

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

38.

**Detección fenotípica de
mecanismos de resistencia
en gramnegativos**

2

0

1

1

Coordinador: Ferran Navarro

Autores: Jorge Calvo
Rafael Cantón
Felipe Fernández Cuenca
Beatriz Mirelis
Ferran Navarro



ISBN-978-84-615-1530-1

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT, OXA)

- 2.1. Clasificación, aspectos epidemiológicos y características generales de las betalactamasas resistentes a los inhibidores
- 2.2. Detección fenotípica de betalactamasas resistentes a los inhibidores
- 2.3. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

3. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

- 3.1. Clasificación, aspectos epidemiológicos y características generales de las betalactamasas de espectro extendido
- 3.2. Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido
- 3.3. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

4. Betalactamasas tipo AmpC

- 4.1. Clasificación, aspectos epidemiológicos y características generales de las betalactamasas tipo AmpC
- 4.2. Detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC
- 4.3. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

5. Carbapenemasas

- 5.1. Clasificación, aspectos epidemiológicos y características generales de las carbapenemasas
- 5.2. Detección fenotípica de carbapenemasas
- 5.3. Diferenciación fenotípica de las diferentes carbapenemasas
- 5.4. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

6. Resistencia a quinolonas

- 6.1. Características generales de la resistencia a quinolonas
- 6.2. Detección fenotípica de la resistencia a quinolonas
- 6.3. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

7. Resistencia a aminoglucósidos

8. Resistencia a betalactámicos en *Haemophilus influenzae*

- 8.1. Aspectos epidemiológicos y características generales
- 8.2. Detección fenotípica de la resistencia
- 8.3. Información de los resultados y recomendaciones terapéuticas

9. Resistencia a betalactámicos en *Neisseria* spp.

- 9.1. *Neisseria gonorrhoeae*
- 9.2. *Neisseria meningitidis*

10. Bibliografía

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-MRN-01. Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)
2. PNT-MRN-02. Detección fenotípica de betalactamasas plasmídicas tipo AmpC
3. PNT-MRN-03. Detección fenotípica de carbapenemasas

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

38. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN GRAMNEGATIVOS. 2011

Coordinador: Ferran Navarro

**Autores: Jorge Calvo
Rafael Cantón
Felipe Fernández Cuenca
Beatriz Mirelis
Ferran Navarro**

1. INTRODUCCIÓN

El presente procedimiento microbiológico de la SEIMC se ha redactado con la finalidad de establecer una serie de herramientas fenotípicas que sean útiles para la detección de determinados mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos que pueden implicar diferentes actitudes terapéuticas o ser de interés epidemiológico.

A la hora de redactar el presente texto se nos planteó la duda de estructurarlo por microorganismos o por mecanismos de resistencia. Es indudable que antes de interpretar el resultado de un estudio de sensibilidad es necesario conocer la identificación del microorganismo. Cada bacteria o grupo bacteriano tiene su patrón de resistencia natural que hay que tener presente en este proceso. Como muchos grupos bacterianos comparten determinados mecanismos de resistencia, decidimos estructurar el presente procedimiento según los mecanismos de resistencia a los principales antimicrobianos haciendo referencia en cada caso a posibles peculiaridades de las diferentes especies bacterianas. La práctica totalidad de los mecanismos descritos se refieren a las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y puntualmente también a otros bacilos gramnegativos no fermentadores, entre los que destaca *Acinetobacter* spp.

La resistencia a betalactámicos, se puede producir por varios mecanismos, pero el más importante por su frecuencia y eficacia es la producción de betalactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos y pueden producirse de manera constitutiva o inducible.

La continua descripción de nuevas betalactamasas ha creado problemas en su clasificación y nomenclatura. Actualmente se conocen más de 890 enzimas. Bush en el año 1989 propuso una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico. Esta clasificación fue revisada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y actualizada en 2010 por Bush y Jacoby. Por otro lado Ambler en 1980 propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D. Tanto la clasificación de Bush y Jacoby como la de Ambler están correlacionadas.

De entre todas las betalactamasas descritas hasta el momento, caben destacar por su interés e implicaciones clínicas las siguientes: 1) Betalactamasas de espectro extendido (grupos 2be, 2ber y 2de de la clasificación de Bush y Jacoby: enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA). 2) Betalactamasas resistentes a los inhibidores (grupo 2br: enzimas tipo TEM y SHV). 3) Betalactamasas tipo AmpC (grupo 1: enzimas tipo LAT, MIR, CMY y FOX). 4) Carbapenemasas (grupos 2f, 2df y 3: enzimas tipo VIM IMP, IMI, KPC, NDM y OXA). En el

presente procedimiento se discuten todas ellas. Además de las betalactamasas, también se discuten los mecanismos de resistencia de otros dos grupos de antimicrobianos de interés, las quinolonas y los aminoglucósidos.

