similar a la producida por SARM.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Segunda edición. Editor HD Isenberg. 2005. ASM Press Washington, D.C. USA.
2. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA Guideline for Prevention Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:362-386.
3. Perry et al. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2004; 42:4519-4523.
4. Flayhart D, Hindler JF, Bruckner DA et al. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. J Clin Microbiol 2005; 43:5536-5540.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EPI-02
DETECCIÓN DE *Enterococcus* spp. RESISTENTES A LOS GLUCOPÉPTIDOS EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a los glucopéptidos en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-02	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la recogida de muestras clínicas y ambientales y su procesamiento en el laboratorio para la detección de *Enterococcus* spp. resistentes a glucopéptidos (ERG), junto con la interpretación de los cultivos y emisión de los resultados.

2. FUNDAMENTO

Los primeros aislamientos clínicos de ERG se describieron en Europa en el año 1998. Desde entonces su diseminación ha ido en aumento y en la actualidad, aunque de forma esporádica en muchos casos, se pueden encontrar en la mayoría de los hospitales del mundo.

Debido a su importancia epidemiológica es esencial que el laboratorio de microbiología lleve a cabo una vigilancia continua de la resistencia a glucopéptidos en los enterococos aislados de muestras clínicas.

Por otro lado, la realización de cultivos de vigilancia epidemiológica de ERG ha demostrado su utilidad en el estudio de brotes hospitalarios y se considera una herramienta esencial en los programas de control y prevención de la infección nosocomial por este microorganismo. En este sentido, existen diferentes estrategias de actuación que incluyen: a) la realización de una vigilancia activa periódica en unidades de alto riesgo (UCI, quemados, trasplantes, hematología y oncología); b) el estudio al ingreso de pacientes con riesgo de ser portadores de ERG (pacientes ingresados en el último año en una unidad de alto riesgo, pacientes previamente ingresados en un servicio con detección de ERG o pacientes con repetidos ingresos que hayan recibido más de un tratamiento antibiótico); c) el estudio, ante la aparición de un primer caso o brote, de pacientes colonizados entre los contactos cercanos y pacientes de la misma sala o servicio.

Aunque generalmente los programas de control de la infección por ERG no incluyen la realización de cultivos ambientales, en determinadas circunstancias éstos pueden ser de utilidad para determinar la eficacia de las medidas de limpieza y desinfección.

Los cultivos de vigilancia epidemiológica de ERG se realizarán en medios que contienen vancomicina como agente selectivo, con el fin de inhibir el crecimiento de los microorganismos que no presenten esta resistencia antibiótica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 "Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana", 2000.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement (M100-S17). National Committee for clinical laboratory standards, Wayne. Pa.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

Las muestras adecuadas para el cultivo incluyen:

Estudio de portadores: para determinar el estado de portador de ERG las muestras más adecuadas son el frotis rectal o perianal y las muestras de heces. Para el frotis rectal la muestra se obtendrá introduciendo un hisopo por el esfínter anal. Debe existir evidencia de materia fecal en el hisopo. Para el frotis perianal, la muestra se recogerá mediante hisopo previamente humedecido con suero salino estéril que se frota por la piel perianal con un movimiento circular. Si se toman heces, se enviará una pequeña cantidad de estas en un recipiente estéril. En ocasiones se pueden aceptar otras muestras como la orina y exudados de herida en pacientes colonizados.

Estudio de contaminación ambiental: en determinadas circunstancias se analizarán muestras procedentes de las superficies próximas al paciente y del instrumental médico en contacto con él. Las muestras se recogerán en medio de cultivo líquido o en agar en placas de contacto proporcionadas por el laboratorio.

Para la recogida de otras muestras se recomienda consultar el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras".

Las muestras para cribado de ERG deben ir acompañadas de un volante de petición perfectamente cumplimentado en el que deberá constar que se solicita un cultivo de vigilancia epidemiológica además de incluir los datos de filiación del paciente, tipo de muestra, servicio de procedencia y código del clínico que realiza la petición.

4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

- Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o volante de petición mal cumplimentado.
- Muestras enviadas erróneamente.
- Mal estado de conservación de la muestra o recogida en recipiente no adecuado: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación, recipiente no estéril.
- Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.

Antes de rechazar una muestra se debe hacer un esfuerzo para contactar con el médico responsable del paciente o peticionario de la muestra.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a los glucopéptidos en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-02	
		Edición 01	Página 3 de 4

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

5.1.1. Medios no selectivos

- Agar sangre
- Caldo BHI
- Medio para conservación de cepas

5.1.2. Medios de cultivo selectivos

- Agar Enterococcosel® suplementado con 8 mg/L de vancomicina (comercializado por BD)
- Agar BHI con 6 mg/L de vancomicina (generalmente se prepara en el laboratorio)

Se realizarán los controles especificados en el apartado C.2.1.4. del Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 12.

5.2. REACTIVOS

- Colorantes para tinción de Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Reactivos para la realización de las pruebas de PYR y LAP
- Medios para estudio de movilidad y fermentación de azúcares (xilosa, arabinosa) y piruvato.
- Sustancia valorada de vancomicina

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Autoclave
- Estufa de 35°C
- Agitador vórtex
- Balanza de precisión
- Nevera
- Congelador de -80°C
- Sistemas comerciales de identificación

6.2. MATERIAL

- Material de vidrio estéril: frascos y viales de distinta capacidad con tapón de rosca, portas.
- Material de plástico estéril: puntas con filtro para micropipetas automáticas, placas de Petri, placas microtiter, asas de siembra.
- Micropipetas
- Pinzas
- Hisopos
- Asas de cultivo

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. SIEMBRA E INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras procedentes de pacientes se sembrarán en la placa de agar Enterococcosel con vancomicina. La inoculación de las placas debe realizarse en aislamiento o cuadrantes con el fin de obtener colonias aisladas. Las placas se incubarán en atmósfera aerobia a 35°C durante 24-48 h.

Las muestras ambientales recogidas en medio de cultivo líquido (BHI) se incubarán aeróbicamente a

35°C durante 18-24 h. Tras este periodo de incubación serán subcultivadas en el medio selectivo (agar Enterococcosel) e incubadas de nuevo en las mismas condiciones.

Las muestras ambientales recogidas en placa se incubarán directamente en aerobiosis a 35°C durante 24-48 h.

7.2. CONTROLES

Paralelamente a la siembra de las muestras se inoculará también las siguientes cepas control:

- cepa control positivo: *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina (*vanB*)
- cepa control negativo: *E. faecalis* ATCC 29212, sensible a vancomicina.

7.3. EXAMEN DE LAS PLACAS

Las placas se examinarán a las 24 y 48 horas hasta observar la aparición de pequeñas colonias translúcidas acompañadas de una pigmentación negra o marrón del medio que las rodea.

7.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE ERG

Se realizará una tinción de Gram y una prueba de catalasa a las colonias que presenten morfología sugerente de enterococos para confirmar la presencia de cocos grampositivos catalasa negativo.

Los posibles enterococos serán subcultivados a placa de agar sangre para realizar pruebas de identificación posteriores.

Al mismo tiempo se realizará un test de cribado de resistencia a vancomicina. El método que recomienda el CLSI (antes NCCLS) consiste en depositar 1-10 µl de una suspensión 0,5 McF en placas de agar BHI suplementadas con 6 mg/L de vancomicina. Las placas se deben incubar a 35°C en aerobiosis durante 24 h. Se usarán como controles las cepas ATCC anteriormente descritas.

A partir del crecimiento en agar sangre se realizarán las pruebas de detección de pirrolidónil peptidasa (PYR) y leucina aminopeptidasa (LAP) disponibles en forma de discos rápidos. Estas dos pruebas permiten diferenciar a los enterococos de otros cocos grampositivos resistentes a vancomicina. Los resultados se interpretarán según la siguiente tabla:

MICROORGANISMO	PYR	LAP
<i>Enterococcus</i>	Positivo	Positivo
<i>Pediococcus</i>	Negativo	Positivo
<i>Leuconostoc</i>	Negativo	Negativo

La identificación a nivel de especie se realizará mediante las pruebas de movilidad, pigmentación y fermentación de azúcares.

