

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

39.

**Detección fenotípica de
mecanismos de resistencia
en grampositivos**

2 0 1 1

Coordinadora: **María Isabel Morosini**

Autores: **Carmen Ardanuy
Emilia Cercenado
María Isabel Morosini
Carmen Torres**



ISBN- 978-84-615-4094-5

ÍNDICE

DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Resistencia a los antimicrobianos en estafilococos

- 2.1. Resistencia a las penicilinas por producción de betalactamasa
- 2.2. Resistencia a la meticilina (oxacilina): homogénea y heterogénea
- 2.3. Resistencia *borderline* a la oxacilina (BORSA) en *Staphylococcus aureus*
- 2.4. Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina
- 2.5. Resistencia a los aminoglucósidos
- 2.6. Sensibilidad disminuida a los glucopéptidos
- 2.7. Resistencia a la mupirocina
- 2.8. Resistencia al linezolid

3. Resistencia a los antimicrobianos en enterococos

- 3.1. Resistencia de alto nivel a la gentamicina y a la estreptomina
- 3.2. Resistencia a los glucopéptidos

4. Resistencia a los antimicrobianos en *Streptococcus pneumoniae*

- 4.1. Resistencia a los betalactámicos
- 4.2. Resistencia a las fluoroquinolonas

5. Bibliografía

- 5.1. Bibliografía general
- 5.2. Bibliografía estafilococos
- 5.3. Bibliografía enterococos
- 5.4. Bibliografía *Streptococcus pneumoniae*

DOCUMENTOS TÉCNICOS:

1. **PNT-MRP-01.** Detección de betalactamasa en *Staphylococcus* y *Enterococcus*
2. **PNT-MRP-02.** Detección fenotípica de resistencia a la meticilina y a los antimicrobianos MLS_B en estafilococos
3. **PNT-MRP-03.** Detección fenotípica de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en enterococos
4. **PNT-MRP-04.** Detección fenotípica de resistencia a los glucopéptidos en enterococos
5. **PNT-MRP-05.** Detección fenotípica de resistencia a los betalactámicos en *Streptococcus pneumoniae*
6. **PNT-MRP-06.** Detección fenotípica de resistencia a las fluoroquinolonas en *Streptococcus pneumoniae*

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

39. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN GRAMPOSITIVOS. 2011

Coordinadora: María Isabel Morosini

**Autores: Carmen Ardanuy
Emilia Cercenado
María Isabel Morosini
Carmen Torres**

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de infecciones por microorganismos grampositivos es elevada, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. El aumento de la resistencia a los antimicrobianos que se emplean con más frecuencia en los tratamientos de estas infecciones requiere la detección precoz y eficaz de los mecanismos implicados para orientar e incluso modificar las estrategias terapéuticas.

Los microorganismos grampositivos de mayor trascendencia clínica pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, principalmente *Staphylococcus aureus* pero también diferentes especies de estafilococos coagulasa negativa (ECN), *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* y varias especies de *Streptococcus*, entre las que destaca *Streptococcus pneumoniae*.

El aislamiento de estas especies en el laboratorio de Microbiología permite la detección de su resistencia antimicrobiana, tanto a nivel fenotípico como, eventualmente, genotípico, lo que posee gran trascendencia clínica y epidemiológica. La aproximación fenotípica permite una rápida inferencia de los mecanismos de resistencia presentes así como de las resistencias asociadas a antimicrobianos no relacionados. La presencia de bajos o altos niveles de expresión de resistencia a determinados antimicrobianos así como de poblaciones heteroresistentes, entre otros, se pueden detectar a nivel fenotípico mediante la aplicación de técnicas y condiciones especiales y de este modo facilitar la actitud terapéutica ante las infecciones causadas por microorganismos que producen este tipo de mecanismos de resistencia.

En este Procedimiento se abordan diferentes métodos utilizados para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como los métodos de detección fenotípica de mecanismos específicos que permiten definir la resistencia a los principales grupos de antimicrobianos empleados frente a los microorganismos grampositivos de mayor importancia clínica. Los puntos de corte empleados en la interpretación de la sensibilidad son los indicados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) si bien en determinados casos se incluyen los correspondientes al *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2011) y al *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (SFM, 2010).

2. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ESTAFILOCOCOS

2.1. RESISTENCIA A LAS PENICILINAS POR PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASA

Las betalactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antimicrobianos betalactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. En el caso concreto de los estafilococos, la betalactamasa producida es una penicilinasas que hidroliza exclusivamente las penicilinas. El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por

betalactamasa implica resistencia a todas las penicilinas excepto las semisintéticas, como la oxacilina y la cloxacilina.

Actualmente este mecanismo de resistencia es muy frecuente tanto en *S. aureus* como en las diferentes especies de ECN y su diseminación es mundial. En nuestro país y según los datos de diferentes estudios nacionales, la prevalencia de producción de penicilinasas por *S. aureus* se sitúa alrededor del 90% mientras que el porcentaje es algo inferior en los ECN (80-85%) aunque estas cifras son variables según las diferentes instituciones y las diferentes unidades de hospitalización.

Las penicilinasas estafilocócicas son betalactamasas de clase A que hidrolizan las penicilinas. Se han descrito 4 variantes de penicilinasas en estafilococos, identificadas como tipos A, B, C y D. La más frecuente es la de tipo C. Si el microorganismo produce una penicilinasas, éste es resistente a todas las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina). Para su detección se pueden utilizar discos impregnados con una cefalosporina cromogénica (nitrocefina) que al hidrolizarse en presencia de la betalactamasa experimenta un cambio en su estructura, lo que resulta en un producto coloreado (naranja-rojo). Una prueba de betalactamasa positiva indica, asimismo, resistencia a todas las penicilinas. Las penicilinasas estafilocócicas se inhiben con inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) y por tanto estas cepas son sensibles a las combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa. Asimismo estas penicilinasas no hidrolizan las penicilinas semisintéticas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) ni tampoco las cefalosporinas ni las carbapenemas que mantienen su actividad antiestafilocócica. Sin embargo, cada tipo de penicilinasas tiene un perfil de sustrato específico, lo que implica que algunas cefalosporinas se pueden hidrolizar por algunos tipos de betalactamasa en presencia de elevados inóculos (efecto de inóculo). Así, existe un marcado efecto de inóculo sobre la cefalexina si el estafilococo produce las betalactamasas de tipo A o C, y un efecto de inóculo mediano sobre la cefalotina si produce las de tipo B o C. Sin embargo no existe efecto de inóculo frente a cefuroxima ni frente a ceftriaxona.

Las penicilinasas estafilocócicas son mayoritariamente inducibles y se excretan extracelularmente. Los genes que las codifican en general están localizados en plásmidos de pequeño tamaño que se pueden transferir de célula a célula por transducción. También se pueden localizar en plásmidos más grandes junto a los genes que codifican otros mecanismos de resistencia y se pueden transferir por conjugación, no solamente entre cepas de *S. aureus* sino también entre cepas de *S. aureus* y de otros ECN e incluso (aunque se ha descrito de forma esporádica) a microorganismos del género *Enterococcus*. La resistencia de los estafilococos a las penicilinas puede detectarse mediante la prueba de nitrocefina como se indicó

anteriormente, pero también mediante la técnica de difusión con disco o por dilución en caldo o en agar. Para la detección de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina es más adecuado utilizar un disco de 10 unidades de penicilina que un disco de 10 µg de ampicilina. Asimismo, el disco de penicilina se debe utilizar para determinar la sensibilidad a todas las penicilinas lábiles a la acción de la penicilinas, como ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina.

Para la determinación de la CMI a las penicilinas se utiliza el medio de Mueller-Hinton, cuya concentración de cationes debe estar ajustada en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo. Se requiere un inóculo ajustado al 0,5 de la escala de McFarland y entre 18-20 horas de incubación a 35-37°C. Cuando el halo de inhibición con el disco de penicilina de 10 unidades sea de ≥ 29 mm (sensible) o por dilución en caldo o en agar, la CMI de penicilina sea de $\leq 0,12$ mg/L (sensible) se debe confirmar que el microorganismo es realmente sensible a las penicilinas; para ello se realiza la prueba de nitrocefina utilizando las colonias crecidas en el borde del halo de inhibición de la penicilina ya que, en estas colonias, la producción de penicilinas ha sido inducida por la incubación previa en presencia de este antimicrobiano.

En resumen, las cepas de estafilococos que son resistentes a la penicilina pero sensibles a la oxacilina producen penicilinas, lo que implica resistencia a todas las penicilinas pero no a las penicilinas semisintéticas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) que poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de esta betalactamasa. Asimismo, estas cepas son sensibles a las combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, a las cefalosporinas y a las carbapenemas.

2.2. RESISTENCIA A LA METICILINA (OXACILINA): HOMOGÉNEA Y HETEROGÉNEA

El fenotipo de resistencia a la meticilina (y a la oxacilina) es mucho más frecuente entre las diferentes especies de ECN (con la excepción de *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*) que en *S. aureus*. Esta resistencia se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los betalactámicos. La resistencia a la meticilina implica resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas (con la posible excepción de las cefalosporinas ceftobiprole y ceftarolina, todavía no introducidas en el arsenal terapéutico, y cuyos valores de CMI se ven menos afectadas), monobactamas y carbapenemas (con la posible excepción de razupenem, tampoco introducido en el arsenal terapéutico e igualmente con CMI menos afectadas). En España, en los últimos 10 años, la prevalencia de resistencia a la meticilina en *S. aureus* (SARM) se ha mantenido en

torno al 30%, mientras que globalmente, entre las diferentes especies de ECN, las cifras oscilan entre el 60-70% en este mismo periodo y en general estos porcentajes son superiores en cepas procedentes de unidades de cuidados intensivos.

Como se indicó anteriormente, la resistencia a la meticilina (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) en estafilococos se debe a la adquisición de ADN exógeno que codifica la producción de una proteína fijadora de penicilina (PBP) supernumeraria, de baja afinidad por los betalactámicos y que no se inhibe por estos antimicrobianos. *S. aureus* normalmente contiene 4 PBPs, de las cuales las PBPs 1, 2 y 3 son esenciales. La PBP de baja afinidad denominada PBP2a o PBP2', de 78 kDa, está codificada por el gen cromosómico *mecA*. La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. Se pueden diferenciar dos tipos de cepas de SARM o de ECN resistentes a la meticilina, unas con resistencia homogénea y otras con resistencia heterogénea. En las cepas que presentan resistencia homogénea o de alto nivel a la oxacilina, la mayor parte de la población expresa la resistencia. Sin embargo, la expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina generalmente es heterogénea (CMI de oxacilina 1-16 mg/L). Las cepas con expresión heterogénea se caracterizan porque sólo una pequeña proporción de la población ($\leq 0,1\%$) sobrevive con concentraciones de oxacilina superiores a 10 mg/L, mientras que la mayor parte de la población no es viable con bajas concentraciones del antimicrobiano (1-5 mg/L). La mayoría de los aislamientos clínicos presentan este patrón de heterorresistencia bajo las condiciones rutinarias de cultivo. Sin embargo, las cepas heterogéneas pueden aparecer como homogéneas bajo ciertas condiciones, como el crecimiento en un medio hipertónico (suplementado con 2% de NaCl) o la incubación a 30°C. Estos cambios en la expresión de la resistencia bajo diferentes condiciones de cultivo son transitorios y fenotípicos.

La cefoxitina es un marcador alternativo de la presencia de *mecA* ya que es un inductor más potente del sistema regulatorio de *mecA* que las penicilinas y por ello mejora la expresión de este gen y en consecuencia, mejora también la detección de la resistencia a la meticilina. La utilización del disco de cefoxitina es especialmente útil y de preferencia sobre el disco de oxacilina para detectar la resistencia a oxacilina mediada por el gen *mecA* en las cepas heterorresistentes y se debe utilizar siempre en cepas de ECN. Además, no presenta problemas de estabilidad como la oxacilina durante su conservación.

El fenotipo de resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de oxacilina (1 µg) y/o cefoxitina (30 µg) o por dilución en caldo o en agar (Figura 1). Para ello se utiliza el medio de Mueller Hinton suplementado con 2% de

NaCl en el caso de realizar los métodos de dilución y además ajustado con cationes en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo. Se requiere un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a 35°C. La incubación a temperaturas superiores a 35°C puede no permitir la detección de la resistencia a la meticilina en los estafilococos. Una cepa de *S. aureus* se considera resistente a la oxacilina cuando el halo de inhibición de la oxacilina es ≤ 10 mm o cuando la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L. En el caso de los ECN, una cepa se considera resistente a la oxacilina cuando la CMI es $\geq 0,5$ mg/L, excepto en *S. lugdunensis* que se considera resistente si la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L.

En *Staphylococcus* la resistencia a la oxacilina implica resistencia al resto de los betalactámicos, tanto si presentan homorresistencia como heterorresistencia y no es necesaria ni recomendable la inclusión de ninguno de ellos en el antibiograma. Las cepas con heterorresistencia suelen mostrarse como sensibles a muchos betalactámicos cuando se realiza un antibiograma con discos y su interpretación como sensibles puede conducir a fracasos terapéuticos. Las cepas con resistencia homogénea a la oxacilina presentan alto nivel de resistencia cruzada a todos los betalactámicos incluyendo las penicilinas, las cefalosporinas, las carbapenemas y las monobactamas. Del mismo modo, las cepas de estafilococos resistentes a la cefoxitina (halo ≤ 21 mm en *S. aureus*, CMI ≥ 8 mg/L y ≤ 24 mm en ECN, CMI no definida) indican la presencia de *mecA* y por tanto, la resistencia a todos los betalactámicos. Por el contrario, la sensibilidad a cefoxitina en *S. aureus* (halo ≥ 22 mm, CMI ≤ 4 mg/L) o en ECN (halo ≥ 25 mm, CMI no definida) descarta la presencia del gen *mecA* y por tanto de la heterorresistencia a la meticilina. Como excepción a esta regla, las dos cefalosporinas (ceftobiprole y ceftarolina) y el carbapenem (razupenem), no introducidos todavía en terapéutica y anteriormente indicados, que presentan valores de CMI relativamente bajos frente a estafilococos resistentes a la oxacilina debido a su gran afinidad por la PBP2a.

2.3. RESISTENCIA BORDERLINE A LA OXACILINA (BORSA) EN *Staphylococcus aureus*

Algunas cepas de *S. aureus* presentan resistencia de bajo nivel o resistencia *borderline* a la oxacilina (*borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*, BORSA) y se caracterizan por una resistencia intermedia a la oxacilina y CMI de oxacilina en el punto de corte de resistencia o una dilución por encima de éste (4-8 mg/L). Estas cepas *borderline* se pueden dividir en dos categorías en función de la presencia o ausencia del gen *mecA*. Si contienen el gen *mecA* son cepas extremadamente heterorresistentes que producen la PBP2a. Si no contienen el gen *mecA* ni por tanto la PBP2a, esta resistencia de bajo nivel puede deberse a la hiperproducción de la betalactamasa estafilocócica o a la modificación (hiperproducción o alteración) de las PBPs 1, 2, y 4 en el caso de *S. aureus*. Las cepas que hiperproducen betalactamasa son sensibles a las asociaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam). Para detectar cepas BORSA, se ha recomendado en algunos casos el estudio en paralelo de un disco de oxacilina (1 μ g) y otro con oxacilina y clavulánico (a concentración de 4 μ g). Si se produce ampliación del halo de inhibición utilizando este último disco con la combinación, el mecanismo de resistencia implicado será, presumiblemente, debido a la hiperproducción de penicilinas. No obstante, algunas cepas de *S. aureus* pueden ser sensibles al ácido clavulánico, incluso a una concentración de 1 μ g, por lo que esta prueba no será siempre concluyente. Las cepas *borderline mecA* negativas son sensibles a la cefoxitina (halo ≥ 22 mm) mientras que las *mecA* positivas son resistentes a este antimicrobiano (halo ≤ 21 mm).

Las cepas con resistencia intermedia a la oxacilina pero sensibles a la cefoxitina se deben informar como sensibles a la cefoxitina y nunca se debe informar una sensibilidad intermedia a la oxacilina.

Figura 1. Detección de resistencia a la oxacilina en *Staphylococcus* mediante difusión con discos de oxacilina y cefoxitina. Imagen izquierda: cepa con resistencia homogénea. Imagen derecha: cepa con resistencia heterogénea.



Del mismo modo, si se realiza la detección del gen *mecA* y/o de la PBP2a y los resultados son negativos, el aislamiento debe informarse como sensible a la oxacilina. Estas cepas *borderline mecA* negativas son sensibles a todos los betalactámicos (penicilinas antiestafilocócicas, cefalosporinas y carbapenemas). Por el contrario, las cepas *mecA* positivas son resistentes a todos los betalactámicos.