El principal mecanismo de resistencia a quinolonas es consecuencia de mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV. En los últimos años se describen con mayor frecuencia resistencias plasmídicas (*plasmid mediated quinolone resistance*, PMQR) como la mediada por los genes *qnr*, el gen *aac (6')-Ib-cr*, que codifica la enzima inactivante de aminoglucósidos que acetila también las quinolonas y los genes *oqxAB* y *qepA* que codifican bombas de expulsión activa. Todos estos genes plasmídicos determinan incrementos relativamente pequeños en las CMI de las quinolonas. El principal mecanismo de resistencia a aminoglucósidos es la inactivación enzimática y la interpretación de los diferentes patrones observados suele ser muy compleja y difícil de realizar. Aún así se dan algunas indicaciones prácticas.

La resistencia a betalactámicos en *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp. se tratará en un apartado específico por presentar mecanismos de resistencia peculiares.

En la presente revisión se han recogido diferentes opiniones, criterios y recomendaciones aparecidas en la literatura, destacando las del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *Comité de l'Antibiogramme* de la Sociedad Francesa de Microbiología (CASFM), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), del grupo GEMARA (Grupo de Estudio de los Mecanismos de Acción y Resistencia a los Antimicrobianos) y antiguas recomendaciones de MENSURA (Mesa Española de Normalización de las Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos). Por último, es necesario aclarar que en la mayoría de los casos (excepto en los apartados en los que se hace mención expresa a las recomendaciones terapéuticas), los términos de sensible o resistente no se refieren necesariamente a las categorías clínicas de interpretación basadas en los puntos de corte sino a consideraciones microbiológicas de pertenencia a las poblaciones salvajes (sin mecanismos de resistencia y por tanto sensible) o la expresión de un mecanismo de resistencia.

2. BETALACTAMASAS RESISTENTES A LOS INHIBIDORES (IRT, OXA)

2.1 CLASIFICACIÓN, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BETALACTAMASAS RESISTENTES A LOS INHIBIDORES

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos en bacilos gramnegativos es la producción de betalactamasas. La primera evidencia de la presencia de estas enzimas en *Escherichia coli* se remonta a los años 60 del pasado siglo cuando se describió la betalactamasa TEM-1. A

partir de esa fecha y sobre todo durante los años 70-80, se desarrollaron un gran número de antibióticos betalactámicos resistentes a la acción de estas enzimas. Asimismo, aparecieron en el arsenal terapéutico los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam que permitían recuperar la actividad de las penicilinas.

Así, la asociación amoxicilina-ácido clavulánico presentaba actividad frente a un gran número de enterobacterias incluyendo aquellas que se habían vuelto resistentes por producción de una betalactamasa (generalmente TEM-1, TEM-2 o SHV-1). Estas betalactamasas presentaban actividad frente a aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (ticarcilina) y como se ha mencionado, eran sensibles a los inhibidores de betalactamasa. A partir de estas enzimas, mediante mutaciones puntuales, empezaron a aparecer betalactamasas con espectros de acción diferente. Por un lado enzimas que ampliaban su espectro a las cefalosporinas, las denominadas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y por otro, mutaciones en otras posiciones nucleotídicas, daban lugar a betalactamasas resistentes a la inhibición de los inhibidores de betalactamasas. Estas enzimas se han denominado IRT (*inhibitor-resistant TEM mutant*) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2, aunque también se han descrito derivadas de SHV-1. Todas estas enzimas pertenecen a la clase A de Ambler. Además, algunas oxacilinasas (como la OXA-1), pertenecientes a la clase D de Ambler, dan lugar a un fenotipo similar al de las IRT. Todas estas betalactamasas (IRT y algunas OXA) se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas siendo insensibles a la acción de los inhibidores de betalactamasa y, en su gran mayoría, no tienen actividad sobre el resto de betalactámicos.

La resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico se ha ido incrementando paulatinamente durante los últimos años. Según datos del *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS, denominado en la actualidad EARSS-net) se observó un aumento de cepas de *E. coli* procedentes de bacteriemias resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico de un 3,8% al 6% en el período 2003-2006. Si se incluían las cepas con sensibilidad disminuida, el incremento era del 9,3% al 15,4%.

En Barcelona, entre los años 1996 y 1998 se observó que un 6,9% de las cepas de *E. coli* presentaban sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico. En un 0,3% de estas cepas el mecanismo de resistencia implicado fue la presencia de IRT, en un 5,3% la hiperproducción de su betalactamasa cromosómica y en un 0,18% betalactamasas tipo OXA, siendo el resto debidas a la hiperproducción de las betalactamasas TEM-1 o SHV-1. Entre los años 2007 y 2008 en Madrid se detectaron un 4,3% de cepas de *E. coli* resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico y en un 0,5% se detectaron enzimas del tipo IRT. Tanto en Barcelona

como en Madrid se detectaron una amplia variedad de enzimas del tipo IRT con una estructura policlonal de los microorganismos que las producían.