ESPECIE	MOVILIDAD	PIGMENTACIÓN	XILOSA	ARABINOSA	PIRUVATO
<i>E. faecalis</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>E. casseliflavus</i>	Positivo*	Positivo*	Positivo	Positivo	Variable
<i>E. gallinarum</i>	Positivo*	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

* Ocasionalmente puede haber excepciones y ser negativo.

Alternativamente a estas pruebas se pueden emplear sistemas comerciales de identificación disponibles en el mercado en forma miniaturizada y con diferente nivel de automatización.

En los aislamientos identificados como *E. faecalis* y *E. faecium* que presenten resistencia presuntiva a vancomicina según el test de cribado, es decir, crecimiento de al menos una colonia en la placa de BHI con vancomicina tras 24 h de incubación, deberá ser confirmada la resistencia mediante determinación de la CMI. El CLSI establece los siguientes criterios de interpretación de la CMI:

	CMI (mg/L)		
	S	I	R
Vancomicina	≤ 4	8-16	≥ 32

Los aislados se conservarán congelados (-20°C ó -80°C) por si es necesario realizar estudios adicionales.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Si el cultivo es positivo para ERG se informará como "se aísla *Enterococcus* resistente a glucopéptidos".

Si el cultivo es negativo para ERG se informará como "no se aísla *Enterococcus* resistente a glucopéptidos".

El aislamiento de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, con bajo nivel de resistencia intrínseca a vancomicina (*vanC*), no se informará como *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos cuando se aislen en cultivos de vigilancia por carecer de significado epidemiológico.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras y de la realización de los procedimientos.

El facultativo especialista supervisará las tareas mencionadas, la actualización del protocolo, la interpretación de los resultados y la validación final de los informes emitidos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Nunca se debe utilizar la teicoplanina como agente selectivo en los medios de cultivo ni como antibiótico único para la detección de resistencia a glucopéptidos en enterococos, ya que no se detectarían los fenotipos de resistencia que afectan exclusivamente a la vancomicina.

Existen en el mercado diferentes medios de cultivo selectivos y/o diferenciales que se pueden emplear en lugar del que se describe en este protocolo. Las características morfológicas de las

colonias variarán en función de las características del medio diferencial que se utilice.

La prueba de PYR debe realizarse a partir del subcultivo en agar sangre, ya que si se realiza directamente del medio selectivo la exposición a vancomicina puede dar lugar a resultados falsamente negativos.

En la investigación de brotes, se deberá estudiar la clonalidad de los aislados de ERG recuperados de las muestras de pacientes (tipificación molecular), bien en el propio laboratorio o en un centro de referencia.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En los medios de cultivo selectivos pueden crecer otros microorganismos resistentes a vancomicina, incluyendo *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.

Algunos enterococos con fenotipo VanB pueden no crecer en estos medios por presentar resistencia a vancomicina de bajo nivel.

El tratamiento antibiótico previo o la escasa presencia de microorganismos en la muestra pueden dar lugar a resultados falsos negativos.

Los sistemas comerciales de identificación de enterococos pueden no ser lo suficientemente fiables para la identificación a nivel de especie. Así, cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* pueden confundirse con *E. faecium*. Se recomienda por tanto confirmar la identificación con el estudio del pigmento y de la movilidad.

Los métodos automatizados de determinación de la CMI pueden fallar en la detección de fenotipos con bajo nivel de resistencia a la vancomicina.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Segunda edición. Editor HD Isenberg. 2005. ASM Press Washington, D.C. USA.
2. Murray P. Manual of Clinical Microbiology, 8 Ed, ASM Press. Washington DC, 2003
3. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA guidelines for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:362-386.
4. Cetinkaya Y, Falk P and Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000;13:686-707.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EPI-03
DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE
EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de enterobacterias productoras de BLEE en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-03	
		Edición 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para el aislamiento y la identificación de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cultivos de vigilancia, realizados para estudios de prevalencia de colonización en la población general o como medida de control de un brote epidémico o de una situación de endemia.

2. FUNDAMENTO

Las BLEE son enzimas plasmídicas que confieren resistencia a todos los beta-lactámicos excepto a cefamicinas y carbapenemas y son inhibidas por los inhibidores de beta-lactamasa de serina (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam). Las enterobacterias productoras de BLEE se describieron por primera vez en Europa en la década de los 80 y desde entonces su prevalencia no ha dejado de aumentar en todo el mundo. Se han descrito en diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y de otras especies bacterianas.

Debido a que las BLEE están codificadas por genes que se localizan en elementos genéticos transferibles, su aparición se produce en una amplia variedad de situaciones epidemiológicas que van desde casos esporádicos a brotes epidémicos o situaciones de endemia. Inicialmente las enterobacterias con BLEE se asociaron con brotes de infección nosocomial causadas por una misma cepa, que previamente coloniza el tracto gastrointestinal del enfermo y se transmite de un paciente a otro, fundamentalmente, a través de las manos del personal sanitario. En la actualidad la situación es más compleja debido al aumento de estos microorganismos en infecciones adquiridas en la comunidad, lo que hace presuponer que el número de portadores sanos en la población general está aumentando.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 "Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 12 "Métodos especiales para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos", 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational suplement (M100-S17). National Committe for clinical laboratory standars, Wayne. Pa.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La realización de cultivos de vigilancia epidemiológica para detectar enterobacterias con BLEE en poblaciones humanas tiene actualmente dos indicaciones:

- Estudio de prevalencia en la población general. La muestra más adecuada son las heces (1 g. aproximadamente, como mínimo).
- Como medida de control de un brote epidémico o de una situación de endemia en un centro sanitario. En este caso las muestras a considerar son:
 - Frotis rectal: Muestra de elección para la detección activa de portadores asintomáticos en pacientes hospitalizados. Es de especial relevancia que la torunda esté completamente impregnada en heces.
 - Cualquier tipo de muestra clínica obtenida con fines diagnósticos es adecuada para el aislamiento de enterobacterias con BLEE.

Para otros tipos de muestras se puede consultar el Procedimiento nº 1a de la SEIMC.

En situaciones de brote o endemia el frotis rectal se realiza cuando el enfermo ingresa en el centro sanitario o en la unidad donde se ha producido el brote. El cultivo se repite semanalmente mientras dure la situación que motivó el inicio de los cultivos de vigilancia.

Como norma general las muestras se deben conservar y transportar refrigeradas a 4°C y se deben procesar lo antes posible (sin superar las 48 horas).

Los frotis rectales se toman con torunda y se transportarán en un medio de transporte que impida su desecación (Amies o Stuart)

Las heces deben recogerse en un frasco estéril de boca ancha y sin conservantes.

4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

- Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o volante de petición mal cumplimentado.
- Muestras enviadas erróneamente.
- Mal estado de conservación de la muestra o recogida en recipiente no adecuado: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación, recipiente no estéril.
- Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.
- Cantidad insuficiente de la muestra: menos de 1 g. de heces.
- Torundas de frotis rectales sin restos de heces.

Antes de rechazar una muestra se debe hacer un esfuerzo para contactar con el médico responsable del paciente o peticionario de la muestra.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de enterobacterias productoras de BLEE en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-03	
		Edición 01	Página 3 de 5

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar MacConkey suplementado con 1 mg/L de cefotaxima
- Agar MacConkey suplementado con 1 mg/L de ceftazidima
- Agar Mueller Hinton
- Medio para conservación de cepas

Consultar el Anexo 2 sobre la preparación de los medios de cultivo.

5.2. REACTIVOS

- Colorantes para tinción de Gram
- Titas de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno
- Solución de 1000 mg/L de cefotaxima
- Solución de 1000 mg/L de ceftazidima
- Discos de antibióticos
 - Cefotaxima 30 µg
 - Cefotaxima /ácido clavulánico 30/10 µg
 - Ceftazidima 30 µg
 - Ceftazidima /ácido clavulánico 30/10 µg

Consultar el Anexo 1 sobre la preparación de las soluciones de antimicrobianos.