No existen datos clínicos que sugieran que el nivel de resistencia expresado por las cepas *borderline mecA* negativas conduzca al fracaso terapéutico y los datos obtenidos en estudios en animales demuestran que la oxacilina es eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de cepas. Por tanto, el único problema ante una cepa con resistencia intermedia a la oxacilina sería la dificultad de diferenciar si es *mecA* positiva o negativa. No obstante, este problema queda resuelto mediante la utilización del disco de cefoxitina o mediante la detección del gen *mecA* y/o de la PBP2a por técnicas moleculares y por técnicas de aglutinación con látex, respectivamente.

2.4. RESISTENCIA A LOS MACRÓLIDOS Y A LA CLINDAMICINA

Los macrólidos, junto con las lincosamidas y las estreptograminas B (MLS_B) son tres grupos de antimicrobianos de estructuras químicas diferentes pero con mecanismos de acción similares. En los estafilococos, la resistencia a los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina, midecamicina) puede asociarse a diferentes fenotipos de sensibilidad o de resistencia a las lincosamidas (clindamicina) que se pueden identificar en el laboratorio mediante el método de difusión con discos de eritromicina y clindamicina o mediante dilución en caldo utilizando una combinación de ambos antimicrobianos. Los fenotipos que se observan mediante difusión con discos son: 1) resistencia a la eritromicina y a la clindamicina; 2) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina pero con un achatamiento del halo de la clindamicina en la proximidad de la eritromicina (D-test positivo); 3) resistencia a la eritromicina y sensibilidad a la clindamicina sin achatamiento del halo (D-test negativo). En el primer caso se trata de resistencia constitutiva a la eritromicina y a la clindamicina (fenotipo cMLS_B), en el segundo de resistencia constitutiva de expresión inducible (fenotipo iMLS_B) y en el tercero de resistencia a la eritromicina mediada por una bomba de expulsión activa (fenotipo MS_B). Se puede identificar también un cuarto fenotipo de resistencia a la clindamicina y sensibilidad a la eritromicina debido a la acción de enzimas que inactivan las lincosamidas (codificadas por los genes *Inu*) aunque es poco frecuente.

La resistencia a los macrólidos y a la clindamicina es más frecuente entre cepas de ECN que en *S. aureus*. Según los datos del 6º estudio nacional de estafilococos realizado en 2006, los porcentajes de resistencia de *S. aureus* a la eritromicina y a la clindamicina fueron del 37% y del 19,9%, respectivamente. Esta resistencia fue constitutiva en

el 10,4%, inducible en el 9,5% y mediada por bomba de expulsión activa en el 11,8%. En este estudio no se detectó ninguna cepa resistente a la clindamicina y sensible a la eritromicina. En el caso de ECN, la resistencia a la eritromicina fue del 66,5% y a la clindamicina del 46,2%. La resistencia a los macrólidos fue constitutiva en el 31%, inducible en el 13,4% y mediada por bomba de expulsión en el 22,1%. El fenotipo de resistencia a la clindamicina y sensibilidad a la eritromicina se detectó en el 1,8% de las cepas de ECN estudiadas.

Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos del grupo MLS_B que subyacen bajo los 4 fenotipos de resistencia anteriormente indicados pueden resumirse en:

1) Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas principalmente por genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, entre otros) y en raras ocasiones por el gen *cfi*; 2) expulsión activa del antimicrobiano relacionado con diferentes genes de codificación plasmídica del tipo *msrA*; 3) inactivación del antimicrobiano (genes de tipo *Inu*); 4) modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o de proteínas ribosómicas.

La presencia de genes *erm* es el mecanismo más frecuente y confiere un fenotipo de resistencia denominado MLS_B (resistencia a los macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono, las lincosamidas y las estreptograminas del grupo B). Como se indicó anteriormente, este fenotipo puede ser de expresión constitutiva o inducible (cMLS_B o iMLS_B). En el primer caso se produce resistencia cruzada de alto nivel a todos los antimicrobianos del grupo MLS_B, mientras que el fenotipo inducible se presenta como resistencia a los macrólidos pero sensibilidad a las lincosamidas y a las estreptograminas B en ausencia de un inductor. En las cepas con fenotipo iMLS_B, la eritromicina induce la expresión del mecanismo de resistencia. Por ello, si se estudia la sensibilidad de estas cepas a los macrólidos de 16 átomos de carbono, la clindamicina y las estreptograminas del grupo B en ausencia de eritromicina, se manifestarán como sensibles a estos antimicrobianos, cuando en realidad son resistentes, ya que poseen el mecanismo de resistencia que se puede inducir *in vivo* y conducir a fracasos terapéuticos. La inducción de la resistencia por la eritromicina se puede detectar en el laboratorio mediante el denominado D-test, que consiste en utilizar un disco de eritromicina de 15 µg y otro de clindamicina de 2 µg colocados a una distancia de 15 o 20 mm entre ambos, de modo que se observe un achatamiento del halo de inhibición (figura 2). También se puede detectar esta inducción por el método de microdilución utilizando la combinación en el mismo pocillo de eritromicina (4 mg/L) con clindamicina (0,5 mg/L), además de pocillos individuales para determinar la CMI de la eritromicina y de la clindamicina por separado. Tras la incubación a 35-37°C durante 18-24 horas, una CMI de eritromicina en el rango de resistente junto con una CMI de clindamicina en el rango sensible, asociados a presencia de crecimiento en el pocillo

combinado con eritromicina y clindamicina, indicarán que se trata del fenotipo de resistencia inducible. El segundo fenotipo es el MS_B (resistencia a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono y a las estreptograminas B pero no a la clindamicina ni a los macrólidos de 16 átomos) debido a un mecanismo de expulsión activa con especificidad para la expulsión de macrólidos de 14 y de 15 átomos y codificado principalmente por genes del tipo *msrA*. En este fenotipo el D-test es negativo, es decir la eritromicina no induce la resistencia y por tanto no se observa un achatamiento en el halo de la clindamicina, antimicrobiano que conserva su actividad antibacteriana y es eficaz si se utiliza en el tratamiento (figura 2). La expresión de este fenotipo, detectada por el método de microdilución, se presentaría con una CMI de eritromicina en el rango resistente, junto con una CMI de clindamicina en el rango sensible, asociada a la ausencia de crecimiento en el pocillo combinado con eritromicina y clindamicina. Los fenotipos derivados de la inactivación del antimicrobiano son poco frecuentes. Se han descrito enzimas con actividad fosfotransferasa que inactivan los macrólidos de 14 y de 15 átomos de carbono y nucleotidiltransferasas que inactivan exclusivamente las lincosamidas. Por último, cuando se produce una metilación de la diana por la metilasa codificada por el gen *cfr* se produce resistencia combinada a la clindamicina, al cloranfenicol y florfenicol, a las oxazolidinonas (linezolid), a pleuromutilinas y a estreptograminas A.

En los últimos años, el aumento de las infecciones por cepas de SARM de origen comunitario con un patrón de resistencia a los antimicrobianos diferente al de las cepas nosocomiales ha renovado el interés por la utilización de la clindamicina como alternativa terapéutica. Por este motivo cuando se observe en el laboratorio sensibilidad a este compuesto pero

resistencia a la eritromicina es muy importante determinar si se trata de un fenotipo inducible o de uno mediado por bomba de expulsión activa, bien por el método de difusión con discos o por microdilución. En el primer caso, la presencia de genes *erm* hace que exista riesgo de mutación hacia la resistencia constitutiva durante el tratamiento con clindamicina, lo que desaconseja la utilización de este antimicrobiano en infecciones estafilocócicas. Por el contrario, en el segundo caso la clindamicina constituye una opción terapéutica.

2.5. RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCOSIDOS

En los laboratorios de Microbiología Clínica, en la mayoría de los casos se estudia la sensibilidad de los estafilococos a la gentamicina, a la tobramicina y a la amicacina puesto que éstos son los de mayor utilización en la terapéutica. Los dos fenotipos más frecuentes de resistencia a los aminoglucósidos que se pueden encontrar al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* son el de resistencia a la gentamicina y a la tobramicina pero sensibilidad aparente a la amicacina y el de sensibilidad a la gentamicina y resistencia a la tobramicina y a la amicacina. En ambos casos la resistencia se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, el primero a la producción de la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2'') y el segundo a la de la enzima ANT(4')(4'').

La resistencia de los estafilococos a los aminoglucósidos es más frecuente en los ECN que en *S. aureus*. Según los datos del 6º estudio nacional de estafilococos realizado en 2006 y anteriormente mencionado, en *S. aureus* la tasa de resistencia a la gentamicina fue del 8,6% y a la tobramicina del 27%, mientras que en ECN estas cifras fueron del 44,2% y del 49,9%, respectivamente.

Figura 2. Izquierda: cepa de *Staphylococcus epidermidis* con resistencia a la eritromicina mediada por bomba de expulsión activa (D-test negativo). Derecha: cepa de *S. aureus* con fenotipo MLS_B inducible (D-test positivo).



En el caso de SARM, la resistencia a la gentamicina fue del 20% y a la tobramicina del 72,6%. La resistencia a la gentamicina refleja un mecanismo de resistencia mediado por la enzima bifuncional, mientras que la resistencia a la tobramicina refleja el fenotipo mediado por la enzima ANT(4')(4"). En este estudio, resulta también llamativo que las diferencias de sensibilidad a la gentamicina y a la tobramicina son mayores en el caso de *S. aureus*, característica mucho más acusada en cepas de SARM, lo que indica la amplia distribución de esta enzima en nuestro medio.

En las cepas de estafilococos que expresan un fenotipo de resistencia a la gentamicina y la tobramicina pero sensibilidad aparente a la amicacina, el mecanismo de resistencia es debido a la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2"), que combina la actividad acetiltransferasa con la actividad fosfotransferasa y que está codificada por el gen *aac(6')-aph(2")*. La presencia de esta enzima implica resistencia a casi todos los aminoglucósidos de utilización clínica, con la excepción de la estreptomina. Por tanto, la gentamicina, la tobramicina, la amicacina y además la netilmicina y la kanamicina son sustratos de esta enzima, y aunque *in vitro* estas cepas se observen como sensibles a la amicacina, en realidad se deben considerar e informar como resistentes. En este caso, las CMI de gentamicina son más elevadas que las de tobramicina y los valores de CMI de amicacina suelen estar en el rango sensible debido a que este antimicrobiano es un sustrato más resistente a la acción de la enzima, pero independientemente de que las cepas se muestren sensibles fenotípicamente, se deben considerar resistentes ya que la capacidad bactericida de la amicacina está disminuida.

Las cepas de estafilococos sensibles a la gentamicina y resistentes a la tobramicina y a la amicacina presentan también un mecanismo de resistencia adquirido y mediado por la enzima nucleotidiltransferasa o adeniltransferasa denominada ANT(4')(4"). Esta enzima, que está codificada por genes albergados en plásmidos o en transposones, adenila grupos hidroxilos de los aminoglucósidos e inactiva a la tobramicina con mayor eficiencia que a la amicacina. Por tanto, es frecuente observar sensibilidad o resistencia intermedia a la amicacina tanto en el antibiograma por difusión con discos como por dilución. La tobramicina es el mejor marcador de este mecanismo de resistencia, de modo que aquellas cepas que aparezcan en el antibiograma como sensibles a la gentamicina y resistentes a la tobramicina deben informarse como resistentes también a la amicacina, independientemente de que las cepas aparezcan como sensibles a la amicacina en el antibiograma.

Es importante detectar este mecanismo de resistencia incluyendo siempre en el antibiograma de estafilococos los discos de gentamicina y de tobramicina (o bien determinar por microdilución la sensibilidad a estos dos antimicrobianos). No se debe asumir que la sensibilidad a la gentamicina

implica también sensibilidad al resto de los aminoglucósidos ya que, como se indicó anteriormente, la presencia de la enzima ANT(4')(4") es actualmente bastante frecuente entre las cepas de SARM de los hospitales españoles y del resto de Europa.

2.6. SENSIBILIDAD DISMINUIDA A LOS GLUCOPÉPTIDOS

Los estafilococos en general mantienen una elevada sensibilidad a los glucopéptidos, de manera que lo más frecuente es que sean sensibles a la vancomicina y a la teicoplanina. Sin embargo, existen cepas con sensibilidad disminuida a ambos antimicrobianos, tanto entre *S. aureus* como entre las diferentes especies de ECN. En el caso de *S. aureus*, actualmente se define una cepa como VISA (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*) cuando la CMI de vancomicina frente a esta cepa, determinada por el método de microdilución en caldo es de 4-8 mg/L según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Asimismo, se considera que una cepa es resistente a vancomicina si la CMI de vancomicina determinada por microdilución en caldo es de ≥ 16 mg/L. Las cepas VISA pueden presentar también sensibilidad disminuida o resistencia a la teicoplanina, por lo que hoy en día suele utilizarse el término GISA (*glycopeptide-intermediate S. aureus*) para definir las. Los niveles relativos de resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina varían entre las diferentes cepas de GISA ya que entre estas se incluyen cepas con sensibilidad intermedia a la vancomicina y sensibilidad total a la teicoplanina, cepas con sensibilidad intermedia solamente a la teicoplanina y cepas con sensibilidad intermedia a ambos antibióticos. En el caso de ECN se considera una cepa con sensibilidad intermedia a la vancomicina (CLSI) cuando los valores de CMI son de 8-16 mg/L y resistente cuando la CMI es ≥ 32 mg/L. Los criterios de sensibilidad de CLSI y de EUCAST para los glucopéptidos en el género *Staphylococcus* se muestran en la tabla 1. La determinación de la sensibilidad a la vancomicina por difusión con discos está desaconsejada por su falta de capacidad discriminatoria tanto para *S. aureus* como para ECN y de hecho no se han definido puntos de corte en estos casos.

Aunque no existe un consenso general para definir a una cepa de *S. aureus* como heterorresistente (hVISA o *heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*) en general se acepta que una cepa hVISA es aquella frente a la cual la CMI de vancomicina, determinada por microdilución, está en el rango sensible (CMI ≤ 2 mg/L) pero en la que la CMI de vancomicina frente a una proporción de las células de esa población está en el rango intermedio. Algunos estudios han descrito elevados porcentajes de cepas hVISA cuando la CMI de vancomicina es de 2 mg/L, por tanto, un resultado de CMI de vancomicina por sí solo es incapaz de detectar cepas hVISA ya que no distingue adecuadamente

entre hVISA y cepas sensibles a la vancomicina. El método de difusión con discos no sirve para determinar la sensibilidad de los estafilococos a la vancomicina ya que no permite diferenciar las cepas de *S. aureus* o ECN sensibles de aquellas con sensibilidad intermedia ni tampoco aquellas heterorresistentes así como tampoco detecta cepas de ECN resistentes a los glucopéptidos (figura 3).

La presencia de cepas VISA y hVISA se comunicó por vez primera en Japón y posteriormente se aislaron en otras áreas geográficas (Estados Unidos, Europa, Hong Kong, Corea y España). Estas cepas se aíslan con una frecuencia muy baja y generalmente después de un tratamiento prolongado con glucopéptidos. Por otra parte, aunque las cepas de *S. aureus* con una CMI de vancomicina de 4 a 8 mg/L son muy infrecuentes, aquellas con CMI de 2

mg/L son relativamente frecuentes. En un estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos solamente se observó una CMI de vancomicina de ≥ 4 mg/L en el 0,2% (n=520) de las cepas de *S. aureus* mientras que en el 16,2% (n= 39.223) la CMI de vancomicina era de 2 mg/L. En el estudio multicéntrico realizado en 2006 en nuestro país, todas las cepas de *S. aureus* (n= 463) fueron sensibles a la vancomicina (CMI₉₀ ≤ 1 mg/L) y a la teicoplanina (CMI₉₀ ≤ 4 mg/L) y todas las cepas de ECN (n= 403) fueron uniformemente sensibles a la vancomicina (CMI₉₀ ≤ 1 mg/L) pero se detectaron dos cepas con sensibilidad disminuida a la teicoplanina con valores de CMI = 16 mg/L (*S. epidermidis* y *S. haemolyticus*).