Si bien las enzimas IRT, como se ha mencionado, son variantes con mutaciones puntuales de las betalactamasas TEM-1, TEM-2 o SHV-1, las enzimas tipo OXA presentan una gran heterogeneidad genética con homologías entre ellas que oscilan entre un 60 y un 99%. Además también presentan una gran heterogeneidad en cuanto a espectro de acción y perfil de inhibición se refiere. Así, algunas de ellas presentan espectros similares a las betalactamasas de espectro extendido y otras presentan actividad carbapenemasa. En este apartado nos referiremos exclusivamente a las betalactamasas de amplio espectro que no afectan a cefalosporinas de tercera generación ni a carbapenémicos (OXA-1, OXA-2, OXA-3, OXA-4, OXA-10). La betalactamasa OXA-1 es la más frecuentemente descrita en enterobacterias. Por el momento no se han descrito aislados clínicos con enzimas derivadas de betalactamasas del tipo CTX-M, que presenten un perfil similar al que confieren las enzimas IRT.

2.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS RESISTENTES A LOS INHIBIDORES

La detección de estas enzimas es factible solo en enterobacterias naturalmente sensibles a la actividad de la asociación amoxicilina-ácido clavulánico. Por tanto, su presencia no puede detectarse fenotípicamente en bacterias naturalmente resistentes a esta asociación como son las enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*) o los bacilos gramnegativos no fermentadores (*P. aeruginosa*) portadores de betalactamasa tipo AmpC inducible, debido a la superposición de mecanismos de resistencia. Así, para el resto de enterobacterias, a partir de los antibiogramas realizados, bien por la técnica de difusión con discos o bien por la de microdilución, se puede sospechar la presencia de las enzimas IRT y OXA, aunque su confirmación definitiva debe ser realizada mediante técnicas moleculares dado que son varios los mecanismos que pueden dar patrones de resistencia similares. En la tabla 1 se muestran algunas características fenotípicas diferenciales de los distintos mecanismos implicados en la resistencia a las asociaciones betalactámico-inhibidor de betalactamasa. En la figura 1 se presentan los patrones de resistencia esperados en el caso de una betalactamasa tipo IRT y de una de tipo OXA.

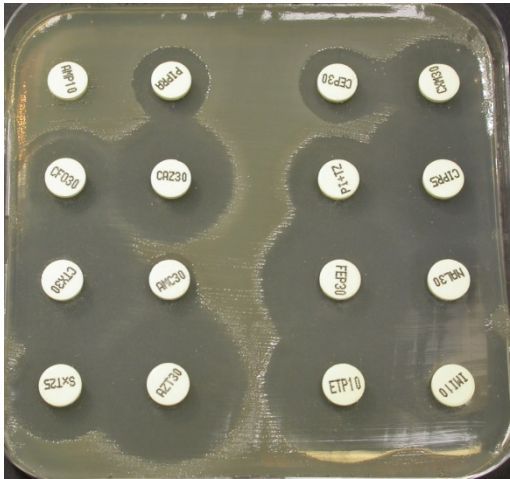
Generalmente, una cepa portadora de una betalactamasa de tipo IRT presentará resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas (en mayor o menor medida) y sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico. Estas cepas mostraran además sensibilidad a las cefalosporinas, incluyendo las de primera generación. También se ve afectada la asociación ampicilina-sulbactam y generalmente se

suele mantener o disminuir levemente la sensibilidad a piperacilina-tazobactam, posiblemente por la acción intrínseca de la piperacilina (figura 1A). Este patrón se puede ver alterado ante la presencia añadida de otros mecanismos de resistencia.

Las cepas portadoras de las betalactamasa tipo OXA comentadas previamente (principalmente OXA-1) suelen presentar patrones similares a las portadoras de IRT. Así presentan resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam. Una característica de las cepas que poseen estas enzimas es que generalmente presentan una menor sensibilidad a la cefepima. Debido a una cierta actividad del ácido clavulánico y a la menor sensibilidad de cefepima, es frecuente observar (especialmente mediante la técnica de difusión con discos) sinergia entre ácido clavulánico y cefepima. Este patrón que se observa con la mencionada sinergia es característico de las enzimas tipo OXA-1 (figura 1B).

Figura 1. Patrones de resistencia esperados en A) cepa portadora de una betalactamasa tipo IRT (imagen de *Escherichia coli* portadora de TEM-30/IRT-2) y en B) cepa portadora de una betalactamasa tipo OXA (imagen de *Escherichia coli* portadora de OXA-1).