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Autoclave
- Estufa de 35°C
- Cabina de seguridad biológica
- Balanza de precisión
- Agitador vortex
- Nevera de 4°C
- Congelador de -70°C

6.2. MATERIAL

- Matraces de vidrio para preparar medios de cultivo.
- Material de plástico estéril: puntas para micropipetas, viales de 1,5 ml, placas de Petri, pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Material de laboratorio: asas de siembra, contenedores para desechar material infeccioso, micropipetas, pipeteadores, guantes.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

7. PROCEDIMIENTO

Para la detección de enterobacterias con BLEE en la población general se recomienda una muestra de heces (>1 g) debido a que puede haber un bajo número de bacterias colonizadoras. Asimismo, se recomienda sembrar dos placas de medio de cultivo,

una suplementada con cefotaxima y otra con ceftazidima.

En los cultivos de vigilancia realizados en el contexto de un brote epidémico o de una situación de endemia en un centro sanitario se puede utilizar un frotis rectal para detectar enterobacterias con BLEE.

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

7.1.1. Heces. Hacer una suspensión homogénea de 0,5 g de heces en 5 ml de solución salina.

Sembrar con técnica de aislamiento 200 µl en dos placas de agar de MacConkey, una suplementada con 1mg/L de cefotaxima y otra con 1 mg/L de ceftazidima.

7.1.2. Frotis rectal. Sembrar la muestra en dos placas de agar de MacConkey, una suplementada con 1 mg/L de cefotaxima y otra con 1 mg/L de ceftazidima. Utilizar la torunda para inocular la muestra y extender con un asa de siembra para aislamiento.

7.1.3. Otras muestras clínicas. Sembrar la muestra en dos placas de agar de MacConkey, una suplementada con 1 mg/L de cefotaxima y otra con 1 mg/L de ceftazidima. Alternativamente se puede sembrar la muestra en una placa de MacConkey suplementada con cefotaxima o ceftazidima a una concentración que estará en función de la CMI de estos antimicrobianos frente a la cepa productora del brote.

Todas las placas sembradas se incubaran a 35°C en aerobiosis durante 48 horas.

7.2. CONTROLES

E. coli ATCC 25922: diferencia ≤ 2 mm entre los halos de los discos de la combinación de cefalosporina con ácido clavulánico y el tamaño de los halos de los discos de la cefalosporina sola (control negativo).

K. pneumoniae ATCC 700603: se debe observar un incremento ≥5 mm en el diámetro del halo que rodea al disco de ceftazidima - ácido clavulánico, y ≥ 3mm en el halo que rodea al disco de cefotaxima - ácido clavulánico en relación al tamaño del halo que rodea a los discos de la correspondiente cefalosporina sola (control positivo).

7.3. EXAMEN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se realizará a las 24 y 48 horas de la siembra. Todas las colonias fermentadoras de lactosa que presenten distintas morfologías deben considerarse en principio como posibles enterobacterias con BLEE.

7.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

La identificación bioquímica se realiza con métodos convencionales o empleando métodos automáticos o semiautomáticos de identificación.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de enterobacterias productoras de BLEE en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-03	
		Edición 01	Página 4 de 5

Para la prueba fenotípica confirmatoria de producción de BLEE:

- Medio: Mueller Hinton
- Discos de antimicrobianos y concentración:
 - Ceftazidima 30µg
 - Ceftazidima-ácido clavulánico 30-10µg
 - Cefotaxima 30µg
 - Cefotaxima - ácido clavulánico 30-10µg
- Inóculo: 0,5 McFarland
- Incubación: 35°C ± 2°C en aerobiosis durante 16-18 horas.
- Resultados: Un aumento de ≥ 5 mm en el diámetro del halo del disco de la combinación de cualquiera de las cefalosporinas con ácido clavulánico, en relación al diámetro de la cefalosporina sola confirma la producción de BLEE.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Si en un cultivo de vigilancia de enterobacterias con BLEE se recuperan colonias que cumplen con las características anteriores se informará como: "Aislamiento de enterobacteria productora de BLEE: Positivo"

Si tras 48 horas de incubación no se recuperan colonias que cumplan con los características anteriores se informará como: "Aislamiento de enterobacteria productora de BLEE: Negativo".

En las enterobacterias productoras de BLEE aisladas en muestras clínicas obtenidas con fines diagnósticos se debe informar el género y la especie, así como el antibiograma. De acuerdo con las recomendaciones del CLSI, si un microorganismo produce una BLEE, se debe considerar resistente a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam, con independencia de los valores de CMI que presente el antibiograma.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras clínicas, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles.

El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cuando los cultivos de vigilancia se realizan como parte de las medidas adoptadas para controlar un brote epidémico o una situación de endemia, y una vez que se ha identificado definitivamente el microorganismo implicado en el mismo, la identificación bioquímica de posteriores aislamientos se puede realizar con un menor número de pruebas bioquímicas convencionales: morfología de la colonia, oxidasa, TSI, producción de indol,

producción de ureasa. Este procedimiento abarata los costes.

En situaciones de brote epidémico y una vez conocida la sensibilidad de la cepa responsable a los antimicrobianos, las muestras pueden sembrarse en una placa de agar MacConkey con una concentración de ceftazidima o cefotaxima adecuada a la cepa buscada. Este procedimiento hace el medio de cultivo más selectivo, evitando el crecimiento de otros microorganismos no buscados y facilitando el aislamiento y la lectura de las placas.

Los cultivos de vigilancia realizados en el contexto de un brote o de una situación endémica en un centro sanitario, se realizan cuando el paciente ingresa en el centro o en la unidad donde existe el brote y se repiten semanalmente durante su estancia, hasta que el brote esté controlado: de 2 a 4 semanas sin nuevos pacientes colonizados o infectados.

Si un paciente tiene tres cultivos positivos consecutivos se considera que es un portador persistente y no es necesario repetir nuevos cultivos, excepto que se vayan a realizar procedimientos invasivos, si se plantea levantar las medidas de aislamiento o si va ser trasladado a otra unidad.

Existen en el mercado diferentes métodos automáticos o semiautomáticos para la confirmación fenotípica de la producción de BLEE. Es recomendable su evaluación dentro de cada laboratorio antes de sustituir el método de referencia por el comercial.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prueba fenotípica de confirmación de la producción de BLEE es muy sensible y específica comparada con las pruebas genotípicas de confirmación, sin embargo puede haber falsos positivos como en aquellas cepas que hiperproducen beta-lactamasas de la clase A: TEM-1, TEM-2 y SHV-1.

Los falsos negativos se producen por pérdida de porinas, utilización de un inóculo bajo, producción de beta-lactamasas de tipo AmpC o de una combinación de varios de estos mecanismos.

La prueba fenotípica de confirmación de BLEE sólo está validada por el CLSI para cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *P. mirabilis*.

Para detectar BLEE en enterobacterias que expresan habitualmente beta-lactamasas de tipo AmpC (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii*) se puede inferir su presencia de la actividad comparada de cefepima y cefepima con ácido clavulánico, de forma similar a como se interpretan las pruebas con cefotaxima/ceftazidima solas y con ácido clavulánico o bien mediante el método de aproximación con discos de cefepima y ácido clavulánico.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de enterobacterias productoras de BLEE en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-03	
		Edición 01	Página 5 de 5

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Segunda edición. Editor HD Isenberg. ASM Press Washington, D.C. USA. 2005.
2. Bonnet R. Growing group of extended -expectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:1-14.
3. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Cin Microbiol Rev 2005; 18:657-686.
4. Stürenburg E, Mack D. Extended spectrum beta-lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect 2003; 47:273-295.
5. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2005; 42:4769-4775.

ANEXO 1. Solución de 1000 mg/L de cefotaxima o ceftazidima.