Tabla 1. Puntos de corte (CMI, mg/L) definidos por el CLSI y por el EUCAST para vancomicina y teicoplanina frente a *Staphylococcus*

Microorganismo	Antimicrobiano	CLSI (2011)		EUCAST (2011)	
		S	R	S	R
S. aureus	Vancomicina	≤ 2	≥ 16	≤ 2	> 2
	Teicoplanina	≤ 8	≥ 32	$\leq 2^a$	$> 2^a$
ECN	Vancomicina	≤ 4	≥ 32	≤ 2	> 2
	Teicoplanina	≤ 8	≥ 32	≤ 4	> 4

^a Válido también para *S. lugdunensis*

Figura 3. *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina. CMI de vancomicina por Etest: 8 mg/L (la CMI por microdilución es 4 mg/L). Como se ha indicado anteriormente, el empleo del disco de vancomicina está desaconsejado (aparentemente la cepa podría parecer sensible).



La resistencia en las cepas con este fenotipo se debe a alteraciones en la estructura del peptidoglicano que conducen a un engrosamiento de la pared bacteriana, lo que determina un secuestro de las moléculas del glucopéptido impidiendo su unión a los restos D-alanina-D-alanina, diana de actuación de estos antimicrobianos. También se ha descrito que las cepas GISA presentan un aumento de la expresión de la PBP2 y/o de la PBP2a. Las cepas GISA y hGISA reflejan los dos tipos de expresión de la resistencia a los glucopéptidos en *S. aureus* y que también se producen en ECN: a) expresión homogénea (CMI de vancomicina 8-16 mg/L); b) expresión heterogénea (CMI 1-4 mg/L). Las cepas con expresión heterogénea son más frecuentes que las que poseen una expresión homogénea y en ellas la población resistente está presente con una frecuencia de $\leq 10^{-5}$ a 10^{-6} , su detección resulta muy difícil con los métodos estándar habituales en los que se utiliza un inóculo de 5×10^4 UFC por pocillo (método de microdilución) o de 1×10^4 UFC por depósito (método de dilución en agar). Por otra parte, las cepas con el fenotipo de sensibilidad intermedio tienen una escasa estabilidad en ausencia de glucopéptidos, de manera que, con frecuencia, revierten al fenotipo sensible tras sucesivos subcultivos en medios que no contienen glucopéptidos en su composición.

La detección fenotípica de las cepas de estafilococos con resistencia intermedia o con heterorresistencia a los glucopéptidos es difícil y se han evaluado varios métodos para el cribado y la confirmación de este tipo de cepas. En algunas ocasiones, sus características morfológicas son diferentes a las de las cepas sensibles, con apariencia de cultivos mixtos de colonias grandes y pequeñas de pigmentación variable. Se debe determinar la sensibilidad a la vancomicina en cada uno de los diferentes morfotipos, principalmente en el caso de *S. aureus*.

Como se indicó anteriormente, el método de difusión con discos no permite detectar las cepas de estafilococos con sensibilidad disminuida a la vancomicina de aquellas cepas sensibles, incluso tras una incubación de 24 horas (figura 3). Para detectar estas cepas con sensibilidad disminuida a la vancomicina se debe determinar la CMI por dilución en caldo o mediante Etest o bien mediante la inoculación de una placa de agar BHI (*Brain Heart Infusion*) de cribado con 6 mg/L de vancomicina e incubación de 24 horas. Hay que tener en cuenta que las CMIs obtenidas mediante Etest suelen ser siempre una dilución superior a las obtenidas por microdilución y que el método que define a una cepa como VISA o hVISA es el de microdilución. Además y debido a las diferencias en los resultados de CMI según el método por el que ésta se determina, en el informe debe constar el método empleado para la toma de decisiones terapéuticas. Otra alternativa para la detección consiste en utilizar el denominado macrométodo en el que se determina la CMI mediante Etest pero con un inóculo equivalente al 2 de la escala de McFarland. Este método es

solamente una herramienta de cribado para detectar estas cepas pero el resultado obtenido no es la verdadera CMI de vancomicina o de teicoplanina y por tanto los resultados obtenidos con el macrométodo no se deben informar como una verdadera CMI. No obstante, la detección precisa de este fenotipo requiere un análisis poblacional (*population analysis profile*, PAP). Para realizar este análisis la cepa patrón a utilizar es la cepa hVISA Mu3 (*S. aureus* ATCC 700698). Utilizando el PAP como método de referencia se puede detectar el fenotipo hVISA en cepas de *S. aureus* con CMIs de vancomicina tan bajas como 0,5 o 1 mg/L.

En las infecciones graves por *S. aureus*, existe una evidente asociación entre CMIs ≥ 4 mg/L de vancomicina y fracaso terapéutico y entre éste y la detección de cepas heterorresistentes. Muchas de las cepas VISA descritas con una CMI de vancomicina de 8 mg/L se desarrollaron bajo presión selectiva de la vancomicina en pacientes tratados con este antimicrobiano en los que fracasó el tratamiento; sin embargo, debido a la naturaleza inestable de este fenotipo, cuando las cepas se analizan repetidamente en el laboratorio, esta CMI puede descender hasta 1-2 mg/L por lo que es aconsejable determinar la CMI en el primer aislamiento del paciente sin realizar subcultivos previos.

2.7. RESISTENCIA A LA MUPIROCINA

La mupirocina o ácido pseudomónico es un antimicrobiano de uso exclusivamente tópico que se utiliza ampliamente para la descolonización de portadores nasales de *S. aureus*. El porcentaje de cepas resistentes a la mupirocina es superior en cepas de ECN que en *S. aureus*. En España, según los datos de estudios multicéntricos, la resistencia a la mupirocina en ECN está en torno al 40% mientras que en *S. aureus* es del 8-10% y en torno al 20% si se analizan las cepas de SARM. El uso inadecuado de este antimicrobiano ha conducido en algunos centros a porcentajes del 70% de resistencia en cepas de SARM, lo que invalida su utilidad para la descolonización de pacientes infectados por este tipo de aislamientos.

Se pueden observar dos fenotipos de resistencia a la mupirocina: el de resistencia de bajo nivel (CMIs entre 8 y 256 mg/L) y el de alto nivel (CMI ≥ 512 mg/L). La mupirocina actúa inhibiendo la enzima isoleucil t-ARN sintetasa y en consecuencia detiene la síntesis proteica. La resistencia de bajo nivel se debe a mutaciones en el gen cromosómico *ileS*, que codifica la síntesis de la enzima isoleucil t-ARN sintetasa, alterando en consecuencia su centro activo y disminuyendo su afinidad por la mupirocina. La resistencia de alto nivel se debe a la adquisición de un gen adicional, de localización plasmídica (*ileS-2* o *mupA*) que codifica una isoleucil t-ARN sintetasa sin afinidad por la mupirocina. Por tanto, existen dos enzimas diferentes (homología genética del 30%) pero con la misma actividad isoleucil t-ARN sintetasa que contribuyen a la expresión de los dos fenotipos de resistencia. La resistencia de bajo nivel se

desarrolla tras la exposición de cepas de estafilococos a concentraciones crecientes de mupirocina, mientras que la de alto nivel se debe a la transferencia de un plásmido portador del gen *mupA*, gen que está ausente en las cepas con resistencia de bajo nivel.

Aunque el CLSI no ha definido puntos de corte para interpretar la sensibilidad a la mupirocina, en su último documento (2011) establece las técnicas para la detección de cepas con resistencia a este compuesto (≥ 512 mg/L). Para ello indica el uso del disco de 200 μg y/o el empleo de un pocillo que contenga 256 mg/L de mupirocina si se realiza microdilución (condiciones estándar de temperatura y tiempo de incubación). Cualquier halo o la falta de crecimiento indican ausencia de alto nivel de resistencia. EUCAST plantea el uso del disco de 200 μg y los puntos de corte ≥ 30 mm (S) y ≤ 18 mm (R) pero exclusivamente para cepas implicadas en procesos de colonización nasal que requieran descontaminación. Asimismo, diferentes estudios recomiendan que se consideren cepas sensibles si la CMI es ≤ 4 mg/L o el halo de inhibición es ≥ 14 mm

(utilizando discos de 5 μg). En el caso de que mediante la técnica de difusión con el disco de 5 μg la cepa sea resistente (halo < 14 mm) será necesario determinar siempre la CMI mediante el método de microdilución o mediante Etest, ya que un valor de CMI de 8 o de 256 mg/L tiene diferentes implicaciones clínicas. Si no se dispone de estas técnicas se puede utilizar la combinación de discos de mupirocina de 5 μg y de 200 μg o bien utilizar solamente el de 20 μg para determinar si la resistencia es de bajo o de alto nivel como se indica en la tabla 2.

Si una cepa presenta resistencia de bajo nivel a la mupirocina, este antimicrobiano se puede utilizar en la descolonización nasal con pomada de mupirocina al 2% ya que esto supone una concentración de 20.000 mg/L. No obstante, se ha descrito que hay mayor riesgo de fracaso en la descolonización en estos casos que cuando la cepa es sensible a la mupirocina. Cuando la cepa presenta resistencia de alto nivel, el antimicrobiano es ineficaz.

Tabla 2. Fenotipos de resistencia a mupirocina obtenidos mediante el método de difusión con discos (Finlay JE *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1137-9) y su relación con los valores de CMI (mg/L)

	Sensible (mm halo)	Resistencia de bajo nivel (mm halo)	Resistencia de alto nivel (mm halo)
Un disco: (20 μg)	≥ 17	6-16	0
Dos discos: (5 μg) (200 μg)	≥ 14 >6	<14 >6	<14 0
	CMI (mg/L)	CMI (mg/L)	CMI (mg/L)
	≤ 4	8-256	≥ 512

2.8. RESISTENCIA AL LINEZOLID

La resistencia al linezolid es actualmente poco frecuente y generalmente se produce en pacientes con tratamientos prolongados con este antimicrobiano, por diseminación de clones resistentes en unidades hospitalarias o por diseminación de transposones o plásmidos que contienen el gen *cfr*. En el estudio multicéntrico realizado en 2006 en España y previamente descrito, la resistencia al linezolid fue del 0,2% tanto en *S. aureus* (1 cepa) como en los ECN (1 cepa de *S. epidermidis*).

En el laboratorio se pueden observar tres fenotipos de resistencia al linezolid en estafilococos: a) resistencia cruzada al linezolid y a las pleuromutilinas; b) resistencia cruzada al linezolid, los fenicoles, las pleuromutilinas, las lincosamidas y

la estreptogramina A; c) resistencia cruzada al linezolid, los macrólidos y el cloranfenicol.

Estos tres fenotipos se corresponden con los tres tipos de mecanismos de resistencia que han sido descritos para el linezolid y en general para las oxazolidinonas: a) mutaciones nucleotídicas en el dominio V del ARNr 23S (gen *rrn*), muy diversas, pero fundamentalmente Gly2447Thr, Thr2500Ala y Gly2576Thr, siendo esta última la más frecuente. Este es el mecanismo de resistencia más frecuente y los niveles de resistencia aumentan en función del número de copias del gen ARNr 23S afectadas, que suelen ser 5 o 6 en los estafilococos; b) adquisición del gen *cfr* que codifica la producción de una metiltransferasa ribosómica y que confiere resistencia a 5 clases de antimicrobianos (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A; c) mutaciones en los genes que

codifican las proteínas L3 y L4 de la subunidad ribosómica 50S, poco frecuentes y codificadas por los genes *rpIC* y *rpID*, respectivamente. Diversas combinaciones de estos mecanismos pueden coexistir en la misma cepa.

En el primer caso generalmente se observan CMI de linezolid elevadas (>32 mg/L) aunque también pueden ser inferiores dependiendo del número de alelos mutados, pero en el caso de la resistencia mediada por el gen *cfr* algunas cepas pueden presentar CMI en el rango de sensibilidad (≤ 4 mg/L), por ello siempre que se sospecha resistencia al linezolid (CMI en el rango alto de sensibilidad) es necesario analizar conjuntamente los resultados de sensibilidad al resto de los antimicrobianos afectados por este mecanismo. Además, al tratarse de un mecanismo de resistencia transferible, si no se detecta precozmente hay riesgo de transmisión a otras cepas si no se implantan las medidas adecuadas.

El método más adecuado para detectar la resistencia al linezolid es el de microdilución. Los resultados de CMI obtenidos por Etest son generalmente más bajos, principalmente cuando la resistencia está mediada por el gen *cfr* y las CMI pueden ser tan bajas como 1 o 2 mg/L (sensibles). El método de difusión con discos tampoco detecta adecuadamente la resistencia al linezolid, excepto en los casos con alto nivel de resistencia (CMI >32 mg/L). En el caso de resistencia mediada por mutación ribosómica, también hay resistencia a las pleuromutilinas, aunque la dificultad para disponer de estos antimicrobianos en los laboratorios de microbiología no permite determinar la resistencia o sensibilidad a ellos.

En el caso de las cepas resistentes al linezolid mediada por el gen *cfr* es característica la resistencia simultánea a la clindamicina y al cloranfenicol pero la sensibilidad a los macrólidos. Sin embargo, la relativa frecuencia de cepas que presentan dos o tres mecanismos de resistencia diferentes (resistencia al cloranfenicol, resistencia de tipo MLS_B, etc.) dificulta la adecuada detección de resistencia al linezolid mediada por este mecanismo.

La utilización de discos de quinupristina/dalfopristina no ayuda a la detección de este mecanismo puesto que al incluir una estreptogramina A y una estreptogramina B, muchas cepas con el gen *cfr* pueden ser sensibles a la estreptogramina B y por tanto, sensibles a la combinación. Cuando la resistencia está mediada por alteraciones en las proteínas L3 y L4 se produce resistencia cruzada al cloranfenicol y a los macrólidos, pero como ya se indicó anteriormente, debido a la relativa frecuencia de cepas que presentan otros mecanismos de resistencia conjuntos que pueden afectar a la actividad del cloranfenicol o de los macrólidos, es difícil sospechar la presencia de este mecanismo.

3. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ENTEROCOCOS

3.1 RESISTENCIA DE ALTO NIVEL A LA GENTAMICINA Y A LA ESTREPTOMICINA

Los enterococos presentan un mecanismo de resistencia intrínseco de bajo nivel a los aminoglucósidos debido al transporte deficiente de estos antimicrobianos al interior de la bacteria. Esta resistencia se caracteriza por conferir valores de CMI que oscilan entre 4-64 mg/L para la gentamicina y entre 16-256 mg/L para la estreptomicina. Sin embargo, cuando se asocia un aminoglucósido con otro antimicrobiano que actúa a nivel de la pared celular (betalactámico o glucopéptido) se produce un efecto sinérgico de gran utilidad para el tratamiento de infecciones graves producidas por estos microorganismos. No obstante, los enterococos adquieren con facilidad determinantes genéticos asociados a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, lo que conlleva la expresión de altos niveles de resistencia (RAN) a dichos compuestos y la pérdida del efecto sinérgico anteriormente indicado. La incidencia de enterococos con RAN a la gentamicina o a la estreptomicina varía mucho según las localizaciones geográficas y el origen de los aislamientos. En el caso de RAN a la gentamicina, la prevalencia en aislamientos clínicos es moderada-alta (rango según los estudios, 1-65%) y en el caso de España, según los datos del *Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* del 2009, oscila entre el 25% y el 50%. La frecuencia de detección de RAN a la estreptomicina es elevada, con un rango que oscila entre el 25% y 70% según los diferentes estudios.

La RAN a la gentamicina (CMI >500 mg/L) está generalmente asociada a la expresión de la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''), que también afecta a la tobramicina, a la amicacina, a la kanamicina y a la netilmicina pero no a la estreptomicina. La RAN a la gentamicina también puede estar mediada por la expresión de enzimas inusuales como (APH(2'')-Ib, APH(2'')-Id o APH(2'')-Ie, lo que resulta en un fenotipo similar al indicado, pero sin afectación de la amicacina. Asimismo, existen cepas de enterococo resistentes a la gentamicina con valores inferiores de CMI (256 mg/L) debido a la expresión de la enzima APH(2'')-Ic que afecta también a la tobramicina y a la kanamicina pero no a la amicacina ni a la netilmicina. Este último fenotipo es poco frecuente.

La RAN a la estreptomicina (CMI >2.000 mg/L) generalmente se asocia con la expresión de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (ANT(6)-Ia o ANT(2'')-Ia, aunque también puede estar causada ocasionalmente por mutaciones ribosómicas (en este caso el nivel de resistencia es muy elevado, CMI >32.000 mg/L); este último mecanismo se ha detectado sobre todo en mutantes obtenidos *in vitro*.

La expresión simultánea de varias enzimas modificadoras puede dar lugar a un fenotipo de resistencia que incluye a todos los aminoglucósidos de interés clínico.