A)



2.3. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

Ante la presencia de enzimas tipo IRT u OXA, se debería prescindir de tratamientos con las asociaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasa como amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam, presentándose como válida cualquier otra alternativa en función del antibiograma, del foco infeccioso y de la situación clínica del paciente. En el caso de la asociación piperacilina-tazobactam, debido a la propia actividad de la piperacilina, podría plantearse como alternativa siempre que se observe sensibilidad *in vitro*. En el caso de enterobacterias portadoras de betalactamasas tipo OXA debe plantearse también la conveniencia de evitar el uso de cefepima, especialmente si esta betalactamasa está hiperproducida y se observa disminución de la sensibilidad *in vitro*.

	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	32->256	I/R
Piper/Tazo (PI+TZ)	32-128	I/R
Amox/clav (AMC)	16-128	I/R
Cefalotina (CEP)	4-32	S/r
Cefoxitina (CFO)	2-4	S
Cefuroxima (CXM)	2-16	S
Cefotaxima (CTX)	0,03-0,06	S
Ceftazidima (CAZ)	0,06-0,12	S
Cefepima (FEP)	0,12-1	S
Aztreonam (AZT)	0,03-0,12	S
Imipenem (IMI)	0,06-0,12	S

B)



	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PI)RA)	32->256	I/R
Piper/Tazo (PI+TZ)	32-128	I/R
Amox/clav (AMC)	16-128	I/R
Cefalotina (CEP)	4-16	S/r
Cefoxitina (CFO)	2-4	S
Cefuroxima (CXM)	2-4	S
Cefotaxima (CTX)	0,03-0,06	S
Ceftazidima (CAZ)	0,06-0,12	S
Cefepima (FEP)	0,03-0,12	S
Aztreonam (AZT)	0,03-0,12	S
Imipenem (IMI)	0,06-0,12	S

3. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

3.1. CLASIFICACIÓN, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

En las bacterias gramnegativas el mecanismo de resistencia a los betalactámicos más común e importante es la producción de betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico inactivando los antibióticos. Un grupo importante de estas enzimas son las BLEE que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas.

Las BLEE se pueden clasificar en diferentes grupos, según las distintas clasificaciones (tabla 2). La mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de Ambler. Entre ellas se encuentran las TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con menor espectro de hidrólisis, la familia CTX-M, procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*, y otras menos prevalentes como las PER, VEB, BES, GES, TLA y SFO, incluidas todas ellas en el grupo funcional 2be de Bush y Jacoby.

Otras BLEE pertenecientes a la clase A, aunque del subgrupo 2ber son las betalactamasas CMT (*complex mutant* TEM), como la TEM-50 que combinan una cierta resistencia a la inhibición por el ácido clavulánico junto a una mayor actividad frente a oximino-cefalosporinas. Algunas enzimas de la familia OXA (clase D de Ambler y grupo funcional 2de), son también betalactamasas de espectro extendido.

Desde su descripción inicial, se han identificado más de 300 BLEE diferentes, y la mayoría pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M (<http://www.lahey.org/webt.asp>) (tabla 3).

Tabla 1. Principales patrones de resistencia a betalactámicos en función de la betalactamasa implicada en las principales enterobacterias que carecen de betalactamasa tipo AmpC cromosómica inducible. En gris se resaltan los antibióticos clave para la sospecha de cada uno de las betalactamasas implicadas.

Fenotipo	AMP	AMC	TIC	PIP	C1G	FOX	CXM	C3G	C4G	CARB	Observaciones
Natural	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Presencia de AmpC a niveles basales en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp. son clínicamente resistentes a C1G y C2G.
TEM-1, TEM-2 o SHV-1	R	S	R	r	S	S	S	S	S	S	Las enzimas más frecuentes son TEM-1, TEM-2 y SHV-1. <i>Klebsiella</i> spp. presentan este patrón de forma natural al ser portadoras de SHV-1 o relacionadas.
Hiperproducción de AmpC cromosómica o AmpC adquirida	R	R	R	r/R	R	R	R	r/R	S	S	Presencia en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> spp. de AmpC hiperproducida.
Hiperproducción de TEM-1, TEM-2 o SHV1	R	r	R	R	R	S	S	S	S	S	En caso de tratarse de SHV-1 puede llegar a afectar ligeramente a ceftazidima.
BLEE	R	V	R	R	R	S	R	S/R	S/R	S	
IRT	R	R	R	S/I/R	S	S	S	S	S	S	
OXA	R	R	R	R	r	S	S	S	S/r	S	Se suele ver sensibilidad disminuida a cefepima, manteniéndose la sensibilidad a C3G.
Carbapenemasa	R	R	R	R	R	R	R	r	r	r/R	En caso de carbapenemasas de clase B el aztreonam se muestra sensible. Algunas carbapenemasas como OXA-48 hidrolizan escasamente a las cefalosporinas de amplio espectro, pudiendo aparecer sensibles en su interpretación.

AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; TIC, ticarcilina; PIP, piperacilina; C1G, cefalosporinas de primera generación; FOX, cefoxitina; CXM, cefuroxima; C3G, cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos; C4G, cefalosporinas de cuarta generación; CARB, carbapenémicos; V, variable; S, sensible; R, resistente; r, halos reducidos o CMI elevadas con respecto al fenotipo salvaje, pero dentro del rango de sensibilidad.