Solución de 1000 mg/L de cefotaxima:

- Pesar la cantidad de sustancia valorada de cefotaxima necesaria para obtener una concentración de 1000 mg/L. Seguir las indicaciones del fabricante en lo referente a potencia, solventes y diluyentes del antimicrobiano.
- Repartir en viales estériles: 1.050 µl/vial.
- Conservar a -70°C durante tres meses.

Solución de 1000 mg/L de ceftazidima:

- Pesar la cantidad de sustancia valorada de ceftazidima necesaria para obtener una concentración de 1000 mg/L. Seguir las indicaciones del fabricante en lo referente a potencia, solventes y diluyentes del antimicrobiano.
- Repartir en viales estériles en alícuotas de 1.050 µl/vial.
- Conservar a -70°C durante tres meses.

ANEXO 2. Agar MacConkey suplementado con 1mg/L de cefotaxima o ceftazidima.

Agar MacConkey suplementado con 1mg/L de cefotaxima:

- Preparar 1 litro de agar MacConkey, autoclavar y dejar enfriar a 50°C. Añadir de manera aséptica 1 ml de una solución de cefotaxima a una concentración de 1000 mg/L.
- Homogeneizar la mezcla y repartir en placas de Petri (20 ml/placa)
- Almacenar las placas a 4°C durante 15 días.

Agar MacConkey suplementado con 1mg/L de ceftazidima:

- Preparar 1 litro de agar MacConkey autoclavar y dejar enfriar a 50°C. Añadir de manera aséptica 1 ml de una solución de ceftazidima a una concentración de 1000 mg/L.
- Homogeneizar la mezcla y repartir en placas de Petri (20 ml/placa)
- Almacenar las placas a 4°C durante 15 días

Control de calidad de los medios de cultivo suplementados con antibiótico:

Para evaluar la capacidad del medio de soportar el crecimiento de enterobacterias productoras de BLEE se emplean dos cepas de referencia:

- Control positivo de crecimiento: *K. pneumoniae* ATCC 700603.
- Control negativo de crecimiento: *E. coli* ATCC 25922.

Cada lote de medio preparado debe someterse al control de calidad descrito antes de ser utilizado.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EPI-04
DETECCIÓN DE *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE
EN CULTIVO DE MUESTRAS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-04	
		Edición 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento de detección de *Acinetobacter baumannii* multirresistente en cultivo a partir de muestras ambientales y muestras de origen humano. Se describe el tipo de muestra, las indicaciones para la realización de los cultivos de vigilancia y su procesamiento en el laboratorio.

2. FUNDAMENTO

El género *Acinetobacter* incluye 17 genoespecies. *A. baumannii* es la de mayor relevancia clínica por su frecuencia, ya que es la especie de *Acinetobacter* que produce más del 80% de las infecciones humanas, que suelen ser nosocomiales, tanto endémicas como epidémicas.

A. baumannii suele presentar resistencia a múltiples antibióticos incluyendo beta-lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos lo que dificulta el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo. Las carbapenemas son una de las alternativas de tratamiento, pero cada vez se están describiendo más resistencias a estos antimicrobianos. La definición de multirresistencia varía en la literatura. En algunos hospitales se utiliza como criterio de multirresistencia el aislamiento de *A. baumannii* sensible sólo a una familia de antibióticos excluyendo colistina, pero esta definición puede variar, dependiendo de la epidemiología local.

A. baumannii es un microorganismo que produce infecciones en el entorno hospitalario incluyendo neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemia, infecciones de heridas, meningitis e infecciones del tracto urinario. Raramente produce infecciones en personas sin factores predisponentes.

A. baumannii multirresistente tiene gran capacidad para colonizar y persistir en el ambiente hospitalario tanto en superficies, ropa de cama, como en dispositivos médicos en condiciones de humedad y en ambientes secos. Asimismo, es capaz de colonizar la piel y sobre todo el tracto digestivo de los pacientes y estos dos hechos proporcionan a este microorganismo una gran capacidad para persistir durante meses y constituir reservorios que provocan y perpetúan los brotes de infección nosocomial. Estos predominan en las UCIs y unidades de quemados. Las fuentes detectadas en estos brotes incluyen equipos de terapia respiratoria y de ventilación, lavado pulsátil con succión para curas de heridas, lavabos, grifos, ropa de cama, viales multidosis, etc., aunque en aproximadamente en el 50% de los brotes no se detecta la fuente. Los cultivos de vigilancia y las técnicas de tipificación molecular son necesarios para establecer el origen de los brotes e implantar medidas de control. Asimismo los cultivos de vigilancia son útiles para valorar la persistencia de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario tras implantar medidas de control.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras”, 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 “Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana”, 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement (M100-S17). National Committee for clinical laboratory standards, Wayne. Pa.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

Muestras de pacientes:

- Hospitales sin endemia por *A. baumannii*: se puede indicar la realización de cultivos de vigilancia de pacientes de forma preventiva en hospitales en los que no existan infecciones endémicas ni epidémicas por *A. baumannii* multirresistente tomando muestras en aquellos pacientes procedentes de otros hospitales, residencias y centros de media-larga estancia. Los pacientes trasladados desde estos centros con neumonía o heridas abiertas se deben aislar y mantener precauciones ampliadas de contacto hasta que se obtengan los resultados de los cultivos de vigilancia y sean negativos para *A. baumannii* multirresistente. Las muestras que se deben procesar son: esputo, heridas, traqueotomías y piel de axilas e ingles.
- Cultivos de vigilancia en hospitales con endemias o epidemias por *A. baumannii* multirresistente: los cultivos incluirán muestras de esputo, de heridas y traqueostomías y torundas rectales.

Muestras ambientales:

- Se tomarán muestras ambientales en hospitales con endemias o epidemias por *A. baumannii* multirresistente para investigar el origen de los brotes y el grado de contaminación ambiental y también para valorar la eficacia de las medidas que se adoptan para controlar el brote. La decisión sobre las superficies a cultivar dependerá de la localización del brote. Las muestras que suelen aparecer positivas incluyen la ropa de cama, las superficies próximas al paciente, los equipos de ventilación mecánica, manillas de puerta, grifos, etc.
- La toma de muestras ambientales en superficies se realizará con una torunda estéril humedecida en medio de enriquecimiento (*swab-rinse method*) tal y como se describe a continuación:
- Humedecer la torunda por inmersión en un tubo conteniendo BHI (Brain Heart Infusion/caldo cerebro corazón).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-04	
		Edición 01	Página 3 de 5

- Retirar el exceso de líquido apretando la torunda contra las paredes del tubo.
- Rotar lentamente la torunda humedecida por la superficie a cultivar haciendo estrías.
- Colocar la punta de la torunda en el interior de un tubo con BHI cortando el mango con tijeras estériles.
- Cerrar el tubo.
- Mezclar muy bien en vortex 30 segundos.
- Procesar tal y como se describe en el apartado 7.

Para la toma de muestras ambientales de dispositivos de pequeño tamaño se introduce el dispositivo utilizando pinzas estériles directamente en un caldo BHI. Se agita en vortex durante 1 minuto y se procesa como se describe en el apartado 7. Si el objeto que se está muestreando pudiera romper el tubo se utilizarán tubos de plástico en vez de tubos de cristal.

Para muestrear frascos o nebulizadores colocar en su interior un volumen mayor de BHI (10-50 ml dependiendo del tamaño del aparato que se va a muestrear). Cerrar con tapón estéril. Agitar 50 veces y procesar tal y como se describe en el apartado 7.

En el caso de dispositivos médicos complejos es necesario consultar el manual de instrucciones del aparato para decidir el lugar idóneo de recogida de muestra.

4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

- Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o volante de petición mal cumplimentado.
- Muestras enviadas erróneamente.
- Mal estado de conservación de la muestra o recogida en recipiente no adecuado: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación, recipiente no estéril.
- Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.