De lo anteriormente indicado, se puede concluir: 1) Cuando una cepa presenta RAN a la gentamicina, generalmente se asocia con RAN a los otros aminoglucósidos de interés clínico excepto la estreptomina (algunas enzimas, infrecuentes, afectan a la gentamicina y no a la ampicilina o a la netilmicina); 2) La RAN a la estreptomina está causada por un mecanismo independiente del resto de los aminoglucósidos de interés clínico por lo que no existen resistencias cruzadas; 3) Los métodos actualmente aceptados por el CLSI para la detección de RAN a la gentamicina pueden no detectar ciertas cepas portadoras de la enzima APH(2'')-Ic (infrecuente) que confiere bajos niveles de resistencia (CMI 256 mg/L), sin embargo estas cepas se pueden detectar si se utiliza el punto de corte >128 mg/L establecido por EUCAST. Los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglucósidos suelen localizarse en plásmidos transferibles. De este modo, el gen *aac(6')-aph(2'')* se ha detectado en el transposón Tn4001 (y distintas variantes del mismo) y se han descrito cepas de *E. faecalis* con dicho gen en plásmidos relacionados con feromonas, lo que facilita su diseminación ya que éstas favorecen la conjugación. Por otro lado, el gen que codifica la enzima ANT(6)-Ia se ha localizado en el transposón Tn5466 o incluido en plásmidos transferibles asociados a otros genes de resistencia a antimicrobianos.

La detección de la RAN a la gentamicina y a la estreptomina se puede realizar mediante las siguientes técnicas:

1) Difusión con discos de alta carga (gentamicina, 120 µg; estreptomina, 300 µg) en agar Mueller Hinton, con un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland e incubación a 35°C durante 16-18 h (recomendaciones del CLSI). En función del halo de inhibición se establece si la cepa presenta RAN a los aminoglucósidos estudiados y con ello si es factible la sinergia de dichos compuestos con antimicrobianos que actúan a nivel de la pared celular. Si el halo de inhibición es ≤6 mm (tanto para gentamicina como para estreptomina) se considera que hay RAN y que por tanto no existirá sinergismo entre aminoglucósidos y betalactámicos o glucopéptidos. En ocasiones, los resultados de la difusión con disco son poco concluyentes (halos de inhibición en el rango 7-9 mm) lo cual requiere la confirmación con otros métodos como los que se mencionan a continuación:

2) Microdilución en caldo o dilución en agar: se emplea el medio BHI (*brain heart infusión*) al que se añaden 500 mg/L de gentamicina o bien 1.000 o 2.000 mg/L de estreptomina (microdilución en caldo o dilución en agar, respectivamente); tras una incubación durante 24 horas a 35°C, cualquier tipo de crecimiento será indicativo de resistencia y por tanto de ausencia de posible sinergia con agentes activos sobre la pared celular.

3) Curvas de letalidad: permiten determinar la probabilidad de sinergia entre betalactámicos y aminoglucósidos. Es un método laborioso que no se realiza de rutina si bien aporta importante

información sobre la cinética de muerte de las bacterias frente a los antimicrobianos estudiados.

La detección de cepas con el gen *aph(2'')-Ic* puede plantear problemas si se usan los puntos de corte establecidos por el CLSI ya que, como se ha comentado, este mecanismo puede dar lugar a moderados niveles de resistencia a la gentamicina (CMI: 256 mg/L) que no se detectan si se usa una única concentración de gentamicina de 500 mg/L. Hasta la fecha este mecanismo de resistencia es infrecuente pero no hay que descartar que algunas cepas puedan pasar desapercibidas por dicha causa. Esta situación plantea la posibilidad de que en el futuro haya que revisar los puntos de corte del CLSI para la detección de la RAN a gentamicina en *Enterococcus* spp. Según los criterios de EUCAST, la detección de estas cepas se puede realizar utilizando un disco de gentamicina con una carga de 30 µg, y si el halo de inhibición es <8 mm, se considera que la cepa presenta RAN a gentamicina (CMI >128 mg/L).

El tratamiento de infecciones graves por enterococos, particularmente la bacteriemia, la endocarditis y la meningitis, se realiza con la combinación de un aminoglucósido (habitualmente gentamicina o estreptomina) con un antimicrobiano que actúe a nivel de la pared bacteriana (betalactámico o glucopéptido), por ello, la detección de cepas de enterococos implicadas en este tipo de infecciones que poseen RAN a los aminoglucósidos pueden representar un problema terapéutico ante la imposibilidad de conseguir un efecto sinérgico, lo que exigirá la búsqueda de otras alternativas de tratamiento. En el caso de cepas de *E. faecalis* se puede utilizar la combinación de ampicilina con ceftriaxona, que también es sinérgica.

3.2. RESISTENCIA A LOS GLUCOPÉPTIDOS

En el año 1989 se describió por primera vez la resistencia a la vancomicina en el género *Enterococcus* y desde entonces se ha observado un aumento importante de este tipo de cepas resistentes entre los aislamientos clínicos, principalmente en Estados Unidos y sobre todo, en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI). El porcentaje de enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) entre los aislamientos clínicos en Europa es más bajo, aunque variable según los países. De acuerdo con los datos publicados por el EARS-net en 2009, en el caso de España, la resistencia oscilaba entre 1-5% para los aislamientos invasivos de *E. faecium* y era menor de 1% en los de *E. faecalis*, aunque en países como Portugal, Irlanda o Inglaterra los porcentajes eran superiores (10-50%). No obstante, se han descrito brotes epidémicos de ERV en algunos hospitales. Las cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina aisladas en hospitales pertenecen, mayoritariamente, al Complejo Clonal de Alto Riesgo Hospitalario 17 (CC17) que se encuentra diseminado globalmente y que se asocia generalmente a otras resistencias (ampicilina y ciprofloxacino) y a la expresión de ciertos factores de virulencia (proteína

de superficie codificada por el gen *esp* y en algunos casos, la hialuronidasa codificada por el gen *hyl*).

Se han descrito 2 tipos de resistencia a los glucopéptidos en enterococos:

1) **Resistencia intrínseca.** Es propia de las especies *Enterococcus gallinarum* (gen *vanC-1*), *Enterococcus casseliflavus* (gen *vanC-2*) y *Enterococcus flavescens* (gen *vanC-3*). Se caracteriza por conferir bajos niveles de resistencia a la vancomicina (CMI 2-32 mg/L) según los criterios del CLSI (ver tabla 3). Asimismo estas cepas son sensibles a la teicoplanina (CMI 0,5-2 mg/L) según estas normas. Estos genes se localizan en el cromosoma bacteriano y no son transferibles por lo que tienen escasa trascendencia epidemiológica y clínica. Estas especies son las únicas que son móviles en el género *Enterococcus*, por lo que esta característica permite diferenciarlas.

2) **Resistencia adquirida.** Se han descrito 6 fenotipos diferentes (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, y VanL) mediados por los *cluster* de genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, y *vanL* respectivamente. Los fenotipos VanA y VanB son los más frecuentes, mientras que VanD, VanE, VanG y

VanL son infrecuentes y no se han detectado hasta la fecha en España.

El fenotipo VanA se caracteriza por presentar elevados niveles de resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina (CMI 16-1.024 mg/L), es de carácter inducible (por parte de vancomicina y teicoplanina) y es el más frecuente entre los aislamientos clínicos de enterococos resistentes a la vancomicina (figura 4). En los últimos años se ha observado la aparición del fenotipo VanB (principalmente el mediado por el *cluster* de genes *vanB2*, ya que se han diferenciado también los *clusters* de genes *vanB1* y *vanB3*) y que se ha detectado en varios hospitales españoles con una frecuencia similar a la del fenotipo VanA. El fenotipo VanB se caracteriza por presentar moderados niveles de resistencia a la vancomicina, CMI 4-32 mg/L y sensibilidad a la teicoplanina (CMI 0,5-1 mg/L) aunque se han descrito cepas con altos niveles de resistencia a la vancomicina (CMI 1.024 mg/L). El fenotipo VanB es inducible por vancomicina y se han descrito fracasos terapéuticos en pacientes infectados por estas cepas que han sido tratados con teicoplanina, por lo que deberían informarse como resistentes (figura 5).

Figura 4. Cepa de *Enterococcus faecium* con el fenotipo VanA.



Figura 5. Cepa de *Enterococcus faecalis* con el fenotipo VanB. A) Imagen izquierda. Se observa sensibilidad intermedia a la vancomicina (CMI 8-16 mg/L) y la presencia de colonias dentro del halo tras 24 h de incubación debido a la inducción del gen *vanB* por el antimicrobiano. B) Imagen derecha. Utilizando luz transmitida se observa un halo de inhibición a la vancomicina (15-16 mm, sensibilidad intermedia) en cuyo interior hay un crecimiento tenue. En este caso se requiere la determinación de la CMI de vancomicina y teicoplanina (por microdilución o Etest) para la confirmación del fenotipo VanB ya que no es posible definirlo mediante el método de difusión con discos.



Los fenotipos VanD, VanE, Van F, VanG y VanL confieren asimismo bajos niveles de resistencia a la vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina. En ocasiones se han detectado discrepancias fenotipo-genotipo en la resistencia a la vancomicina (por ejemplo genotipo *vanA* y fenotipo VanB/VanD) relacionadas con modificaciones en el sistema de regulación del *cluster* de genes *vanA* o bien a nivel del gen *vanY*.

La vancomicina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular al unirse al extremo D-alanina-D-alanina del precursor pentapéptido del peptidoglicano. El fenotipo VanA resulta de la expresión del *cluster* de genes *vanA* que da lugar a la formación de un precursor del peptidoglicano modificado (D-Ala-D-Lac) por el que la vancomicina tiene escasa afinidad de unión y que permite a la bacteria continuar con la síntesis de su pared celular. El *cluster* de genes *vanA* asociado a este fenotipo se detecta en el transposón Tn1546 o en sus múltiples variantes que a su vez se localizan en plásmidos transferibles y ocasionalmente, en el cromosoma, formando parte de grandes elementos conjugativos. El mecanismo mediado por *vanB* (del que se han descrito 3 subtipos: *vanB1*, *vanB2* y *vanB3*) da lugar asimismo a un precursor modificado del peptidoglicano (D-Ala-D-Ser) por el que la vancomicina posee escasa afinidad. El *cluster vanB* se localiza generalmente en el cromosoma, aunque también lo hace en plásmidos y puede transferirse por conjugación asociado a grandes elementos genéticos (de 90 a 250 Kb). Se ha localizado en los transposones Tn1547 o Tn5382/Tn1549 (*vanB1* o *vanB2*, respectivamente).

En el laboratorio la detección del fenotipo VanA es sencilla, sin embargo, existen algunos problemas para la detección de los otros fenotipos (VanB a VanL) por los bajos niveles de resistencia a la vancomicina que pueden conferir (a veces en la categoría de sensibles). En estos casos es importante la detección del mecanismo de resistencia mediante técnicas de PCR con cebadores específicos.

Los métodos fenotípicos que se emplean para detectar la resistencia a glucopéptidos en enterococos incluyen: a) Difusión con discos en medio agar Mueller Hinton. Este método tiene bajo poder discriminatorio, sobre todo con los valores intermedios de CMI, 8-16 mg/L y su realización debe evitarse siempre que sea posible. La lectura del antibiograma se debe hacer a las 24 h completas de

incubación y con luz transmitida, considerando como resistente la presencia de cualquier crecimiento o velo dentro del halo de inhibición. En caso de duda debe realizarse la determinación de las CMIs de vancomicina y de teicoplanina mediante métodos de dilución o mediante Etest (ver figura 5).

b) Microdilución y dilución en agar. Para ello se utiliza el medio Mueller Hinton suplementado con cationes (Ca^{+2} y Mg^{+2}), un inóculo estándar (0,5 de la escala McFarland) e incubación de 24 h a $35\pm 2^{\circ}C$.

c) Método de cribado. El CLSI recomienda el uso de una placa de agar BHI con 6 mg/L de vancomicina, un inóculo de 10^5 - 10^6 UFC/depósito (1-10 μ l de un inóculo equivalente al 0,5 Escala McFarland) y una incubación de 24 h a $35\pm 2^{\circ}C$. La detección de más de 1 colonia, de un ligero o de un claro crecimiento son indicativos de resistencia a la vancomicina.

d) Empleo de medios de agar cromogénico comercializados para el aislamiento selectivo de cepas de enterococo resistentes a la vancomicina que permiten realizar estudios de vigilancia epidemiológica.

La detección de cepas de *Enterococcus* spp. con mecanismos de resistencia adquirida a glucopéptidos tiene un gran interés tanto desde el punto de vista clínico como epidemiológico. Es importante diferenciar claramente las cepas con un mecanismo intrínseco de resistencia no transferible a la vancomicina (especies *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*/*E. flavescens*) de aquellas cepas de enterococo, fundamentalmente *E. faecium* y *E. faecalis*, con mecanismos adquiridos, generalmente transferibles por conjugación y por tanto con gran interés clínico y epidemiológico. Se debe tener en cuenta que los glucopéptidos pueden estar indicados en asociación con aminoglucósidos para el tratamiento de infecciones graves por enterococos en pacientes en los que no sea posible el uso de betalactámicos. Además, las cepas de enterococo portadoras de los mecanismos de resistencia *vanA* o *vanB2* con mucha frecuencia son también resistentes a otros antimicrobianos no glucopeptídicos como son los aminoglucósidos (alto nivel de resistencia), los betalactámicos o el ciprofloxacino, lo que dificulta la búsqueda de alternativas terapéuticas. En la tabla 3 se indican los puntos de corte definidos por el CLSI y por el EUCAST para vancomicina y teicoplanina frente a enterococos.

Tabla 3. Puntos de corte (CMI, mg/L) definidos por el CLSI y por el EUCAST para vancomicina y teicoplanina frente a enterococos

Microorganismo	Antimicrobiano	CLSI (2011)		EUCAST (2011)		
		S	R	S	R	ECOFF ^a
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomicina	≤4	≥32	≤4	>4	≤4
	Teicoplanina	≤8	≥32	≤2	>2	2 ^b

^a Punto de corte epidemiológico

^b Para *E. faecalis* y *E. faecium*

4. RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN *Streptococcus pneumoniae*

4.1. RESISTENCIA A LOS BETA-LACTÁMICOS

Los antimicrobianos betalactámicos, particularmente la penicilina, la amoxicilina y las cefalosporinas de tercera generación, son ampliamente utilizados para el tratamiento de las infecciones neumocócicas. En España, la tasa de resistencia a la penicilina aumentó progresivamente desde el 6% en 1979 hasta un máximo de 44% a finales de la década de 1980, oscilando entre el 34% y el 44% en la década de 1990. Tras la introducción de la vacuna neumocócica conjugada heptavalente, el porcentaje de resistencia ha disminuido progresivamente hasta un 22% en 2008, y un 27% en 2009 según los datos del EARS-net, al igual que lo que se ha observado en Estados Unidos y en otros países en los que se ha introducido esta vacuna.

En Estados Unidos, en 1987, se detectaron las primeras cepas de *S. pneumoniae* resistentes a la penicilina, aumentando hasta el 25% de los aislamientos invasivos en 1997. Los estudios de vigilancia mundiales mostraron un aumento significativo de la resistencia a la penicilina en las décadas de 1990 y de 2000. Los mayores porcentajes de resistencia a la penicilina se encuentran en Sudáfrica, el Sudeste Asiático y el Extremo Oriente. En Europa, los datos de EARS-net indican que la mayoría de los países del norte de Europa tienen tasas de resistencia a la penicilina inferiores al 5%, mientras que los del sur superan el 25%.

La resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina se debe a cambios estructurales en las dianas, las proteínas fijadoras de penicilina (*penicillin-binding proteins*, PBPs). Las principales PBPs implicadas en la resistencia a los betalactámicos son las PBP 1a, 2b y 2x. Los genes que las codifican tienen una estructura en mosaico, ya que una parte de ellos ha sido reemplazada por variantes alélicas de genes de otras cepas de *S. pneumoniae* o de estreptococos del grupo *viridans*.

La resistencia a la penicilina ocurre de manera gradual, de forma que la acumulación de cambios en diferentes dianas confiere valores más altos de CMI de los betalactámicos. Las alteraciones en las PBPs 2b y 2x confieren resistencia de bajo nivel a la penicilina. Los cambios en la PBP 1a confieren resistencia de alto nivel a la penicilina en aquellos aislamientos que tienen alterada la PBP 2x o las dos (PBP 2b y PBP 2x). Las cefalosporinas de tercera generación no se unen a la PBP 2b por lo que la resistencia a estos compuestos se debe a cambios en las PBPs 2x y 1a. Los neumococos resistentes a la penicilina presentan menor afinidad por los otros antimicrobianos betalactámicos.