Tabla 2. Clasificación de las betalactamasas de espectro extendido.

Clase de Ambler	Clase de Bush-Jacoby	Sustrato	Inhibición por clavulánico	Enzimas
A	2be	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactámicos	+	SHV, TEM, CTX-M, PER, VEB
A	2ber	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactámicos	-	CMT (<i>complex mutant</i> TEM)
D	2de	Cefalosporinas espectro ampliado	+/-	OXA

Tabla 3. Principales familias de betalactamasas de espectro extendido.

Familia	Grupo funcional	Nº de enzimas	Enzimas representativas
TEM	2be	81	TEM- 3, TEM-10, TEM-24
	2ber	11	CMT (<i>complex mutant</i> TEM) TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2be	42	SHV-2, SHV-3, SHV-115
CTX-M	2be	113	CTX-M-1, CTX-M-44 a CTX-M-92
PER	2be	7	PER-1 a PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 a VEB-7
OXA	2de	18	OXA-11, OXA-14, OXA-15

La historia de las betalactamasas de espectro extendido comienza en 1983 en Alemania con el aislamiento de diversas enterobacterias portadoras de la betalactamasa SHV-2, que hidrolizaba las oximino-cefalosporinas y derivaba de SHV-1 por mutaciones puntuales. Posteriormente se describieron otras enzimas derivadas de las TEM-1 y TEM-2 con un espectro de actividad similar a la SHV-2. Estas enzimas presentan una o más sustituciones en la secuencia aminoacídica, con lo que se produce un incremento en su espectro de hidrólisis, siendo capaces de hidrolizar no solo a penicilinas sino también a cefalosporinas de tercera y cuarta generación y a monobactámicos. Desde entonces estas enzimas se han descrito cada vez con más frecuencia en todos los países. En España se detectaron por primera vez en el año 1988.

Las BLEE predominantes en Europa fueron inicialmente las de tipo SHV, pero a finales de los 80 aparece una nueva familia de BLEE, la CTX-M que se ha encontrado en diferentes especies bacterianas. En la década de los 90 estas enzimas

se encontraron en distintas especies de *Enterobacteriaceae* produciendo brotes nosocomiales, pero a partir del 2000 se han convertido en las más frecuentes en la mayor parte del mundo, tanto en infecciones hospitalarias como de la comunidad, habiendo casi sustituido a las BLEE de los tipos TEM y SHV. Si bien la prevalencia de las diferentes enzimas CTX-M es variable en diferentes países; es interesante destacar la diseminación a nivel mundial del clon ST131 de *E. coli* O25:H4 portador de la CTX-M-15.

Actualmente se discute sobre la definición de betalactamasas de espectro extendido. Diversos autores sugieren la incorporación dentro del término BLEE de otras enzimas con capacidad hidrolítica sobre cefalosporinas y carbapenémicos.

3.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO
La detección rápida de la resistencia a los antimicrobianos así como su caracterización es una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica.

Su conocimiento ayuda en la elección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de la infección y permite instaurar las medidas adecuadas de aislamiento para evitar la dispersión del microorganismo a otros pacientes.

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, y esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos que se pone de manifiesto en un incremento de las CMI o una disminución de los halos de inhibición cuando se realiza la técnica de difusión con discos. Otra de las características de estas enzimas es que son inhibidas por el ácido clavulánico y que no presentan actividad hidrolítica frente a la cefoxitina, por lo que las cepas aparecen en el antibiograma como sensibles a este antimicrobiano (tabla 1).

Se han desarrollado diversas pruebas fenotípicas para la detección de BLEE, pero la mayoría se basan en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico. Entre ellas cabe destacar la técnica de difusión con disco en la que la presencia de una BLEE se sospecha no solo por la resistencia o disminución de los halos de inhibición de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y el ácido clavulánico, cuando previamente se han situado de forma estratégica los discos (figuras 2 y 3).

Otras técnicas basadas en el mismo principio son la utilización de discos combinados de cefalosporinas con ácido clavulánico y su variante en las técnicas de microdilución que permiten conocer las CMI de las cefalosporinas solas y en presencia de inhibidor. La técnica de difusión en gradiente (Etest) con tiras combinadas de cefalosporinas con y sin inhibidor es también de utilidad para la detección de BLEE. Las técnicas anteriormente descritas se detallan en el procedimiento normalizado de trabajo PNT-MRN-01 de este documento.