Antes de rechazar una muestra se debe hacer un esfuerzo para contactar con el médico responsable del paciente o peticionario de la muestra.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Placas de Agar MacConkey
- Tubos con medio TSI
- Tubos con caldo cerebro corazón (BHI)
- Medio para conservación de cepas

A. baumannii multirresistente puede aislarse en los medios de cultivo habituales. A partir de muestras clínicas habituales es útil la utilización de medios selectivos como el agar MacConkey. Para las torundas rectales es útil la utilización de agar MacConkey con gentamicina (ver apartado 11 y anexo 1). Para las muestras ambientales se utilizará

un medio líquido de enriquecimiento como BHI y placas de MacConkey con gentamicina (ver apartado 11 y anexo 1).

5.2. REACTIVOS

- Colorantes para tinción de Gram
- Tiras de oxidasa
- Peróxido de hidrógeno
- Sustancia valorada de gentamicina

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Agitador vortex
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Baño de 56°C
- Congelador de -80°C
- Estufa de 35°C
- Nevera
- Placa calefactora
- Agitadores magnéticos

6.2. MATERIAL

- Asas estériles de cultivo
- Matraz de 2 litros
- Micropipeta
- Placas de Petri estériles
- Puntas de pipeta estériles
- Tijeras
- Torundas estériles

El mantenimiento, limpieza y calibración de todos los aparatos e instrumentos requeridos se realizará según las normas de cada fabricante y los procedimientos de trabajo de cada centro.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Las muestras de pacientes para vigilancia se procesarán cultivándolas según el procedimiento estándar en placas de agar MacConkey, salvo las muestras fecales que se sembrarán en agar MacConkey con gentamicina.

Las placas se incubarán a 35°C, durante 48 horas en estufa convencional.

Las muestras ambientales se procesarán del siguiente modo:

- Procesar la muestra transfiriendo 0,5 ml del caldo BHI a la superficie de una placa de agar MacConkey.
- Extender por toda la superficie de la placa con un asa estéril.
- Dejar secar la placa.
- Incubar tanto la placa como el caldo BHI.

Tanto la placa como el caldo de BHI se incubarán a 35°C durante 48 horas. El caldo BHI se subcultivará a las 24 horas (o antes si aparece turbidez) en placas de agar MacConkey.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-04	
		Edición 01	Página 4 de 5

7.2. CONTROLES

No están estandarizadas internacionalmente las cepas a emplear como controles en el procedimiento. Ver Anexo 1 sobre las cepas a emplear como controles de los medios de cultivo.

7.3 EXAMEN DE LAS PLACAS

Las placas se examinarán a las 24 y las 48 horas. El aspecto macroscópico de las colonias en agar MacConkey suele ser a veces mucoso, de color amarillo pálido o blanco grisáceo aunque algunas muestras ambientales pueden tener aspecto marrónáceo.

7.4. IDENTIFICACIÓN

A. baumannii en un cocobacilo gram negativo no fermentador, oxidasa negativo, catalasa positivo. Todas las colonias que se aíslan en las placas primarias de cultivo se identificarán inoculando un tubo de TSI para comprobar que es un bacilo no fermentador y mediante las pruebas de oxidasa y catalasa.

La identificación se realizará mediante pruebas bioquímicas inoculando una galería de API 20NE o mediante sistemas automáticos o semiautomáticos, aunque si se dispone de ellos, son preferibles los métodos moleculares. En caso de que sea necesario se enviarán a un centro de referencia.

Se archivará la cepa congelándola a -20 ó -80°C para realizar estudios posteriores si fuera necesario, incluyendo la tipificación molecular con fines epidemiológicos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En las muestras clínicas habituales se informará de acuerdo al procedimiento descrito para cada tipo de muestra.

En las muestras propias de los cultivos de vigilancia (ambientales, de piel y fecales) se informará de la siguiente forma:

Muestras ambientales:

Resultado positivo: Se aísla *Acinetobacter* spp.

Resultado negativo: No se aísla *Acinetobacter* spp.

Muestras de pacientes:

Torundas rectales y muestras de piel:

Resultado positivo: Se aísla *Acinetobacter* spp.

Resultado negativo: No se aísla *Acinetobacter* spp.

9. RESPONSABILIDADES

El facultativo responsable del control de la infección indicará las muestras ambientales que hay que tomar en función de los datos epidemiológicos y de la unidad del hospital afectada por la epidemia o el brote.

El personal de enfermería responsable del control de la infección será responsable de la recogida de las muestras ambientales.

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras en el laboratorio.

El facultativo especialista supervisará las técnicas, actualizará el protocolo, interpretará y validará los resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En el caso de superficies en las que previamente al muestreo se hayan aplicado desinfectantes es necesario utilizar medios de cultivo con neutralizante (como el medio de Dey – Engley).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para los cultivos de las muestras fecales deberá ajustarse la concentración de gentamicina que se añade al medio de MacConkey de acuerdo a la CMI de las cepas de *Acinetobacter* spp. predominantes en el hospital. La concentración ideal de antibiótico en el medio debe de ser menor de la mitad de la concentración de la CMI de gentamicina frente a la cepa epidémica y de más de 2 veces la CMI de los bacilos gramnegativos sensibles.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Bergogne-Bérezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9:148-165.
- Corbella X, Montero A, Pujol M, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 2000; 38:4086-4095.
- Plan for prevention and control of Multidrug-resistant *Acinetobacter* (MDR-AB). The department of Hospital Epidemiology and Infection Control. Johns Hopkins. En www.hopkinsmedicine.org/heic/ID/mdr.
- Van Looveren M, Goossens H, and the ARPAC steering group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10:684-704.
- Maslow JN, Glaze T, Adams P, Lataillade M. Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii* affecting different wards of a single hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2005; 26:69-75.
- Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn I, van der Reijden TJ, van den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25:1002-1004.

Anexo 1. Preparación de agar MacConkey con 8 mg/L de gentamicina

La decisión sobre la cantidad de antibiótico en el medio selectivo debe basarse en la CMI de gentamicina frente a la cepa asociada al brote o endémica en cada hospital.

- Dispensar 1 litro de agua destilada en el matraz.
- Añadir 50 g de agar MacConkey y mezclar.
- Añadir los agitadores magnéticos y colocar en la plaza calefactora aproximadamente 8 minutos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica	PNT-EPI-04	
		Edición 01	Página 5 de 5

- Autoclavar en el programa de líquidos 15 minutos.
- Colocar el matraz en un baño a 56° C para que se enfríe.
- Añadir 1 ml de la solución stock de gentamicina 8 mg/L.
- Distribuir el agar en las placas de Petri y dejar enfriar.

Control de esterilidad: en cada lote preincubar 1 placa a 35°C durante 24 horas.

Control de medio selectivo: inocular un bacilo gram negativo sensible a gentamicina para comprobar su inhibición tras incubarlo 24 horas a 35°C.

Comprobar el crecimiento de la cepa endémica o epidémica del propio hospital de *A. baumannii* tras incubarlo 24h a 35°C.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EPI-05
DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTORA DE METALO-BETA-LACTAMASA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección y confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo-beta-lactamasa	PNT-EPI-05	
		Edición 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir los procedimientos para: A) detectar la producción de metalo-beta-lactamasas (MBL) en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem, considerando los fenotipos en los que se debe sospechar la producción de estas enzimas y B) confirmar la presencia de los enzimas que con mayor frecuencia son responsables de esta resistencia (IMP y VIM), mediante PCR.

No se incluyen en este documento procedimientos específicos encaminados a la detección de *P. aeruginosa* en cultivos de muestras para la vigilancia epidemiológica. Para la toma de muestras y criterios de su rechazo serían válidas, en líneas generales, las consideraciones que se han realizado al respecto en el PNT-EPI-04 de este procedimiento: "Detección de *Acinetobacter baumannii* multirresistente en cultivo de muestras para la vigilancia epidemiológica", con la notable salvedad del menor interés de las muestras de heces/rectales para la detección de *P. aeruginosa*.

Es difícil aconsejar un medio de cultivo específico para la detección de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemas. En muchos laboratorios se utilizan los mismos medios selectivos que los utilizados para otros bacilos gramnegativos multirresistentes. Una vez que se obtiene crecimiento de *P. aeruginosa*, se comprueba la resistencia de la misma mediante un método estandarizado (véase a este respecto el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 "Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana", 2000). A partir de este punto pueden aplicarse los procedimientos que se describen a continuación.