Las cepas con CMI de penicilina $\geq 0,12$ mg/L se asocian a fracasos en el tratamiento de la meningitis neumocócica ya que los niveles alcanzados en líquido cefalorraquídeo con dosis estándar de penicilina son bajos. Por este motivo, el CLSI estableció los puntos de corte considerados "clásicos" para la penicilina (sensible $\leq 0,06$ mg/ml,

resistencia intermedia 0,12-1 mg/L y resistente ≥ 2 mg/L) a finales de la década de 1970. Sin embargo, la neumonía y otras infecciones no-meníngeas causadas por aislamientos con CMI de penicilina entre 0,12 y 2 mg/L se pueden tratar con éxito con penicilina parenteral, amoxicilina o cefalosporinas. Así, en 2002, se revisaron los puntos de corte de ceftriaxona y de cefotaxima distinguiendo entre infección meníngea (sensible CMI $\leq 0,5$ mg/L; resistencia intermedia CMI =1 mg/L; resistente CMI ≥ 2 mg/L) e infección no meníngea (sensible CMI ≤ 1 mg/L; resistencia intermedia CMI =2 mg/L; resistente CMI ≥ 4 mg/L). En el año 2008 el CLSI modificó los puntos de corte de penicilina en función del tipo de infección y de la vía de administración y estos valores se mantienen actualmente. Los puntos de corte de penicilina parenteral en infección no meníngea son: sensible CMI ≤ 2 mg/L; resistencia intermedia CMI =4 mg/L; resistente CMI ≥ 8 mg/L, mientras que en la infección meníngea los aislamientos con CMI de penicilina $\geq 0,12$ mg/L se consideran resistentes.

Las cepas sensibles a la penicilina ($\leq 0,06$ mg/L) lo son también al resto de los antimicrobianos betalactámicos utilizados en el tratamiento de la infección neumocócica. La utilización de los discos de penicilina (10 U) está totalmente desaconsejada para determinar la sensibilidad de *S. pneumoniae* frente a este antimicrobiano. La utilización de discos de cefotaxima, ceftriaxona o cefepima también está desaconsejada. El cribado por difusión con discos de oxacilina (1 μ g) se considera el mejor método para detectar las CMIs de penicilina con valores superiores a 0,06 mg/L. La sensibilidad a la oxacilina implica sensibilidad a todos los betalactámicos.

En la actualidad, utilizando los puntos de corte meníngeos, el 75-80% de las cepas de *S. pneumoniae* que causan infección sistémica son sensibles a la penicilina y el 95-98% son sensibles a la cefotaxima. Si se aplican los criterios no meníngeos, en el momento actual en España el 95-98% de las cepas invasivas son sensibles a la penicilina (CMI ≤ 2 mg/L) y el 99% son sensibles a la cefotaxima (CMI ≤ 1 mg/L).

4.2. RESISTENCIA A LAS FLUOROQUINOLONAS

Las nuevas fluoroquinolonas, principalmente levofloxacino, se utilizan ampliamente para el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad debido a la mejora de su actividad antineumocócica respecto a ciprofloxacino. Sin embargo, el aumento del consumo de estos compuestos se ha relacionado con la aparición de resistencia en esta especie. En nuestro país, al igual que en otros países europeos, la resistencia de *S. pneumoniae* a ciprofloxacino es inferior al 5%. La resistencia es más frecuente en pacientes mayores de 65 años, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y que han recibido tratamientos previos con fluoroquinolonas. Recientemente también se ha observado un aumento de la resistencia a fluoroquinolonas en neumococos pertenecientes al

serotipo 8 en pacientes infectados por el VIH en algunas áreas geográficas de España. En Canadá, el aumento del consumo de fluoroquinolonas se asoció al incremento de la resistencia de *S. pneumoniae* a ciprofloxacino, de 0,6% en 1998 a 7,3% en 2006.

El principal mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* es debido a las mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDRs) tanto de la ADN topoisomerasa IV (ParC y ParE) que es la diana primaria, como de la ADN girasa (GyrA y GyrB) que es la diana secundaria. La resistencia también puede adquirirse por recombinación interespecies con estreptococos del grupo *mitis*, sin embargo este mecanismo es poco frecuente.

Las mutaciones puntuales en la diana primaria [ParC (Ser79, Ser80 o Asp83) o ParE (Asp435)] confieren resistencia de bajo nivel a ciprofloxacino con CMI entre 4-16 mg/L. Las CMI de levofloxacino de estas cepas oscilan entre 1 y 4 mg/L, siendo hasta el 85% de ellas consideradas como sensibles a este antimicrobiano utilizando los puntos de corte del CLSI. Los cambios en las dos QRDRs [topoisomerasa IV (ParC y/o ParE) y ADN girasa (GyrA, Ser81 y Glu85)] confieren resistencia de alto nivel a ciprofloxacino (CMI ≥ 16 mg/L) y las cepas que poseen estos cambios son siempre resistentes a levofloxacino (CMI ≥ 8 mg/L).

La descripción de fracasos terapéuticos durante el tratamiento con fluoroquinolonas de pacientes infectados con cepas de *S. pneumoniae* “aparentemente sensibles” a levofloxacino (CMI =2 mg/L) se asocia con cepas con mutaciones de primer nivel en ParC. Estas cepas desarrollan mutaciones en *gyrA* en el curso del tratamiento lo que confiere alto nivel de resistencia a las fluoroquinolonas. Por tanto, la detección de las cepas que presentan mutaciones de primer nivel es importante para evitar fallos en el tratamiento antimicrobiano. El último documento de EUCAST (2011) indica que las cepas

salvajes de *S. pneumoniae* no se deben considerar sensibles a ciprofloxacino y por lo tanto se deben categorizar como de “sensibilidad intermedia” a esta fluoroquinolona. El CLSI nunca ha incluido a ciprofloxacino entre los antimicrobianos cuya sensibilidad debe estudiarse en el antibiograma de *S. pneumoniae* (tabla 4).

El valor de CMI de ciprofloxacino de 4 mg/L propuesto por Chen y cols. es el más utilizado para detectar cepas con mutaciones de primer nivel. Por otro lado, el *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (SFM, 2010) recomienda la utilización de discos de norfloxacino (5 μ g) como método de cribado para detectar cepas de neumococo con mutaciones de primer nivel, utilizando como punto de corte de resistencia a aquellos halos de <10 mm. En nuestra experiencia, utilizando estos discos de norfloxacino el punto de corte de <10 mm tiene una sensibilidad superior al 97% y una especificidad del 88% para la detección de cepas con mutaciones que confieren resistencia a las fluoroquinolonas (datos no publicados de los autores).

El cribado inicial de cepas con mutaciones de primer nivel que confieren bajo nivel de resistencia a las fluoroquinolonas puede hacerse fácilmente por la técnica de difusión con disco. El medio utilizado es el agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero y se requiere una incubación de 20-24 h en atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. Esta técnica puede realizarse directamente a partir de las botellas de hemocultivo con crecimiento positivo en las que se sospeche la presencia de *S. pneumoniae*. El principal inconveniente es la posibilidad de obtener falsa resistencia (halos inferiores a 10 mm) en aquellas cepas con fenotipo mucoso como son las del serotipo 3.

Tabla 4. Puntos de corte (CMI, mg/L) para ciprofloxacino y levofloxacino frente a *Streptococcus pneumoniae*

Microorganismo	Antimicrobiano	SFM ^a (2010)		CLSI (2011)		EUCAST ^b (2011)		
		S	R	S	R	S	R	ECOFF ^c
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Norfloxacino ^{a, b}	-	-	-	-	-	-	-
	Ciprofloxacino	ND	ND	ND	ND	$\leq 0,12$ ^d	>2	≤ 2
	Levofloxacino	≤ 2	>2	≤ 2	≥ 8	≤ 2	>2	≤ 2

^{a, b} Disco de 5 μ g, sólo como cribado de sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas (halo <10 mm); CMI de norfloxacino >16 mg/L también indica sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas.
^c Punto de corte epidemiológico (*Epidemiological cut-off value*)
^d “Las cepas salvajes de *S. pneumoniae* no se consideran sensibles a ciprofloxacino y se categorizan como de “sensibilidad intermedia”
 ND: no definido

5. BIBLIOGRAFÍA

5.1. BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe (www.ecdc.europa.eu) 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. Document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; vol. 31 n^o1. Wayne, PA
3. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010). (<http://www.sfm.asso.fr/publi/general.php?pa=1>).
4. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011.
5. Torres C, Cercenado E. 2010. Lectura interpretada del antibiograma en cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 28:541-53.

5.2. BIBLIOGRAFÍA ESTAFILOCOCOS

1. Besier S, Ludwig A, Zander J, Brade V, Wichelhaus TA. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1570-1572.
2. Boyle-Vabra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:272-277.
3. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:781-791.
4. Cheng M, Antignac A, Kim C, Tomasz A. Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2709-2717.
5. Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E, y Grupo español para el estudio de estafilococos. *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enf Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26:269-277.
6. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1137-1139.
7. Ge Y, Biek D, Talbot GH, Sahn DF. In vitro profiling of ceftaroline against a collection of recent bacterial isolates from across the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:3398-3407.
8. Gilbert J, Perry CR, Slocombe B. High-level mupirocin resistance in *S. aureus*: evidence for two distinct isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37:32-38.
9. Hong T, Li X, Wang J, Sloan C, Cicogna C. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3277-3280.
10. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:99-139.
11. Ida T, Okamoto R, Schimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of

- methicillin-resistant *S. aureus* in Japan. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3115-3121.
12. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cf*r among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:1156-1163.
13. Kernodle DS, Stratton CS, McMurray LW, Chipley JR, McGraw PA. Differentiation of beta-lactamase variants in *Staphylococcus aureus* by substrate hydrolysis profiles. *J Infect Dis.* 1989; 159:103-108.
14. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:482-492.
15. Lelievre H, Lina G, Jones ME, Olive C, Forey F, Roussel-Delvallez M, et al. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3452-3457.
16. Liñares J. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect.* 2001; (Suppl) 4:8-15.
17. Locke JB, Hilgers M, Shaw KJ. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:5265-5274.
18. Massida O, Montanari MP, Valardo PE. Evidence for a methicillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 92:223-227.
19. McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coincided by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol.* 2001; 183:6862-6868.
20. Medeiros AA. Beta-lactamases. *Br Med Bull.* 1984; 40:18-27.
21. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:727-737.
22. Nannini EC, Stryjewski ME, Singh KV, Rude TH, Corey GR, Fowler VC Jr, Murray BE. Determination of an inoculum effect with various cephalosporins among clinical isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2206-2208.
23. Rowland SJ, Dyke KGH. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 1990; 4:961-975.
24. Siberry GK, Tekle T, Carroll D, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *S. aureus* expressing inducible clindamycin resistance *in vitro*. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:1257-1260.
25. Sierra-Madero JG, Knapp C, Karaffa C, Washington JA. Role of beta-lactamase and different testing conditions in oxacillin-borderline-susceptible staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32:1754-1757.
26. Swenson JM, Brasso WB, Ferraro MJ, Hardy DJ, Knapp CC, McDougal LK, Reller LB, Sader HS, Shortridge D, Skov R, Weinstein MP, Zimmer BL, and Patel JB. Detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci by broth microdilution using erythromycin-clindamycin combination wells. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3954-3957.
27. Swenson JM, Tenover FC, and the Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3818-3823.
28. Tenover FC, Moellering RC, Jr. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive

criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 2007; 44:1208-1215.

29. Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother. 1989; 33:1899-1874.

30. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2001; 358:207-208.

5.3. BIBLIOGRAFÍA ENTEROCOCOS

1. Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008; 6:637-655.

2. Cattoir V, Leclercq R. Enterococci resistant to glycopeptides. Med Sci (Paris). 2010; 26:936-942.

3. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:S25-S34

4. Chow, J.W. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin. Infect. Dis. 2000; 31:586-589.

5. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine, 1991. Victor Lorian. 3ª edición. Pags.: 441-444.

6. Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garrajosa P, Coque TM, Peixe L. Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings. Appl Environ Microbiol. 2009; 75:4904-4907.

7. Gavalda J, Len O, Miró JM, Muñoz P, Montejo M, Alarcón A, et al. Brief communication: treatment of *Enterococcus faecalis* endocarditis with ampicillin plus ceftriaxone. Ann Intern Med. 2007; 146:574-579.

8. Mazuski JE. Vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors, surveillance, infections, and treatment. Surg Infect. 2008; 9:567-571.

9. Peterson JF, Doern CD, Kallstrom G, Riebe KM, Sander T, Dunne WM Jr, Ledebor NA. Evaluation of Spectra VRE, a new chromogenic agar medium designed to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2010; 48:4627-4629.

10. Rodríguez-Baño J, Ramírez E, Muniain MA, Santos J, Joyanes P, González F, García-Sánchez M, Martínez-Martínez L. Colonization by high-level aminoglycoside-resistant enterococci in intensive care unit patients: epidemiology and clinical relevance. J Hosp Infect. 2005; 60:353-359.

11. Torres C, Escobar S, Portillo A, Torres L, Rezusta A, Ruiz-Larrea F, Revillo, M.J., Aspiroz, C, Zarazaga, M. Detection of clonally related *vanB2*-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. J. Med. Microbiol. 2006; 55:1237-1243.

12. Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecón MA, Ortega M, Coque TM, García M, Saéz-Nieto JA. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2009; 63:17-20.

5.4. BIBLIOGRAFÍA *Streptococcus pneumoniae*

1. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, Hoban DJ, Zhanel GG. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:198-207.

2. Chen DK, McGeer A, De Azavedo JC, Low DE. Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. 1999. N Engl J Med. 341:233-239.

3. de la Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, Fenoll A, Pérez-Trallero E, Liñares J; Spanish Pneumococcal Infection Study Network G03/103. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. Emerg Infect Dis. 2004; 10:1751-1759.

4. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Giménez MJ, Aragoneses-Fenoll L, Hanquet G, Casal J, Tarragó D. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. J Clin Microbiol. 2009; 47:1012-1020.

5. Fenoll A, Aguilar L, Giménez MJ, Vicioso MD, Robledo O, Granizo JJ, Coronel P. Susceptibility of recently collected Spanish pneumococci nonsusceptible to oral penicillin from serotypes not included in the 7-valent conjugate vaccine. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:2696-2698.

6. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähner D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist. 1999; 5:91-99.

7. Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36:197-204.

8. Karnezis TT, Smith A, Whittier S, Haddad J, Saiman L. Antimicrobial resistance among isolates causing invasive pneumococcal disease before and after licensure of heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. PLoS One. 2009; 4:e 5965.

9. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. Clin Microbiol Infect. 2010; 16:402-410.

10. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. Impact of new Clinical Laboratory Standards Institute *Streptococcus pneumoniae* penicillin susceptibility testing breakpoints on reported resistance changes over time. Microb Drug Resist. 2011; 1:47-52.

11. Reinert RR. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009; Suppl. 3:7-11.

12. Sanz JC, Cercenado E, Marín M, Ramos B, Ardanuy C, Rodríguez-Avial I, Bouza E. Multidrug-resistant pneumococci (serotype 8) causing invasive disease in HIV+ patients. Clin Microbiol Infect 2011; [Epub ahead of print].

13. Simoens S, Verhaegen J, Laekeman G, Peetermans WE. Treating respiratory tract infections in ambulatory care in Belgium: fluoroquinolone consumption and resistance development. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26:62-68.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT- MRP- 01
DETECCIÓN DE BETALACTAMASA en *Staphylococcus* y *Enterococcus*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
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 del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de Betalactamasa en <i>Staphylococcus</i> y <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este PNT es la descripción del procedimiento de detección rápida de la producción de betalactamasa (penicilinas) por microorganismos de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus* a partir de colonias en cultivo puro.

2. FUNDAMENTO

La betalactamasa es una enzima que modifica e inactiva las penicilinas. Si un microorganismo la produce, indica que éste es resistente a todas las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina). Para su detección se utilizan discos impregnados con una cefalosporina cromogénica (nitrocefina) que en presencia de una betalactamasa se hidroliza y debido al cambio en la configuración de electrones se obtiene un producto coloreado (figura 1).

Figura 1. Prueba de detección de beta-lactamasa. Resultado: Izquierda: negativo; derecha: positivo



3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad del laboratorio de Microbiología
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S21. Vol. 31;nº1. (Se utilizará el documento vigente correspondiente)
- Folleto informativo del fabricante

4. MUESTRAS

Cepas de microorganismos de los géneros *Staphylococcus* o *Enterococcus* en cultivo puro en medios de agar sangre o agar chocolate en los que se requiera la determinación de esta prueba.