Todas estas pruebas fenotípicas de detección de BLEE requieren como mínimo 48 horas desde que el producto patológico llega al laboratorio, tiempo necesario para el aislamiento de la bacteria por cultivo y la realización del antibiograma. Se han buscado nuevos métodos para acortar este tiempo por lo que se han diseñado medios cromogénicos para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE. Entre ellos se encuentra el ChromID ESB (bioMérieux), Brilliance ESB agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESB. Otro método cromogénico rápido es el Cica-beta-Test (Kanto Chemical). Se

utiliza para la detección rápida de BLEE, directamente de la colonia de enterobacteria aislada. El método utiliza una cefalosporina cromogénica (HMRZ-86) y el ácido clavulánico como inhibidor para detectar rápidamente si el aislado es portador o no de una BLEE. Esta técnica permite asimismo detectar metalo-betalactamasas y enzimas de tipo AmpC hiperproducidas mediante el uso de EDTA y ácido borónico, respectivamente.

Es importante recordar que algunas enterobacterias poseen betalactamasas cromosómicas que hidrolizan las cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico. Cuando se hiperproducen dan lugar a un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE. Entre ellas se encuentra la betalactamasa K1 de *Klebsiella oxytoca*, la SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* y las cefalosporinas CepA de *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*.

3.3. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

El grado de hidrólisis frente a cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos puede variar según el tipo de BLEE y el nivel de producción, pudiendo aparecer sensibles *in vitro* a algunos de estos antibacterianos. Así por ejemplo, las BLEE de tipo TEM en general tienen mayor actividad frente a ceftazidima mientras que las de tipo CTX-M son más activas sobre cefotaxima.

El CLSI antes del año 2010 recomendaba informar las cepas con fenotipo de BLEE como resistentes a penicilinas, cefalosporinas y aztreonam indistintamente del valor de la CMI o del halo de inhibición mientras que el EUCAST recomendaba interpretar como intermedio un resultado sensible y como resistente un resultado intermedio. En el año 2010 estos comités modificaron los puntos de corte de las cefalosporinas y el aztreonam basándose en estudios PK/PD y efectuaron una nueva recomendación consistente en informar la sensibilidad de los aislados con BLEE según los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* independientemente del mecanismo de resistencia (tabla 4).

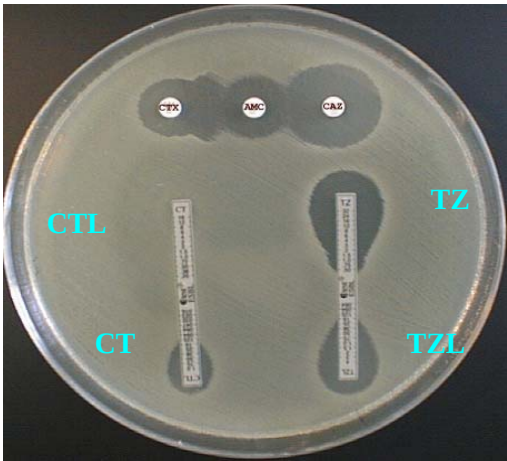
A pesar de la disminución de los puntos de corte, que parecen dar una buena predicción de la evolución clínica al tratamiento, sigue existiendo discusión sobre la influencia del inóculo bacteriano en el foco de infección. Por lo tanto, la decisión de seguir esta recomendación dependerá de criterios locales atendiendo a patrones epidemiológicos y de política de antimicrobianos y a la realización de estudios clínicos que aseguren la eficacia terapéutica de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias portadoras de BLEE en diferentes situaciones clínicas.

Tabla 4. Puntos de corte de cefalosporinas y aztreonam para *Enterobacteriaceae* según CLSI y EUCAST.

Antimicrobiano	CLSI (2009) ¹		CLSI (2010) ²		EUCAST (2011) ³	
	S	R	S	R	S	R
Cefuroxima (parenteral)	≤8	≥32	≤8	≥32	≤8	>8
Cefotaxima	≤8	≥64	≤1	≥4	≤1	>2
Ceftazidima	≤8	≥32	≤4	≥16	≤1	>4
Cefepima	≤8	≥32	≤8	≥32	≤1	>4
Aztreonam	≤8	≥32	≤4	≥16	≤1	>4

¹Documento M100-S19. ²Documento M100-S20. ³Versión 1.3, enero 2011

Figura 2. Imagen del efecto sinérgico entre cefalosporinas de tercera generación y ácido clavulánico mediante las técnicas de difusión con discos y Etest en una cepa productora de BLEE.



CTX, cefotaxima; AMC, amoxicilina-ácido clvulánico; CAZ, ceftazidima; CT, cefotaxima; CTL, cefotaxima + ácido clavulánico; TZ, ceftazidima; TZL, ceftazidima + ácido clavulánico.

Figura 3. Patrones de resistencia esperados en cepas portadoras de una BLEE tipo CTX-M. Imagen de *Escherichia coli* portadora de CTX-M-15.