2. FUNDAMENTO

Entre los mecanismos de resistencia a carbapenemas en *P. aeruginosa* se encuentran la impermeabilidad debida a la pérdida de la porina OprD asociada a la producción de AmpC, las beta-lactamasas que hidrolizan carbapenemas y/o la expresión de la bomba de expulsión activa MexAB-OprM. La simple producción de una carbapenemasa puede, *per se*, causar resistencia a carbapenemas, aunque no es infrecuente en cepas clínicas que además exista una pérdida de la OprD. De todas las enzimas con actividad carbapenemasa, las más importantes en *P. aeruginosa* son las que pertenecen al grupo de las metaloenzimas. Las MBL en esta especie se describieron por vez primera en Japón en 1991 y desde entonces se han encontrado en prácticamente todos los continentes, en ocasiones dando lugar a brotes intrahospitalarios. Las MBL son enzimas de clase B, según la clasificación de Ambler, con actividad hidrolítica sobre penicilinas, cefalosporinas y antibióticos carbapenémicos. Requieren zinc para ser activas y, por tanto, se inhiben por agentes quelantes como el EDTA o la fenantrolina.

Se han descrito diferentes métodos para detectar de forma fenotípica la producción de MBLs. Entre las técnicas que utilizan el método de disco difusión en agar hay que destacar la prueba clásica de Hodge modificada, diseñada para detectar la producción de carbapenemasas. Se han diseñado también distintas pruebas, en las que se persigue poner de manifiesto, con mayor o menor eficacia, la capacidad de diferentes compuestos para inhibir los diferentes tipos de MBLs. Por su utilidad práctica, hay que destacar las siguientes técnicas:

- 1) las pruebas de sinergia con doble disco, en las que se utiliza imipenem y/o ceftazidima con diferentes inhibidores de MBLs (ácido 2-mercaptopropiónico, ácido mercaptoacético o EDTA) y las pruebas de sinergia utilizando discos de imipenem e imipenem más EDTA,
- 2) métodos de dilución, entre ellos se ha descrito una técnica de microdilución en la que se utiliza EDTA y 1,10 fenantrolina para cuantificar la disminución de la concentración inhibitoria mínima de imipenem sin y con inhibidor,
- 3) método de Etest, método comercial de cómoda y sencilla realización basado en la utilización de tiras de imipenem e imipenem más EDTA, que permiten cuantificar la disminución de la CMI de imipenem sin y con inhibidor.

Los genes responsables de la producción de MBL forman parte de un integrón que a su vez suele residir en plásmidos transferibles y, más raramente, en el cromosoma de la bacteria. Como los integrones se caracterizan por ser el lugar de recombinación de los cassettes génicos (elementos genéticos de estructura definida en los que se encuentran genes de resistencia a antibióticos), las cepas de *P. aeruginosa* productoras de MBL son, con frecuencia, resistentes a otros grupos antibióticos.

Las MBL se han dividido en cinco familias, en atención a su estructura molecular: IMP, VIM, GIM, SPM y SIM. Hasta el momento, los tipos IMP y VIM son los más extendidos entre *P. aeruginosa*; los tipos GIM, SPM y SIM, de descripción reciente, se han descrito solamente en localizaciones geográficas específicas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 11 de "Métodos básicos del estudio de sensibilidad antimicrobiana", 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement (M100-S17). National Committee for clinical laboratory standards, Wayne. Pa.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección y confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo-beta-lactamasa	PNT-EPI-05	
		Edición 01	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

Debe sospecharse, especialmente, la producción de MBL en todas las cepas de *P. aeruginosa* que presenten simultáneamente algún grado de resistencia a imipenem, meropenem, ceftazidima, cefepima, o a penicilinas antipseudomónicas (ticarcilina y piperacilina) y sensibilidad a aztreonam. En relación a éste último antibiótico es necesario indicar que aztreonam mantiene su actividad en las cepas productoras de MBL y, por tanto, éstas son sensibles; pero, existe la posibilidad de que otro mecanismo de resistencia sobreañadido inactivo al aztreonam, con lo que las cepas serían resistentes a este antibiótico.

A. DETERMINACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE MBL

A. 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

A. 5.1. MEDIOS DE CULTIVO.

- Placas de agar Mueller-Hinton (MH)
- Tubos con solución salina estéril y/o caldos de TSB.
- Medio para conservación de cepas

A. 5.2. REACTIVOS

- Colorantes para tinción de Gram
- Tiras de oxidasa
- Solución de EDTA 0,5M
- Discos de ceftazidima (30 µg) comerciales.
- Discos de imipenem (10 µg) comerciales.
- Discos de meropenem (10 µg) comerciales.
- Discos de imipenem (10 µg) + EDTA (930 µg).
- Discos de meropenem (10 µg) + EDTA (930 µg).
- Discos de EDTA (1.900 µg). Discos de EDTA (930 µg).
- Tiras de Etest de imipenem/imipenem-EDTA.

Preparación de discos de EDTA con carga de 930 µg

- Impregnar con 5 µl de EDTA 0,5 M cada uno de los discos blancos de celulosa siguiendo un procedimiento estéril.

Preparación de discos de EDTA con carga de 1.900 µg

- Impregnar con 10 µl de EDTA 0,5 M cada uno de los discos blancos de celulosa siguiendo un procedimiento estéril.

Preparación de discos de imipenem (10 µg) y meropenem (10 µg) con EDTA (930 µg)

- Impregnar con 5 µl de EDTA 0,5 M cada uno de los discos de imipenem o meropenem siguiendo un procedimiento estéril.
- Dejar secar durante 16-12 h en estufa de 35 °C.

Para poder identificar los diferentes discos suplementados con EDTA marcar con un pequeño punto de color, utilizando un rotulador fino (por ejemplo: utilizar color rojo para los discos de EDTA con carga de 1.900 µg y color verde para los discos de EDTA, IMI+EDTA y MER+EDTA).

Los discos preparados con EDTA podrán conservarse entre 4-20°C durante 4 meses.

A.6. APARATOS Y MATERIAL

A. 6.1. APARATOS

- Agitador tipo vórtex
- Dispensador de discos.
- Estufa de cultivos convencional 35°C
- Nevera
- Pipetas de precisión regulables de diferentes volúmenes

A.6.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Discos blancos de celulosa
- Escobillones de algodón estéril
- Asas estériles
- Pinzas
- Escala MacFarland.
- Puntas de pipeta desechables estériles de diferentes volúmenes.

A. 7. PROCEDIMIENTO (Técnicas de detección de MBL mediante caracterización fenotípica)

A.7.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- Escoger diferentes colonias de igual morfología a partir de una placa de cultivo de 18-24 h de incubación y realizar una suspensión en 2-3 ml de solución salina estéril, ajustando el inóculo a una turbidez aproximada de un 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml).
- Agitar en vórtex durante 15-20 segundos

A.7.2. SIEMBRA DE LAS PLACAS

- Utilizar placas de agar Mueller Hinton previamente pre-calentadas en estufa a 35°C durante 3-4 horas con la finalidad de eliminar el exceso de humedad.
- Introducir la torunda de algodón estéril en la suspensión bacteriana preparada previamente y realizar la siembra de las placas. Debe realizarse una siembra que abarque toda la superficie de la placa sin dejar ninguna zona libre.
- Dejar secar a temperatura ambiente aproximadamente durante 10-15 minutos antes de depositar los discos o las tiras de Etest.