La detección de producción de penicilinas estafilocócica requiere la inducción previa con penicilina, por tanto, previamente se debe realizar un antibiograma en medio Mueller Hinton con un disco de 10 unidades de penicilina (inóculo de 0,5 de la escala de McFarland e incubación de 18-20 h a 35-37°C) para realizar la prueba a partir de las colonias crecidas en el borde del halo de inhibición de la penicilina. En el caso del género *Enterococcus* no es necesario realizar esta inducción previa.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agar Mueller Hinton
- Discos de nitrocefina (Cefinase BBL 231650)
- Tubos con agua estéril
- Discos de penicilina de 10 unidades

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de cultivos
- Portaobjetos
- Pinzas
- Pipeta Pasteur estéril
- Asas de cultivo

7. PROCEDIMIENTO

1. Con la ayuda de las pinzas previamente flameadas y frías depositar un disco de nitrocefina sobre un portaobjetos.
2. Humedecer el disco con agua estéril utilizando la pipeta Pasteur.
3. Recoger con un asa de cultivo varias colonias del borde del halo de inhibición de la penicilina, depositarlas sobre el disco de nitrocefina y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Como se indicó anteriormente, en el caso de microorganismos del género *Enterococcus* no es necesario inducir previamente con penicilina por lo que se pueden tomar colonias crecidas en medio de agar sangre o agar chocolate.
4. Observar si existe un cambio de color. La aparición de un color rojo indica un resultado positivo, es decir, que el microorganismo produce betalactamasa y por tanto, es resistente a todas las penicilinas sensibles a las penicilinasas (Figura 1).

Control de calidad:

Se debe realizar con cada lote. Se utilizarán cepas control no productoras y productoras de betalactamasa: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (no produce betalactamasa) y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (produce betalactamasa).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Al finalizar la determinación se anota si el resultado es positivo (color naranja-rojo) o negativo (ausencia de cambio de color). La producción de penicilinas en una cepa de estafilococo (o de enterococo) implica resistencia a todas las penicilinas.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización de la técnica.

El facultativo será el responsable de la validación del informe.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los microorganismos del género *Staphylococcus* producen pequeñas cantidades de betalactamasa que en ocasiones pueden no detectarse con este método si no se ha realizado una inducción previa. Es conveniente que el inóculo bacteriano que se deposita en el disco sea grande y no se debe descartar la positividad antes de transcurridos 15 minutos.

En el caso del género *Enterococcus*, se debe realizar la prueba de betalactamasa al menos a todas las cepas productoras de bacteriemia, incluso a las sensibles a la ampicilina, ya que en las escasas cepas productoras de

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de Betalactamasa en <i>Staphylococcus</i> y <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

betalamasa descritas, la CMI de ampicilina era de 2-4 mg/L (sensible).

Es aconsejable utilizar un gran inóculo bacteriano tanto en el caso de estafilococos como de enterococos, ya que puede haber falsos negativos si se utilizan inóculos bajos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Pueden producirse falsos negativos con microorganismos del género *Staphylococcus*, incluso cuando se utiliza un inóculo bacteriano grande, por lo que siempre es necesario inducir la producción de la enzima en este género antes de realizar la prueba.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). 1999. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
2. Medeiros AA. Beta-lactamases. Br Med Bull 1984; 40:18-27.
3. Rowland SJ, Dyke KGH. Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1990; 4:961-975.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a la meticilina y a antimicrobianos MLS_B en estafilococos	PNT-MRP-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir los métodos utilizados para realizar el estudio de la sensibilidad a meticilina y a los antimicrobianos del grupo MLS_B (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B) en cepas del género *Staphylococcus*.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que realicen pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

2. FUNDAMENTO

En los estafilococos, la resistencia a la meticilina se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los betalactámicos. La expresión de esta resistencia en los estafilococos puede ser homogénea o heterogénea. En el caso de que sea heterogénea, su detección en el laboratorio requiere unas condiciones de cultivo e incubación específicas o la realización del antibiograma con antimicrobianos que actúen como marcadores de esta resistencia (cefoxitina). En el caso de la resistencia a macrólidos y lincosamidas esta resistencia puede ser constitutiva y expresar resistencia a todos los antimicrobianos del grupo MLS_B o inducible y solamente manifestarse en presencia de un inductor, por tanto es necesario realizar siempre el antibiograma de clindamicina en presencia de un inductor (eritromicina).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el Laboratorio de Microbiología.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement*. M100-S21. Vol. 31; n° 1. (Se utilizará el documento vigente correspondiente).
- EUCAST *Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1*. Abril 2008. (<http://www.EUCAST.org>)
- EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). *Clinical breakpoints-bacteria version 1.3*. Enero 2011. (Se utilizará el documento vigente correspondiente)

4. MUESTRAS

Microorganismos:

Cepas del género *Staphylococcus* en cultivo puro en medios de agar sangre o agar chocolate en los que se requiera la realización de pruebas de sensibilidad (antibiograma) a la meticilina y a los antimicrobianos del grupo MLS_B.

Para la realización del antibiograma la cepa debe proceder, preferentemente, de un cultivo puro de 18-24 horas de incubación como máximo.

Se requiere realizar una suspensión bacteriana con una turbidez del 0,5 de la escala estándar de McFarland.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Escala de turbidez de McFarland o sistema similar.
- Placas con medio de Mueller Hinton agar
- Tubos con caldo de Mueller Hinton ajustado con cationes y tubos con caldo suplementados con NaCl al 2% o sistema comercial similar.
- Discos de antimicrobianos
- Tubos con agua destilada estéril
- Asas de cultivo estériles
- Torundas estériles
- Regla para medir los halos de inhibición

6. APARATOS Y MATERIALES

- Estufa de 37°C, atmósfera aerobia
- Nevera
- Dispensador de discos o pinzas previamente flameadas y frías.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA METICILINA

7.1.1. Procedimiento operativo. Preparación del inóculo bacteriano: realizar una suspensión del microorganismo en un tubo con agua destilada estéril o con solución salina hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland.

Siembra: introducir una torunda dentro de la suspensión y al retirarla, rotar varias veces contra la pared del tubo con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Inocular completamente las placas de Mueller Hinton: para ello debe deslizarse la torunda por la superficie del agar tres veces, en tres direcciones distintas y por último pasarla por la periferia del agar, para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar la superficie inoculada.

- Con la ayuda de un dispensador o de pinzas, depositar un disco de oxacilina de 1 µg y otro de cefoxitina de 30 µg, separados, sobre la superficie inoculada y dejar unos minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del antimicrobiano.
- Incubar en estufa a temperatura no superior a 35°C durante 24 horas completas en atmósfera aerobia.

Lectura de los resultados: la lectura de los halos de inhibición se realiza con la ayuda de una regla.

7.1.2. Controles de calidad. Cada lote nuevo de placas debe estudiarse con cepas patrón de sensibilidad conocida. El CLSI recomienda utilizar las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 en el caso del agar Mueller Hinton. Los resultados deben comprobarse con los valores admitidos por el CLSI. La cepa *S. aureus* ATCC 25923 también sirve para el control de los discos de oxacilina y cefoxitina (sensible a ambos). Además se debe utilizar la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (*mecA* positiva, resistente a ambos).

Las cepas patrón se pueden mantener durante 2-4 semanas a 4-8°C en tubos con agar tripticasa de soja; para almacenamiento a largo plazo se deben mantener liofilizadas o congeladas.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a la meticilina y a antimicrobianos MLS_B en estafilococos	PNT-MRP-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

7.1.3. Detección de resistencia a la meticilina por el método de microdilución en caldo. Cuando se determina la sensibilidad por el método de microdilución en caldo, generalmente se utilizan métodos comerciales, se deben seguir las instrucciones del fabricante e incluir los correspondientes controles de calidad requeridos. Cuando se realiza este método, la detección de la resistencia a la meticilina requiere el uso de caldo Mueller Hinton con concentración ajustada de cationes, tanto si el antimicrobiano utilizado es la oxacilina como si es la cefoxitina y además debe contener NaCl al 2% en el caso de oxacilina. La incubación debe ser de 24 horas completas a una temperatura no superior a 35°C.

7.1.4. Controles de calidad. Además de los indicados en el apartado 7.1.2. se debe utilizar adicionalmente la cepa *S. aureus* ATCC 29213 (*mecA* negativa, sensible a oxacilina y a cefoxitina).

7.2. DETECCIÓN DE RESISTENCIA INDUCIBLE A LA CLINDAMICINA

7.2.1. Procedimiento operativo. Preparación del inóculo bacteriano: realizar una suspensión del microorganismo en un tubo con agua destilada estéril o con solución salina hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland.

Siembra: introducir una torunda dentro de la suspensión y al retirarla rotar varias veces contra la pared del tubo con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Inocular completamente las placas de Mueller Hinton, para ello debe deslizarse la torunda por la superficie del agar tres veces, en tres direcciones distintas y por último pasarla por la periferia del agar. Para conseguir una siembra uniforme, dejar secar la superficie inoculada.

- Con la ayuda de un dispensador o de pinzas, depositar un disco de eritromicina de 15 µg y otro de clindamicina de 2 µg, colocarlos a una distancia de 15 o 20 mm entre ambos sobre la superficie inoculada y dejar unos minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del antimicrobiano.

- Incubar en estufa a temperatura de 35°-37°C durante 16-18 horas en atmósfera aerobia.

Lectura de los resultados: la lectura de los halos de inhibición se realiza con la ayuda de una regla. Observar si se produce un achatamiento del halo de la clindamicina en el borde en que está enfrentada a la eritromicina. La presencia de este achatamiento indica resistencia inducible (D-test positivo). Ver figura 2 del documento científico de este procedimiento.

7.2.2. Controles de calidad. Los indicados en el apartado 7.1.2 para el control de medios y además la cepa *S. aureus* ATCC 25923 para el control de la actividad de los discos de eritromicina y clindamicina.

7.2.3. Detección de resistencia inducible a clindamicina por el método de microdilución en caldo. Cuando se determina la sensibilidad por el método de microdilución en caldo, generalmente se utilizan métodos comerciales, se deben seguir las instrucciones del fabricante e incluir los correspondientes controles de calidad requeridos. Cuando se realiza este método, la detección de la

resistencia a la meticilina requiere el uso de caldo Mueller Hinton con concentración ajustada de cationes y una incubación de 18-24 horas en atmósfera aerobia a 35-37°C.

Además de los correspondientes pocillos individuales para determinar la CMI de eritromicina y de clindamicina por separado también es necesaria la inclusión de un pocillo que combine 4 mg/L de eritromicina con 0,5 mg/L de clindamicina.

7.2.4. Controles de calidad. Además de los indicados en el apartado 7.2.2, cuando se realiza el método de dilución en caldo para determinar la resistencia inducible a la clindamicina se debe utilizar la cepa *S. aureus* ATCC BAA-976 (que no crece en el pocillo combinado de eritromicina y clindamicina, resistencia no inducible, control negativo) y la cepa *S. aureus* ATCC BAA-977 (que crece en el pocillo combinado de eritromicina y clindamicina, resistencia inducible, control positivo).

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

8.1. TÉCNICAS DE DIFUSIÓN CON DISCOS

La interpretación e intermedio se hace siguiendo los puntos de corte y las recomendaciones de los documentos vigentes del CLSI o de EUCAST.

8.1.1. Resistencia a la meticilina. En las cepas con resistencia homogénea a la meticilina se observa resistencia a la oxacilina y a la cefoxitina. Si la resistencia es heterogénea se puede observar sensibilidad a la oxacilina y resistencia a la cefoxitina (ver figura 1 del documento científico de este procedimiento). Si se trata de resistencia de tipo BORSA (ver documento científico de este procedimiento) se observará resistencia a la oxacilina y sensibilidad a la cefoxitina. En este caso, la resistencia a oxacilina se debe informar como tal, pero no implica resistencia al resto de los beta-lactámicos.

Independientemente del resultado de la CMI de la oxacilina, la resistencia a la cefoxitina es un marcador de la resistencia mediada por el gen *mecA* y por tanto, en *Staphylococcus*, esto implica resistencia a todos los betalactámicos y los microorganismos deben ser informados como "resistentes". Excepciones a esta regla son dos cefalosporinas no introducidas en el arsenal terapéutico y con actividad frente a SARM (ceftobiprole y ceftarolina).

8.1.2. Resistencia inducible a la clindamicina. Si se produce un achatamiento del halo de la clindamicina en el borde en que está enfrentada a la eritromicina se tratará de una resistencia inducible (D-test positivo) que indica la presencia de genes *erm*. Cuando la resistencia es inducible existe riesgo de mutación hacia la resistencia constitutiva durante el tratamiento con clindamicina, lo que desaconseja la utilización de este antimicrobiano. Esta posibilidad, se debe indicar en el informe o bien se debe interpretar este resultado como resistente a la eritromicina y a la clindamicina. Si, por el contrario,

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a la meticilina y a antimicrobianos MLS_B en estafilococos	PNT-MRP-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

no se observa un achatamiento del halo (D-test negativo) el mecanismo de resistencia implicado es una bomba de expulsión activa y el microorganismo se debe informar como sensible a la clindamicina.

8.2. TÉCNICAS DE MICRODILUCIÓN

La interpretación de los valores de la CMI se hace siguiendo los puntos de corte y las recomendaciones de los documentos vigentes del CLSI o de EUCAST.

8.2.1. Resistencia a la meticilina. En las cepas con resistencia homogénea a la meticilina se observa resistencia a la oxacilina y a la cefoxitina. Si la resistencia es heterogénea se puede observar sensibilidad a la oxacilina y resistencia a la cefoxitina. Si se trata de resistencia de tipo BORSA se observarán valores de CMI de oxacilina en el límite superior del rango "sensible" o valores inferiores dentro del rango de "resistente" y sensibilidad a la cefoxitina. En este caso, la resistencia a oxacilina se debe informar como tal, pero no implica resistencia al resto de los beta-lactámicos.

Independientemente del resultado de la CMI de la oxacilina, la resistencia a la cefoxitina es un marcador de la resistencia mediada por el gen *mecA* y por tanto, en *Staphylococcus*, esto implica resistencia a todos los betalactámicos y los microorganismos deben ser informados como "resistentes", con las excepciones mencionadas en el apartado 8.1.1.

8.2.2. Resistencia inducible a la clindamicina. Una CMI de eritromicina en el rango de "resistente", junto con una CMI de clindamicina en el rango de "sensible", asociados al crecimiento en el pocillo combinado con eritromicina y clindamicina, indicará que se trata del fenotipo de resistencia inducible, mediada por genes de tipo *erm*. En el informe se hará constar este hecho ante el riesgo de desarrollo de resistencia durante el tratamiento con clindamicina o bien se informará la cepa como "resistente" a la clindamicina. La ausencia de crecimiento en el pocillo combinado indicará que se trata de un fenotipo mediado por bomba de expulsión activa y la cepa se informará como "sensible" a la clindamicina.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento se llevará a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del área que emite los resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En el caso de *S. aureus* y *S. lugdunensis*, tanto la resistencia a la oxacilina, a la cefoxitina o a las dos simultáneamente debe interpretarse como resistencia a la meticilina.

En algunas cepas de estafilococos coagulasa negativa (excepto *S. epidermidis*) los criterios de interpretación de la CMI de oxacilina pueden sobreestimar la resistencia porque hay cepas para las que la CMI de oxacilina es de 0,5-2 mg/L y sin embargo no tienen el gen *mecA*. En las infecciones graves por este tipo de cepas es conveniente confirmar la presencia del gen *mecA* mediante PCR, mediante la detección de la PBP2a por técnicas de aglutinación con látex o mediante la técnica de difusión con disco de cefoxitina.

En el caso de *S. saprophyticus*, también puede sobreestimarse esta resistencia por lo que debe ser también confirmada por los métodos anteriormente descritos. En cualquier caso, no se aconseja determinar la sensibilidad a la meticilina en las cepas de *S. saprophyticus* aisladas de muestras de orina.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunas ocasiones es difícil diferenciar entre cepas BORSA *mecA* negativas y cepas *mecA* positivas muy heterorresistentes. La confirmación final para la diferenciación de ambos mecanismos de resistencia se debe realizar mediante la detección del gen *mecA* por PCR o bien mediante la detección de la PBP2a por técnicas de aglutinación con látex.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:781-791.
2. Swenson JM, Brasso WB, Ferraro MJ, Hardy DJ, Knapp CC, McDougal LK, Reller LB, Sader HS, Shortridge D, Skov R, Weinstein MP, Zimmer BL, and Patel JB. Detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci by broth microdilution using erythromycin-clindamycin combination wells. J Clin Microbiol. 2007; 45:3954-3957.
3. Swenson JM, Tenover FC, and the Cefoxitin Disk Study Group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol. 2005; 43:3818-3823.
4. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28:541-553.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es la descripción del procedimiento de detección de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (gentamicina y estreptomycin) en cepas del género *Enterococcus*.