	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	64->256	R
Piper/Tazo (PI+TZ)	2-8	S
Amox/clav (AMC)	4-8	S
Cefalotina (CEP)	>256	R
Cefoxitina (CFO)	2-4	S
Cefuroxima (CXM)	16->256	R
Cefotaxima (CTX)	0,12->256	S/R
Ceftazidima (CAZ)	0,25->256	S/R
Cefepima (FEP)	0,12->256	S/R
Aztreonam (AZT)	0,12->256	S/R
Imipenem (IMI)	0,06-0,12	S

4. BETALACTAMASAS TIPO AmpC

4.1 CLASIFICACIÓN, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BETALACTAMASAS TIPO AmpC

Las betalactamasas de la clase molecular C de Ambler (grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros) se caracterizan por su espectro de hidrólisis (actividad cefalosporinasa) y por su perfil de inhibición. Las AmpC hidrolizan cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefotina y cefotetán) y, en menor medida, las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), mientras que generalmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem) (figura 4). Este espectro de hidrólisis puede ampliarse y afectar además a cefalosporinas de cuarta generación (AmpC de espectro extendido), pero se desconoce cuál es la prevalencia y la relevancia clínica y epidemiológica de estas variantes de AmpC. La cloxacilina y el aztreonam, así como el ácido borónico y sus derivados (ácido fenil-borónico), inhiben a las betalactamasas de tipo AmpC, mientras que el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam no son buenos inhibidores (tabla 1).

La producción de AmpC puede ser constitutiva o inducible, siendo los niveles de producción dependientes del grado de expresión del gen *bla*_{AmpC}. Cuando el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma constitutiva (ausencia de genes reguladores del tipo *ampD* o *ampR*) puede hacerlo a niveles basales bajos, confiriendo un fenotipo de resistencia natural o salvaje característico de la especie bacteriana (tabla 5), o puede hacerlo a unos niveles muy superiores al basal (sobreexpresión de *bla*_{AmpC} mediada por mutaciones en el atenuador y/o promotor de *bla*_{AmpC}, adquisición de promotores fuertes para la expresión de *bla*_{AmpC}) produciendo cantidades elevadas de AmpC (hiperproducción de AmpC). En determinadas especies bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa*, etc. el gen *bla*_{AmpC} se expresa de forma inducible. El grado de inducción de *bla*_{AmpC} depende del tipo de inductor y es máximo con inductores fuertes como la cefotina y los carbapenémicos. En los aislados que tienen un gen *bla*_{AmpC} inducible, su expresión puede estar desreprimida establemente de forma parcial o total (mutaciones en genes reguladores de tipo *ampD* y *ampR*) dando lugar a la producción estable de grandes cantidades de AmpC (hiperproducción parcial o total de AmpC).

Independientemente del mecanismo que conduce a una hiperproducción de AmpC, los aislados hiperproductores de AmpC presentan un fenotipo de resistencia (fenotipo AmpC) a las penicilinas, las asociaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasa, cefalosporinas de primera y segunda generación, incluidas las cefamicinas, así como a las de tercera generación, pero en grado variable, dependiendo del nivel de hiperproducción. Los

aislados con este fenotipo AmpC suelen ser además sensibles a cefalosporinas de cuarta generación y a los carbapenémicos, aunque dicha sensibilidad se reduce significativamente si se produce la pérdida de alguna porina relacionada con la resistencia antimicrobiana.

Un grupo de betalactamasas de tipo AmpC están codificadas por genes *bla*_{AmpC} asociados a integrones, como los de clase 1, o transposones localizados en plásmidos conjugativos (AmpC plasmídicas). Estos genes *bla*_{AmpC} plasmídicos proceden del cromosoma bacteriano y se clasifican en 6 familias que se diferencian por la homología de sus genes: CIT (derivadas de la AmpC cromosómica de *C. freundii*), DHA (derivadas de la AmpC cromosómica de *M. morganii*), ACC (cuyo origen está relacionado con la AmpC cromosómica de *Hafnia alvei*), FOX (derivadas de la AmpC cromosómica de *Aeromonas media*), MOX (derivadas de la AmpC cromosómica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas de las AmpC cromosómicas de *E. cloacae* y/o *E. asburiae*).

Las AmpC plasmídicas se han descrito principalmente en algunas especies de enterobacterias (*Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *E. coli* y *Salmonella enterica*, entre otras) con relevancia clínica y epidemiológica. La distribución de estas enzimas es mundial, habiéndose descrito en todos los continentes y con una prevalencia variable, dependiente del microorganismo, del tipo de AmpC plasmídica y del área geográfica. En general, la prevalencia de las AmpC plasmídicas suele ser relativamente baja (inferior al 2% de todas las enterobacterias), aunque parece que existe una tendencia a incrementarse. En un estudio multicéntrico realizado en España se ha observado un incremento en la prevalencia de enterobacterias productoras de AmpC plasmídicas en 2007 (1,3%) respecto a 1999 (0,06%), siendo *P. mirabilis* la especie con mayor prevalencia (0,95%) y CMY-2 la AmpC plasmídica más frecuente (66,7%).