A.7.3. DISPENSACIÓN DE LOS DISCOS Y/O TIRAS DE ETEST

- Los discos y/o tiras de Etest de los diferentes antibióticos a utilizar se sacarán de la nevera o congelador y se mantendrán a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de ser utilizados.
- Colocar los discos y/o tiras de Etest sobre la superficie de la placa sembrada con ayuda de unas pinzas presionando ligeramente sobre cada uno de ellos.
- Es muy importante tener en cuenta:
 - En caso de realizar el método de sinergia con doble disco (DDS) utilizando discos de EDTA, ceftazidima e imipenem, el disco de EDTA se colocará a una distancia aproximada de 10-15 mm (ver anexo 1). En esta técnica pueden

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección y confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo-beta-lactamasa	PNT-EPI-05	
		Edición 01	Página 4 de 8

utilizarse discos de EDTA con carga de 1.900 µg o discos de EDTA con carga de 930 µg.

En caso de realizar el método de sinergia con discos de imipenem e imipenem+EDTA colocar los discos a una distancia de, al menos, 20 mm (ver anexo 2).

En caso de realizar el método de sinergia mediante tiras de Etest utilizar una única placa.

- Incubar las placas en estufa durante 18-24h a una temperatura de 35°C.

A.8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Después de transcurrido el tiempo de incubación se procederá a valorar el efecto de la sinergia, medir el diámetro de inhibición (regla o pie de rey) o a realizar la lectura de la CMI.

La prueba de detección de metalo-enzimas se considera **positiva** al utilizar el método de sinergia con doble disco con EDTA, cuando se observe una ampliación del halo de inhibición o ausencia de crecimiento en el espacio entre el disco de EDTA y los discos de imipenem y/o ceftazidima.

La prueba de detección de metalo-enzimas se considera **positiva** al utilizar el método de sinergia con discos de imipenem e imipenem+EDTA o meropenem y meropenem+EDTA, cuando se observe una diferencia de ≥ 7 mm entre el halo de inhibición del disco de imipenem sin EDTA y el disco de imipenem con EDTA.

La prueba de detección de metalo-enzimas se considera **positiva** al utilizar las tiras de Etest cuando se observe una disminución de ≥ 3 diluciones entre la CMI de imipenem y la CMI de imipenem+EDTA.

A.9. RESPONSABILIDADES

- El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras en el laboratorio y de la realización del procedimiento.
- El facultativo supervisará las técnicas, actualizará el protocolo, interpretará y validará los resultados.

A.10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En la actualidad, no existe estandarización ni consenso sobre el tipo de técnicas más eficaces para la detección fenotípica de las cepas productoras de MBLs. En el presente PNT, referimos 3 métodos, a modo de resumen, descritos como eficaces por diferentes autores. El criterio de elección de dichos métodos ha sido en primer lugar, la facilidad y la sencillez en la realización de la técnica, así como su posible aplicación en la rutina diaria de un laboratorio clínico.

A.11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las técnicas que se describen no son 100% sensibles ni específicas. Algunos autores han indicado una muy baja especificidad de las tiras de Etest con imipenem/imipenem+EDTA para la detección de MBL.

B. CONFIRMACIÓN POR PCR DE LA PRODUCCIÓN DE MBL

B. 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agua bidestilada estéril
- Lisozima 5 mg/mL
- Tampón lisis: 6 mM Tris-HCl pH 8; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA pH 8; 0,2% desoxicolato sódico; 0,5% sarcosyl
- Tampón TE: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA pH 8
- Tampón TBE: 50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, 0,2 mM EDTA pH 8
- Iniciadores IMP: IMP-UP y IMP-DN (ver su secuencia y su posición en el gen en el anexo 3)
- Iniciadores VIM: VIM-B y VIM-F (ver su secuencia y su posición en el gen en el anexo 3)
- Solución de desoxirribonucleótidos trifosfato 25 mM (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP, dCTP).
- Componentes del *kit* de amplificación para PCR: Tampón de PCR (10x), MgCl₂ 25 mM, *Taq* DNA polimerasa (5U/µl).
- Bromuro de etidio

B. 6. APARATOS Y MATERIAL

B. 6.1. APARATOS

- Agitador tipo vórtex
- Bloque calefactor a 37°C
- Bloque calefactor a 95°C
- Termociclador
- Estufa de cultivos convencional 35°C
- Microcentrífuga de sobremesa

B. 6.2. MATERIAL

- Asas estériles
- Pipetas de precisión regulables de diferentes volúmenes
- Puntas de pipeta desechables estériles de diferentes volúmenes, con y sin filtro
- Tubos estériles tipo Eppendorf de 1,5 ml con tapa a presión
- Tubos estériles tipo Eppendorf de 0,2 ml con tapa a presión
- Gradillas para tubos Eppendorf

B. 7. PROCEDIMIENTO (Confirmación por PCR de los tipos de MBL más frecuentes en *P. aeruginosa* -IMP y VIM-).

Existen distintos protocolos de amplificación de IMP y VIM en la literatura científica. A continuación se exponen los protocolos en los que cada uno de los genes se amplifican por separado. También existen protocolos de amplificación en los que se combinan los iniciadores de ambos genes en una única reacción "*multiplex*" (Pitout *et al.* J Clin Microbiol 2005;43:3129-3135).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección y confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo-beta-lactamasa	PNT-EPI-05	
		Edición 01	Página 5 de 8

B. 7.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Reconstitución de los iniciadores

- Los iniciadores (anexo 3) son oligonucleótidos que se suministran comercialmente liofilizados y con la información necesaria sobre su pureza, características y concentración (nmol ó pmol).
- Se recomienda reconstituir los iniciadores con 1 ml de TE y de esta solución hacer una dilución de trabajo con una concentración media aproximada de 50 nm/ml (ó 50 pm/μl), tanto para la reacción de amplificación de IMP (iniciadores IMP-UP y IMP-DN) como para la de VIM (iniciadores VIM-B y VIM-F).

Preparación de las mezclas de amplificación

- Para preparar las mezclas de amplificación se precisan los componentes del *kit* de amplificación por PCR (tampón, MgCl₂ y el enzima *TaqDNA* polimerasa), dNTPs, soluciones de trabajo de los iniciadores y agua estéril. Todos los reactivos se conservarán congelados a -20°C, descongelarlos y esperar a que se equilibren a temperatura ambiente.
- Mezclar los componentes de acuerdo a la tabla del anexo 4 para amplificar IMP o anexo 5 para VIM.
- Se realizarán alícuotas (mezclas de amplificación) de 48 μl para reacciones de amplificación individuales. Las mezclas de amplificación se conservarán en tubos tipo Eppendorf de 0,2 ml, congelados a -20°C.

B. 7.2. EXTRACCIÓN DE ADN

- Numerar las cepas a estudiar correlativamente en el impreso correspondiente. Rotular convenientemente los tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- Programar dos bloques térmicos uno a 37°C y el otro a 95°C.
- Calcular el volumen de la solución de lisis en función del número de cepas a estudiar. Dispensar en cada tubo: 100 μl de tampón de lisis y 50 μg/ml lisozima (*)

(*): 1 μl de lisozima a 5 mg/ml

- Tomar una asa de 1μl con colonias de *P. aeruginosa* y resuspenderlas en la solución de lisis.
- Incubar los tubos a 37° durante 30 minutos.
- Incubar los tubos a 95°C durante 5 minutos.
- Diluir el lisado 1/100 en TE (5 μl lisado en 500 μl de TE). Tomar 2 μl de esta solución como "ADN molde" en una reacción de amplificación de 50 μl.

B. 7.3. AMPLIFICACIÓN

En la zona de preparación de reactivos:

- Descongelar las alícuotas de "mezclas de amplificación" necesarias. Cada tubo contendrá 48 μl de la mezcla, necesarios para una amplificación. Es imprescindible utilizar como controles positivos cepas bien caracterizadas que contengan el gen IMP o el gen VIM. Es recomendable utilizar un

control negativo, en el que se utilizará un tubo con mezcla de amplificación al que se le añadirá agua, en lugar de ADN.

En la zona de extracción de ADN:

- Añadir 2 μl de "ADN molde" a cada uno de los tubos que contiene 48 μl de la mezcla de amplificación (el volumen final de reacción es de 50 μl). El control positivo se coloca en la última posición, salvo que en la reacción se haya incluido un control negativo, en cuyo caso éste ocupará la última posición y el control positivo la penúltima.