2. FUNDAMENTO

Los enterococos presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos pero cuando éstos se usan en combinación con antimicrobianos activos a nivel de la pared celular (betalactámicos y glucopéptidos) se produce un efecto bactericida sinérgico, necesario para el tratamiento de infecciones graves en las que están implicados estos microorganismos. La adquisición de mecanismos de resistencia, fundamentalmente por producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, da lugar a resistencia de alto nivel (RAN) lo que impide el efecto sinérgico de estos antimicrobianos con betalactámicos o glucopéptidos. No existe resistencia cruzada entre la gentamicina y la estreptomycin ya que las enzimas modificadoras de aminoglucósidos afectan de forma diferente a ambos compuestos por lo que es importante estudiar la sensibilidad a ambos. La RAN a la estreptomycin implica solamente resistencia a este antimicrobiano, mientras que la RAN a la gentamicina implica generalmente RAN al resto de los aminoglucósidos de uso clínico, con la excepción de la estreptomycin. Se presentan los métodos de detección fenotípica de la esta RAN mediante la prueba de difusión en agar con discos de alta carga de antimicrobiano y mediante la determinación de la CMI por microdilución en caldo y por dilución en agar.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el laboratorio de Microbiología.
- *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S21. Vol. 31; nº 1. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. <http://www.EUCAST.org>). Se utilizará el documento vigente correspondiente.

4. MUESTRAS

Aislamientos de *Enterococcus* en cultivo puro en medios de agar sangre o agar chocolate en los que se requiera la determinación de la sensibilidad a los aminoglucósidos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos de agua estéril o suero fisiológico
- Escala de turbidez de McFarland
- Placas de Mueller Hinton agar (MHA) y de agar BHI (*Brain Heart Infusion*)
- Medio BHI líquido

- Discos de 120 µg de gentamicina y de 300 µg de estreptomycin
- Discos de 30 µg de gentamicina
- Placas para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por microdilución. Las placas deben incluir una alta carga de aminoglucósidos (500 mg/L de gentamicina o 1.000 mg/L de estreptomycin).

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de 35 ± 2°C
- Pinzas
- Asas de cultivo
- Torundas estériles para inocular las placas
- Micropipetas calibradas
- Puntas estériles para micropipetas
- Reglas para medir los halos de inhibición

7. PROCEDIMIENTO

7.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO

1. Realizar una suspensión bacteriana en solución salina estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.
2. Inocular la placa de medio Mueller Hinton utilizando las torundas estériles.
3. Colocar los discos de gentamicina (120 µg y 30 µg) y de estreptomycin (300 µg) en la superficie del agar con la ayuda de unas pinzas.
4. Incubar las placas durante 16-18 horas en estufa en ambiente aerobio a una temperatura de 35±2°C.
5. Tras la incubación se leerá el diámetro del halo de inhibición de los discos.
6. Discos de 120 µg y de 300 µg: halos de inhibición de ≥10 mm indican ausencia de RAN a los aminoglucósidos estudiados.
7. Discos de 120 µg y de 300 µg: halos de 6 mm indican RAN a los aminoglucósidos estudiados (con CMI de >500 mg/L y >1000 mg/L respectivamente).
8. Discos de 120 µg y de 300 µg: halos de 7-9 mm: interpretación dudosa, deberían ser confirmados por otra técnica (microdilución en caldo o dilución en agar).
9. Disco de 30 µg de gentamicina: halo de inhibición <8 mm indica que la cepa presenta RAN a gentamicina con una CMI >128 mg/L.

7.2. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.
2. Transferir 100µl del inóculo a un tubo con 10 ml de caldo BHI.
3. Inocular los pocillos de la placa que contengan alta carga de aminoglucósidos con 100 µl de la suspensión del microorganismo de tal manera que la concentración final de antimicrobiano en el pocillo sea de 500 mg/L para la gentamicina y de 1.000 mg/L para la estreptomycin.
4. Incubar en estufa durante 24 horas (gentamicina) o 24-48 horas (estreptomycin), en

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

atmósfera aerobia a una temperatura de 35 ±2°C.

5. Lectura de resultados: cualquier crecimiento indica RAN al aminoglucósido estudiado.

7.3. MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.

2. Depositar 10 µl de la suspensión anterior sobre una placa de agar BHI que contenga 500 mg/L de gentamicina o 2.000 mg/L de estreptomina.

3. Incubar en estufa durante 24 horas (placa de gentamicina) o 24-48 horas (placa de estreptomina), en atmósfera aerobia a una temperatura de 35 ± 2°C.

4. Lectura de resultados: el crecimiento de más de una colonia es indicativo de RAN al aminoglucósido estudiado.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

Se debe realizar con cada nuevo lote de discos, placas de microdilución o placas de agar con antimicrobiano. Se utilizarán las cepas *E. faecalis* ATCC 29212 (cepa sensible a los aminoglucósidos) y *E. faecalis* ATCC 51299 (cepa con RAN a los aminoglucósidos).

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se detecta resistencia a alguno de los aminoglucósidos estudiados por alguna de las técnicas anteriormente indicadas, se expresará el resultado como RAN a dicho antimicrobiano. Este resultado será indicativo de ausencia de posible sinergia de dicho compuesto con agentes activos a nivel de la pared celular (betalactámicos o glucopéptidos).

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización de la técnica.

El facultativo será el responsable de la validación del informe.

10. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En general solamente se utilizan los discos de 120 µg y una concentración de 500 mg/L para la detección de la RAN a gentamicina. Sin embargo, existen enzimas modificadoras de gentamicina que dan lugar a moderados niveles de resistencia a este antimicrobiano (CMI =256 mg/L) que no se detectan con el disco de 120 µg ni con los métodos de microdilución o de dilución en agar indicados. Aunque este mecanismo es muy infrecuente, la utilización adicional del disco de 30 µg de gentamicina permite detectarlo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin Infect Dis. 2001; 31:586-589.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty first informational supplement. CLSI document M100-S21. 2011.
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a los glucopéptidos en <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO y ALCANCE

El propósito de este documento es la descripción del procedimiento de detección de resistencia a los glucopéptidos en cepas del género *Enterococcus*.

2. FUNDAMENTO

Los glucopéptidos actúan mediante su unión al precursor del peptidoglicano D-alanina-D-alanina, lo cual afecta a la síntesis de la pared celular. *Enterococcus* puede ser resistente a estos antimicrobianos debido a la adquisición de genes que dan lugar a un precursor modificado del peptidoglicano por el cual estos compuestos no tienen afinidad. La resistencia puede ser:

1) intrínseca, ligada a las especies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, que se caracteriza por conferir bajos niveles de resistencia a la vancomicina (CMI 2-32 mg/L) y sensibilidad a la teicoplanina (CMI 0,5-2 mg/L). Esta resistencia es de carácter cromosómico y no transferible y por tanto con poca trascendencia epidemiológica; 2) adquirida, se han descrito 6 tipos diferentes aunque los tipos VanA y VanB son los más frecuentes. VanA confiere altos niveles de resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina y VanB confiere moderados niveles de resistencia a la vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina. Es muy importante detectar estos fenotipos de resistencia ya que son potencialmente transferibles, tienen importante trascendencia clínica y epidemiológica y se tienen que considerar en los programas de control de la infección.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el laboratorio de Microbiología.
- *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S21. Vol. 31; n° 1. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. <http://www.EUCAST.org>. Se utilizará el documento vigente correspondiente.

4. MUESTRAS

Aislamientos de *Enterococcus* en cultivo puro en medios de agar sangre o agar chocolate en los que se requiera la determinación de la sensibilidad a los glucopéptidos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos de agua estéril o suero fisiológico
- Escala de turbidez de McFarland o sistema similar.
- Placas con medio de Mueller Hinton agar (MHA)
- Placas con medio BHI (*Brain Heart Infusion*) agar suplementadas con 6 mg/L de vancomicina
- Tubos con caldo Mueller Hinton (concentración ajustada de cationes) o placas para la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos por microdilución.
- Discos de antimicrobianos: vancomicina y teicoplanina (30 µg).

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de 35 ± 2°C
- Pinzas
- Asas de cultivo
- Torundas estériles para inocular las placas
- Micropipetas calibradas
- Puntas estériles para micropipetas
- Reglas para medir los halos de inhibición

7. PROCEDIMIENTO

7.1.- MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCOS

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.
2. Inocular la placa de Mueller Hinton utilizando las torundas estériles.
3. Colocar los discos de vancomicina y teicoplanina (30 µg) en la superficie del agar con la ayuda de unas pinzas.
4. Incubar las placas durante 24 horas completas en la estufa en atmósfera aerobia a una temperatura de 35° ± 2°C para la detección adecuada de la resistencia
5. Tras la incubación, los halos de inhibición deben ser examinados con luz transmitida y se leerán con la ayuda de una regla. La presencia de velo en la zona de inhibición o de cualquier tipo de crecimiento es indicativo de resistencia. Los microorganismos con halos de inhibición en el rango intermedio, 15-16 mm (CLSI) deberían ser estudiados mediante técnicas de microdilución, dilución o Etest o mediante la prueba de cribado en placa suplementada con 6 mg/L de vancomicina.

7.2. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

1. Cuando se determina la sensibilidad por el método de microdilución en caldo, generalmente se utilizan métodos comerciales; se deben seguir las instrucciones del fabricante e incluir los correspondientes controles de calidad requeridos. Cuando se realiza este método, la detección de la resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina requiere el uso de caldo con concentración ajustada de cationes. La incubación debe ser de 24 horas completas a una temperatura de 35° ± 2°C.
2. Cualquier crecimiento indica resistencia al glucopéptido estudiado. Si la CMI de la vancomicina es de 8-16 mg/L, se debería confirmar la identificación del aislamiento para descartar la presencia de especies de enterococo con resistencia intrínseca a este antimicrobiano (*E. gallinarum*/*E. flavescens*/*E. casseliflavus*) de escasa importancia epidemiológica. Para ello resulta muy útil como método de despistaje realizar la prueba de movilidad en un medio semisólido de manitol-movilidad. Las especies con resistencia intrínseca a la vancomicina son móviles.

7.3. DETECCIÓN DE RESISTENCIA EN PLACAS DE AGAR SUPLEMENTADAS CON VANCOMICINA

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a los glucopéptidos en <i>Enterococcus</i>	PNT-MRP-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.

2. Depositar 1-10 µl de la suspensión del microorganismo sobre una placa de agar BHI que contenga 6 mg/L de vancomicina.

3. Incubar en estufa durante 24 horas en atmósfera aerobia a una temperatura de 35±2°C.

4. El crecimiento de más de una colonia es indicativo de resistencia a la vancomicina. En caso de detección de cepas resistentes por este método, es recomendable realizar la determinación de la CMI a la vancomicina y realizar la prueba de movilidad y de producción de pigmento para distinguir especies con resistencia adquirida (VanA o VanB) de aquellas que presentan resistencia intrínseca (característica de las especies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*) que también pueden crecer en este medio con vancomicina. La discriminación de estos dos tipos de resistencia es importante porque las implicaciones epidemiológicas son muy diferentes así como las posibles estrategias de control de la infección a nivel hospitalario (ver documento científico).

7.4. CONTROL DE CALIDAD

En los estudios de difusión con discos se utilizarán las cepas *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a los glucopéptidos) y *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente a la vancomicina, fenotipo VanB) así como la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible a los glucopéptidos).

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se detecta resistencia a la vancomicina (con o sin resistencia a la teicoplanina) en cepas de enterococo de especies diferentes a *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*/*E. flavescens*, debe informarse como tal y adoptar las medidas de control pertinentes en cada caso. Si la cepa presenta resistencia adquirida tanto a la vancomicina como a la teicoplanina, probablemente se trate del mecanismo *vanA*, que generalmente está localizado en plásmidos transferibles por conjugación lo que tiene una gran importancia epidemiológica. Si la cepa presenta moderada resistencia a la vancomicina y es sensible a la teicoplanina, probablemente se trate del mecanismo *vanB2*, emergente en muchos hospitales y que también puede ser transferible por conjugación y de importancia epidemiológica. La presencia de este tipo de resistencia en *Enterococcus* invalida el efecto sinérgico de estos antimicrobianos con los aminoglucósidos, requerido en el tratamiento de infecciones enterocócicas graves en pacientes alérgicos a betalactámicos. Si se detectan cepas de *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*/*E. flavescens* que presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a vancomicina, se debe informar indicando el carácter intrínseco de esta resistencia y su menor trascendencia epidemiológica.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento se llevará a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados

emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del área que emite los resultados.

10. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método de difusión con discos en agar detecta con dificultad los mecanismos que confieren bajos niveles de resistencia a la vancomicina (CMI 8-16 mg/L) como es el caso del mecanismo *vanB* y otros mecanismos adquiridos (*vanD-vanG*) y también los mecanismos intrínsecos de resistencia a la vancomicina propio de las especies *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*/*E. flavescens*, por tanto, en general no es un método aconsejable en estos casos. Sin embargo, el mecanismo *vanA*, al conferir alta resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina, se detecta con facilidad con los métodos indicados. Por ello es importante realizar la incubación de los cultivos 24 horas completas, leer los antibiogramas con luz transmitida y en caso de que los halos de inhibición estén en el rango intermedio o se sospeche resistencia a la vancomicina por crecimiento de colonias o velo en el interior del halo, se procederá al estudio de sensibilidad por otro método como es el estudio de la CMI o bien la determinación de crecimiento en placas selectivas suplementadas con vancomicina.

Es recomendable siempre realizar las pruebas de detección de movilidad y de pigmentos ante la sospecha de resistencia a la vancomicina en enterococos para descartar la presencia de las especies con resistencia intrínseca (*E. gallinarum*/*E. casseliflavus*/*E. flavescens*). *E. gallinarum* es una especie móvil y no produce pigmentos mientras que las otras dos son móviles y producen pigmentación amarilla.

El estudio genotípico mediante técnicas moleculares (PCR) de la presencia de genes *van* aportaría la confirmación definitiva en estos casos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant-enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:686-707.
2. Gholizadeh Y, Courvalin P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. Intern J Antimicrob Agents. 2000; 16 Suppl 1:S11-S17.
3. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28:541-553.
4. Zirakzadeh A, Patel R. Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Current Op Infect Dis. 2005; 18:507-512.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a los betalactámicos en <i>S. pneumoniae</i>	PNT-MRP-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es la descripción del procedimiento de detección de resistencia a los betalactámicos en *Streptococcus pneumoniae*.

2. FUNDAMENTO

Los betalactámicos son antimicrobianos de amplio espectro utilizados en el tratamiento de las infecciones neumocócicas. Sus dianas son las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y las alteraciones de las mismas confieren resistencia a estos antimicrobianos.

La detección de cepas de neumococo con resistencia a los betalactámicos es importante para prevenir fallos terapéuticos, especialmente en las infecciones meningéas. El antibiograma de difusión con discos impregnados con oxacilina se utiliza como método de cribado para la detección de cepas resistentes a estos compuestos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el laboratorio de Microbiología.
- *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S21. Vol. 31; n° 1. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. <http://www.EUCAST.org>. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- García Rodríguez, J.A. (Coordinador), Cantón R, García Sánchez J.E, Gómez-Lus M. L, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología n° 11 a, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

1. Aislamientos de *S. pneumoniae* en cultivo puro en medios de agar sangre o agar chocolate en los que se requiera la determinación de la sensibilidad a los betalactámicos.

En caso de aislamientos meningéas se deberá realizar directamente la determinación de la CMI (ver apartados 9 y 10).