En la zona de amplificación:

- Conectar el termociclador e introducir los tubos en la placa.
- Seleccionar el programa con las condiciones que se especifican en el anexo 6, u otras similares.

B. 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

B. 8.1. DETECCIÓN DEL AMPLIFICADO

- La detección de amplificados se hace mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE.
- En el gel se carga un control de peso molecular con bandas desde 100 bp hasta 1Kb (en el primer pocillo y, opcionalmente, en el último) y en el resto de los pocillos entre 10 y 20 μl del producto de PCR. El control positivo se coloca en la última posición, salvo que en la reacción se haya incluido un control negativo, en cuyo caso éste ocupará la última posición y el control positivo la penúltima.
- Cuando el frente de avance de las muestras llegue al final del gel, apagar el generador de corriente, extraer el gel y teñirlo con bromuro de etidio (1μg/mL) durante 30 minutos.
- El gel para la detección de amplificados debe visualizarse sobre un transiluminador de luz ultravioleta. La reacción de amplificación para IMP se considera positiva si se observa una banda única de 587 bp. La reacción de amplificación para VIM se considera positiva si se observa una banda única de 509 bp.
(En ambos casos se precisa que en los correspondientes controles positivos se amplifique una banda del peso molecular indicado y que en los controles negativos no se detecte amplificación).

B. 8.2. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Si aparece una banda única de 587 bp, se indicará: "*P. aeruginosa* con una MBL de tipo IMP".

Si aparece una banda única de 509 bp, se indicará: "*P. aeruginosa* con una MBL de tipo VIM".

B. 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será responsable del procesamiento de las muestras en el laboratorio.

El facultativo especialista supervisará las técnicas, actualizará el protocolo, interpretará y validará los resultados.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección y confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo-beta-lactamasa	PNT-EPI-05	
		Edición 01	Página 6 de 8

B. 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Se han descrito las condiciones de amplificación estándar de los genes IMP y VIM, utilizando un termociclador Perkin Elmer 9600 y una enzima *Taq* de AmpliTaq Gold, Applied Biosystems. Puede ser necesario modificar las condiciones de amplificación (concentración de MgCl₂, temperatura de hibridación de los iniciadores, número de ciclos o duración de los mismos, etc) si se utiliza un termociclador distinto o una *Taq* de otra marca comercial.

En este PNT se han expuesto dos ejemplos de protocolos de amplificación de los genes IMP y VIM, pero existen otros muchos descritos en la literatura en los que se utilizan otros iniciadores y otras condiciones en la reacción de amplificación. También existen protocolos de amplificación en los que se combinan los iniciadores de ambos genes en una única reacción "multiplex", un ejemplo es el publicado recientemente por Pitout *et al.* J Clin Microbiol. 2005; 43:3129-35.

B. 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En relación a la confirmación por PCR de los tipos de MBL más frecuentes en *P. aeruginosa*:

En este PNT se ha expuesto la detección por PCR de sólo dos MBL, las más frecuentes en *P. aeruginosa*, IMP y VIM. Si las pruebas de detección fenotípica de MBL dan un resultado positivo y este no se confirma mediante PCR, es necesario considerar otro tipo de MBL (GIM, SPM, SIM). Hay que recordar que otros enzimas, no metaloenzimas, pueden tener actividad carbapenemasa (según la clasificación de Ambler, enzimas de clase A - penicilinasas- o de clase D -oxacilinasas-) éstos pueden dar reacciones dudosas en la detección fenotípica y negativo para los genes IMP y VIM.

Los protocolos de amplificación de IMP o de VIM descritos en este PNT, sólo permiten confirmar la presencia de un gen que sintetiza un enzima de las familias mencionadas. De momento, se han descrito múltiples enzimas de la familia IMP y de la familia VIM con actividad MBL. Para identificar el tipo concreto sería necesario secuenciar el producto obtenido tras la amplificación por PCR.

12. BIBLIOGRAFÍA

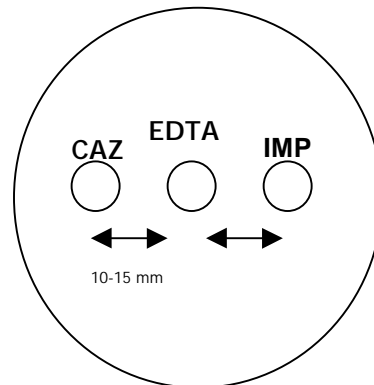
1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol 2000; 38:40-43.
2. Lee K, Chong Y, Sim YS, et al. Modified Hodge and EDTA disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7:88-91.
3. Lee K, Sim YS, Yong D, et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41:4623-4629.
4. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, et al. Simple Microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase

production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2002; 40:4388-4390.

5. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infection 2002; 8:321-331.
6. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005; 43:3129-3135.
7. Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene form a *P. aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:891-897.
8. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol 1996; 34:2909-2913.
9. Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. J Clin Microbiol 2002; 40:2755-2759.
10. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18:306-325.
11. Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40:3798-3801.

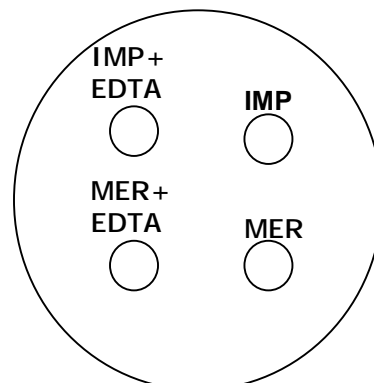
ANEXOS

Anexo 1. Método de sinergia con doble disco



CAZ: ceftazidima; IMP: imipenem

Anexo 2. Método de sinergia con discos



IMP: imipenem; MER: meropenem

Anexo 3. Secuencias de los iniciadores para la amplificación por PCR de los genes que codifican enzimas tipo IMP y VIM.

Iniciadores IMP ⁽¹⁾

INICIADOR	SECUENCIA	POSICION EN GEN <i>IMP</i>	TAMAÑO AMPLIFICADO
IMP-UP	5' CTACCGCAGCAGAGTCTTTG 3'	47-66	587 bp
IMP-DN	5' AACCGATTTTGCCTTACCAT 3'	633-614	

Iniciadores VIM ⁽²⁾

INICIADOR	SECUENCIA	POSICION EN GEN <i>VIM</i>	TAMAÑO AMPLIFICADO
VIM-B	5' ATGGTGTTTGGTCGCATATC 3'	152-171	509 bp
VIM-F	5' TGGGCCATTCAGCCAGATC 3'	661-643	

- (1) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, *et al.* PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{imp}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2909-2913.
- (2) Poirel L, Naas T, Nicolas D, *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene form a *P. aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:891-897.

Anexo 4. Preparación de las mezclas de amplificación para genes *bla_{IMP}*

Componentes	Volumen (x1 reacción)	Concentración final
Agua	36 µl	
Tampón PCR (x10)	5 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	2 mM
dNTPs (25 mM)	0,5 µl	0,25 mM
IMP-UP (47 pm/µl)	1 µl	47 pm
IMP-DN (50 pm/µl)	1 µl	50 pm
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0,2 µl	1 U

Anexo 5. Preparación de las mezclas de amplificación para genes bla_{VIM}

Componentes	Volumen (x1 reacción)	Concentración final
Agua	36 µl	
Tampón PCR (x10)	5 µl	1x
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	2 mM
dNTPs (25 mM)	0,5 µl	0,25 mM
VIM-B (57 pm/µl)	1 µl	47 pm
VIM-F (52 pm/µl)	1 µl	50 pm
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0,2 µl	1 U

Anexo 6. Ciclos en el termociclador para amplificar los genes IMP y VIM

Incubación 95 °C x 12,00 min.

Ciclos 94 °C x 0,45 min.
45 °C x 0,45 min.
72 °C x 1 min.

x 30 ciclos

Incubación 72 °C x 5,00 min.

Mantener 4°C indefinido