2. Muestras de líquido cefalorraquídeo u otros líquidos estériles en los que se hayan observado diplococos grampositivos en la tinción de Gram.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos de agua estéril, suero fisiológico o caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*)
- Escala de turbidez de McFarland o sistema similar.
- Placas con medio de Mueller Hinton agar con 5% de sangre de carnero y medio de agar sangre (base Columbia)

- Discos de oxacilina (1 µg)
- Etest (o similar) de penicilina, cefotaxima, ceftriaxona
- Paneles comerciales para la determinación de la sensibilidad antibiótica de cepas de *S. pneumoniae* por microdilución. Estos paneles deben incluir, al menos, pocillos con concentraciones de penicilina desde 0,06 a 8 mg/L y con concentraciones de cefotaxima/ceftriaxona desde 0,12 a 8 mg/L.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de 35 ± 2°C con atmósfera de 5% de CO₂
- Pinzas
- Asas de cultivo
- Torundas estériles para inocular las placas
- Micropipetas calibradas
- Puntas estériles para micropipetas
- Reglas para medir los halos de inhibición

7. PROCEDIMIENTO

7.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.
2. Inocular la placa de Mueller Hinton con sangre (MH-S) utilizando las torundas estériles.
3. Realizar una siembra por agotamiento en la placa de agar sangre para comprobar que no ha habido contaminación durante la manipulación de la muestra.
4. Colocar el disco de oxacilina en la superficie del agar (MH-S) con la ayuda de unas pinzas.
5. Incubar las placas durante 18-24 horas en la estufa de CO₂ a una temperatura de 35±2°C. En su defecto, pueden utilizarse jarras de incubación con atmósfera de 5% de CO₂ e incubar en estufa convencional.
6. Tras la incubación de 18-24 h se leerá el diámetro del halo de inhibición del disco de oxacilina.
7. Halo de inhibición de oxacilina ≥ 20 mm. Resultado definitivo: cepa sensible a la penicilina y a la cefotaxima/ceftriaxona.
8. Halo de inhibición de oxacilina <20 mm: cepa con posibles alteraciones en las PBPs. Se recomienda determinar la CMI a la penicilina y a la cefotaxima mediante Etest (ver punto 7.2) o microdilución (ver punto 7.3).

7.2. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE PENICILINA Y DE CEFOTAXIMA POR ETEST

A. A partir de aislamientos de cultivo puro:

1. Realizar los pasos 1 a 3 del apartado 7.1 y proceder según se indica en el punto 7.2.C.

B. A partir de líquidos estériles:

1. Si el inóculo bacteriano valorado a partir de la tinción de Gram es elevado, utilizar directamente el propio líquido estéril para inocular la placa de MH-S (continuar según 7.2.C).

2. Si el inóculo observado en la tinción de Gram es bajo, proceder de la siguiente manera:

2.1. Centrifugar la muestra a 2.000-3.000 r.p.m durante 15 minutos.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a los betalactámicos en <i>S. pneumoniae</i>	PNT-MRP-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

2.2. Utilizar el sedimento para inocular la placa de MH-S (continuar según 7.2.C).

C. Inoculación y lectura:

1. Colocar una tira de Etest de penicilina y otra de cefotaxima en la superficie del agar (MH-S) con la ayuda de unas pinzas. Comprobar que la tira contacta completamente con la superficie del agar.
2. Incubar las placas durante 18-24 horas en atmósfera con 5% de CO₂ como se indica (7.1, paso 5).
3. Leer la CMI, que será el punto de intersección entre la elipse de inhibición y la tira de Etest.

7.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE PENICILINA Y CEFOTAXIMA POR MICRODILUCIÓN

1. Realizar los pasos 1 a 3 del apartado 7.1
2. Transferir 100 µl del inóculo (7.1, paso 1) a un tubo con 10 ml de caldo de Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre lisada de caballo.
3. Inocular la placa de microdilución con el volumen indicado por el fabricante (habitualmente 100 µl).
4. Sellar la placa con un plástico adhesivo. Incubar durante 18-24 horas en una estufa con una temperatura de 35±2°C.
5. Leer la CMI: concentración menor de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

Se deberá realizar con cada nuevo lote de discos, de tiras de Etest y de placas de microdilución utilizando la cepa *S. pneumoniae* ATCC 49619.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. MÉTODO DE CRIBADO POR DIFUSIÓN CON DISCO

8.1.1. Halo de inhibición de oxacilina ≥20 mm. Resultado definitivo: cepa sensible a la penicilina y a la cefotaxima/ceftriaxona.

8.1.2. Halo de inhibición de oxacilina < 20 mm. No informar como resistente hasta obtener el resultado de CMI obtenido por microdilución o Etest, que es el definitivo y que se debe informar.

8.2. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE PENICILINA

8.2.1. Aislamientos meníngeos:

- CMI de penicilina ≤ 0,06 mg/L: informar como sensible a la penicilina.
- CMI de penicilina ≥ 0,12 mg/L: informar como resistente a la penicilina.

8.2.2. Aislamientos no meníngeos:

- CMI de penicilina ≤ 0,06 mg/L. Informar como sensible a la penicilina. Estas cepas también son sensibles a la ampicilina por vía oral o parenteral y a todos los betalactámicos.
- CMI de penicilina (parenteral) ≥ 0,12 mg/L y ≤ 2 mg/L. Informar como sensible a la penicilina. Estas cepas también son sensibles a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona, cefepima y ertapenem. Insertar una recomendación terapéutica: "Cepa con CMI de penicilina ≤2 mg/L. En infecciones no meníngeas, pueden utilizarse como tratamiento las

penicilinas endovenosas a altas dosis. No utilizar penicilina en caso de meningitis."

- En caso de que se vaya a utilizar penicilina por vía oral informar: a) CMI de penicilina ≤ 0,06 mg/L: sensible; CMI de penicilina 0,12-1 mg/L: intermedio; CMI de penicilina ≥2 mg/L: resistente.

- CMI de penicilina (parenteral) = 4 mg/L. Informar como "resistencia intermedia" a la penicilina. Insertar una recomendación terapéutica: "En caso de infección meníngea, el aislamiento se considera resistente a la penicilina"

- CMI de penicilina (parenteral) > 4 mg/L. Informar como resistente a la penicilina.

- En los aislamientos no meníngeos se deben informar tanto las interpretaciones para meningitis como las de no meningitis.

8.2.3. Líquidos estériles:

- Emitir un resultado preliminar siguiendo los criterios de 8.2.1 y 8.2.2 según la muestra. **Repetir siempre** la prueba de sensibilidad antibiótica una vez que se tenga el correspondiente aislamiento bacteriano.

8.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE CEFOTAXIMA

8.3.1. Aislamientos meníngeos:

- CMI de cefotaxima ≤ 0,5 mg/L. Informar como sensible a la cefotaxima.

- CMI de cefotaxima =1 mg/L. Informar como resistencia intermedia a la cefotaxima.

- CMI de cefotaxima ≥ 2 mg/L. Informar como resistente a la cefotaxima.

8.3.2. Aislamientos no meníngeos:

- CMI de cefotaxima ≤ 1 mg/L. Informar como sensible a la cefotaxima. En los aislamientos con CMI de 1 mg/L y insertar una recomendación terapéutica: "En caso de infección meníngea el aislamiento se considera con resistencia intermedia a la cefotaxima".

- CMI de cefotaxima = 2 mg/L. Informar como resistencia intermedia a la cefotaxima. Insertar una recomendación terapéutica: "En caso de infección meníngea el aislamiento se considera resistente a la cefotaxima".

- CMI de cefotaxima ≥ 4 mg/L. Informar como resistente a la cefotaxima.

- En los aislamientos no meníngeos se deben informar tanto las interpretaciones para meningitis como las de no meningitis.

8.3.3. Líquidos estériles:

- Emitir un resultado preliminar siguiendo los criterios de 8.3.1 y 8.3.2 según el tipo de muestra.

- Repetir siempre la prueba de sensibilidad antibiótica una vez que se tenga el correspondiente aislamiento bacteriano.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización de la técnica.

El facultativo será el responsable de la validación del informe.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a los betalactámicos en <i>S. pneumoniae</i>	PNT-MRP-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

10. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El uso de penicilina endovenosa, cefotaxima o ceftriaxona en meningitis siempre requiere dosis máximas.

Se deben emplear dosis de penicilina endovenosa de al menos 2 millones de unidades cada 4 horas para el tratamiento de infecciones no meníngeas con CMI de penicilina \leq 2 mg/L. Las cepas con CMI de penicilina de 4 mg/L pueden requerir dosis de penicilina de 18-24 millones de unidades por día.

La determinación de la CMI de betalactámicos sobre muestra directa puede verse alterada si el paciente ha recibido tratamiento antimicrobiano previo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Pallarés R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, Martín R, Gudiol F. Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *N Engl J Med.* 1995; 333:474-480.
2. Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, Dal-Ré R, García-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:2953-2959.
3. Torres C, Cercenado E. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:541-553.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a las fluoroquinolonas en <i>S. pneumoniae</i>	PNT-MRP-06	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es la descripción del procedimiento de detección fenotípica de resistencia a las fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*.

2. FUNDAMENTO

Las quinolonas son antimicrobianos de amplio espectro cuyas dianas de acción son la ADN girasa y la topoisomerasa IV. El principal mecanismo de resistencia bacteriana a las quinolonas es debido a mutaciones en una o en sus dos dianas.

La detección de cepas con mutaciones de primer nivel es importante para prevenir el desarrollo de alta resistencia durante el tratamiento. Se utilizará el antibiograma por difusión con discos de norfloxacin y de ciprofloxacino como método de cribado para la detección de cepas con mutaciones que confieren bajo nivel de resistencia a las fluoroquinolonas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de seguridad en el laboratorio de Microbiología.
- *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S21. Vol. 31; n° 1. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. <http://www.EUCAST.org>. Se utilizará el documento vigente correspondiente.
- Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2008. Disponible en: <http://www.sfm.asso.fr>.
- García Rodríguez, J.A. (Coordinador), Cantón R, García Sánchez J.E, Gómez-Lus M. L, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología n° 11 a, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Aislamientos de *S. pneumoniae* en cultivo puro en medios de agar sangre o de agar chocolate en los que se requiera la determinación de la sensibilidad a las fluoroquinolonas.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos de agua estéril, suero fisiológico o caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*)
- Escala de turbidez de McFarland o sistema similar.
- Placas con medio de Mueller Hinton agar con 5% de sangre de carnero (MH-S) y medio de agar sangre (base Columbia).
- Discos de norfloxacin (5 µg) y de ciprofloxacino (5 µg).
- Etest de ciprofloxacino.

- Paneles comerciales para la determinación de la sensibilidad antibiótica de cepas de *S. pneumoniae* por microdilución. Estos paneles deben incluir al menos las concentraciones 2 y 4 mg/L de ciprofloxacino.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de 35 ± 2°C con atmósfera de 5% de CO₂
- Pinzas
- Asas de cultivo
- Torundas estériles para inocular las placas
- Micropipetas calibradas
- Puntas estériles para micropipetas
- Reglas para medir los halos de inhibición

7. PROCEDIMIENTO

7.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCO

1. Realizar una suspensión bacteriana en medio líquido estéril a partir de 3-4 colonias aisladas. El inóculo debe tener una turbidez equivalente al 0,5 de la escala McFarland.
2. Inocular la placa de MH-S utilizando las torundas estériles.
3. Realizar una siembra por agotamiento en la placa de agar sangre para comprobar que no ha habido contaminación durante la manipulación de la muestra.
4. Colocar los discos de norfloxacin y ciprofloxacino en la superficie del agar (MH-S) con la ayuda de unas pinzas.
5. Incubar las placas durante 18-24 horas en la estufa con 5% de CO₂ a una temperatura de 35±2°C. En su defecto, pueden utilizarse jarras de incubación con atmósfera de 5% de CO₂ e incubar en estufa convencional.
6. Tras la incubación de 18-24 h se leerá el diámetro del halo de inhibición de los discos de norfloxacin y ciprofloxacino.
7. Halo de inhibición del disco de norfloxacin (5 µg): ≥10 mm y halo de inhibición del disco de ciprofloxacino (5 µg): ≥30 mm. Resultado definitivo: cepa sensible a todas las fluoroquinolonas.
8. Halo de inhibición de norfloxacin <10 mm o halo de inhibición de ciprofloxacino < 19 mm: cepa con posible mutación de primer nivel. Se recomienda determinar la CMI de ciprofloxacino mediante Etest (7.2) o por microdilución (7.3).

7.2. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE CIPROFLOXACINO POR ETEST

1. Realizar los pasos 1 a 3 del apartado 7.
2. Colocar una tira de Etest de ciprofloxacino en la superficie del agar (MH-S) con la ayuda de unas pinzas. Comprobar que la tira contacta completamente con la superficie del agar.
3. Incubar las placas durante 18-24 horas en atmósfera con 5% de CO₂ a una temperatura de 35±2°C. como se indica en el punto 7.1.
4. Leer la CMI que será el punto de intersección de la elipse de inhibición y la tira de Etest.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección de resistencia a las fluoroquinolonas en <i>S. pneumoniae</i>	PNT-MRP-06	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

7.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE CIPROFLOXACINO POR MICRODILUCIÓN

1. Realizar los pasos 1 a 3 del apartado 7.1.
2. Transferir 100 µl del inóculo (7.1, paso 1) a un tubo con 10 ml de caldo de Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre lisada de caballo.
3. Inocular la placa de microdilución con el volumen indicado por el fabricante (habitualmente 100 µl).
4. Sellar la placa con un plástico adhesivo. Incubar durante 18-24 horas en estufa con una temperatura de 35±2°C.
5. Leer la CMI: concentración menor de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible.

7.4. CONTROL DE CALIDAD:

Se debe realizar con cada nuevo lote de discos, tiras de Etest o paneles de microdilución en los que se incluyan norfloxacin y ciprofloxacino. Para ellos se utiliza la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. MÉTODO DE CRIBADO POR DIFUSIÓN CON DISCO

8.1.1. Halo de inhibición del disco de norfloxacin (5 µg): ≥10 mm y halo de inhibición del disco de ciprofloxacino (5 µg): ≥30 mm. Resultado definitivo: cepa sensible a todas las fluoroquinolonas.

8.1.2. Halo de inhibición del disco de norfloxacin <10 mm o halo de inhibición del disco de ciprofloxacino <19 mm: cepa con posible mutación de primer nivel en topoisomerasas. Emitir un resultado preliminar como: "Aislado resistente a las fluoroquinolonas" e insertar una recomendación terapéutica: "El aislamiento puede tener mutaciones de primer nivel de resistencia a fluoroquinolonas y el uso de éstas puede llevar al fracaso terapéutico por desarrollo de una segunda mutación que confiere alta resistencia a cualquier antimicrobiano de esta familia".

8.2. CMI DE CIPROFLOXACINO POR ETEST Y POR MICRODILUCIÓN

8.2.1. CMI de ciprofloxacino <4 mg/L. Resultado definitivo: cepa sensible a todas las fluoroquinolonas. Según los criterios de la SFM se consideran también sensibles las cepas si la CMI de ciprofloxacino es de 4 mg/L..

8.2.2. CMI de ciprofloxacino entre 4-8 mg/L. Cepa con posible mutación de primer nivel en las

topoisomerasas. Informar el aislamiento como: "cepa con resistencia intermedia a ciprofloxacino y a levofloxacino" (**independientemente de la CMI de levofloxacino que se obtenga**). Insertar una recomendación terapéutica: "El aislamiento puede tener mutaciones de primer nivel de resistencia a las fluoroquinolonas y el uso de éstas puede llevar al fracaso terapéutico por desarrollo de una segunda mutación que confiere alta resistencia a todos estos compuestos".

8.2.3. CMI de ciprofloxacino ≥16 mg/L. Cepa con posible doble mutación (por ejemplo, *parC-gyrA*). Informar como resistente a todas las fluoroquinolonas. Insertar una recomendación terapéutica: "El aislamiento tiene resistencia de alto nivel a las fluoroquinolonas lo que desaconseja el uso de cualquier antimicrobiano de este familia".

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización de la técnica.

El facultativo será el responsable de la validación del informe.

10. ANOTACIONES Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

EUCAST recomienda utilizar para el cribado de resistencia de primer nivel a las fluoroquinolonas un disco de norfloxacin de 10 µg y considerar resistencia si el halo de inhibición es <12 mm.

Algunos aislamientos de *S. pneumoniae*, especialmente los que tienen un fenotipo mucoso (serotipo 3) pueden dar halos de inhibición inferiores a 10 mm para norfloxacin aunque no tengan mutaciones en las topoisomerasas. En raras ocasiones, algunas cepas con mutaciones de primer nivel pueden dar halos superiores a 10 mm.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adam HJ, Schurek KN, Nichol KA, Hoban CJ, Baudry TJ, Laing NM, Hoban DJ, Zhanel GG. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:198-207.
2. Davidson R, Calvacanti R, Brunton JL, Darrin J, Bast DJ, de Azevedo JCS et al. Resistance to levofloxacino and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med.* 2002; 346:747-750.

Anexo. Esquema de trabajo para la detección de resistencia a las fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*