La producción de betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas puede dar lugar a fracasos terapéuticos, similares a los descritos en infecciones causadas por aislados hiperproductores de AmpC cromosómica inducible (selección de mutantes con desrepresión estable) en tratamientos con betalactámicos. Desde el punto de vista epidemiológico, las AmpC plasmídicas tienen mucha mayor relevancia o trascendencia que las AmpC cromosómicas, debido a su capacidad para movilizarse, y se pueden transferir tanto en el ambiente nosocomial, donde tienen un claro potencial epidémico, como en la comunidad. La epidemiología de la diseminación de las AmpC plasmídicas no se conoce muy bien debido a la falta de estudios multicéntricos y a la ausencia de consenso y métodos estandarizados de detección de estas betalactamasas.

Figura 4. Patrones de resistencia esperados en cepas portadoras de una betalactamasa tipo AmpC. Imagen de *Escherichia coli* portadora de CMY-2.



	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	16->256	r/R
Piperacilina (PIPA)	16->256	r/R
Piper/Tazo (PI+TZ)	16->256	r/R
Amox/clav (AMC)	>256	R
Cefalotina (CEP)	>256	R
Cefoxitina (CFO)	32->256	R
Cefuroxima (CXM)	32->256	R
Cefotaxima (CTX)	2->256	r/R
Ceftazidima (CAZ)	2->256	r/R
Cefepima (FEP)	0,12-1	S
Aztreonam (AZT)	2->256	r/R
Imipenem (IMI)	0,06-0.12	S

4.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS TIPO AmpC

La detección de AmpC plasmídicas puede realizarse por métodos fenotípicos o por métodos moleculares (confirmatorios). Los métodos fenotípicos son sencillos y económicos pero solo resultan de utilidad en aislados que no tienen una AmpC cromosómica natural (*Klebsiella* spp., *S. enterica*, *P. mirabilis*) o en aislados que tienen una AmpC cromosómica intrínseca no inducible, como ocurre en *E. coli*. La presencia de AmpC plasmídica debe sospecharse cuando estos aislados presenten un patrón de resistencia a betalactámicos (fenotipo AmpC) diferente al de su respectivo fenotipo salvaje o de resistencia natural (tabla 5), siendo los marcadores de mayor utilidad la sensibilidad intermedia o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y a algunas de las cefalosporinas de tercera generación. Los métodos fenotípicos más rentables, por su eficacia, su sencillez y su bajo coste económico, son el método de sinergia de doble disco (usando cloxacilina o ácido fenil-borónico y discos de cefotaxima y ceftazidima) y el método de discos combinados con inhibidores (ver PNT-MNR-02 de este documento). Existen otros métodos fenotípicos bastante sensibles y específicos, pero son más complejos (test en 3D) o más caros que los anteriores (agar cefoxitina, Etest de cefotetán/cefotetán más cloxacilina). En el caso concreto de *E. coli*, la utilización del método de inducción de AmpC (ver PNT-MNR-02) puede resultar útil en la detección de AmpC plasmídica puesto que un resultado positivo descartaría que el fenotipo AmpC sea el resultado de la hiperproducción de la AmpC cromosómica intrínseca, dado que ésta no es inducible. Mirelis *et al.* han

descrito un método simple para diferenciar las AmpC plasmídicas de las AmpC cromosómicas que puede ser de utilidad en *E. coli*. Los aislados productores de AmpC plasmídicas suelen presentar colonias dispersas por el borde de los halos de inhibición con discos con cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam.

Los métodos fenotípicos de detección de betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas tienen varias limitaciones importantes que deben ser consideradas o tenidas en cuenta para poder realizar una interpretación fiable de los resultados obtenidos. Estos métodos aún no han sido estandarizados por ningún comité u organización de expertos (CLSI, EUCAST, CASFM). Además, poseen una escasa o nula rentabilidad para detectar una AmpC plasmídica en enterobacterias que tienen una AmpC cromosómica inducible (tabla 5), por lo que para su detección es necesario recurrir a métodos moleculares, como los basados en la PCR múltiple y la secuenciación de ácidos nucleicos. En estos aislados con AmpC cromosómica inducible la identificación correcta de la especie bacteriana es suficiente para predecir la producción de una AmpC cromosómica inducible. En el procedimiento normalizado de trabajo PNT-MRN-02 estan detalladas todas estas técnicas.

La presencia simultánea de otros mecanismos de resistencia a betalactámicos, como la producción de BLEE o la pérdida de porinas, dificulta enormemente la interpretación de las pruebas fenotípicas de detección de AmpC plasmídica. Un marcador fenotípico muy utilizado para diferenciar la producción de AmpC de la de BLEE es la cefoxitina. Salvo algunas excepciones, los aislados con fenotipo AmpC son generalmente resistentes a cefoxitina,

mientras que los aislados productores de BLEE suelen ser sensibles, excepto cuando se produce la pérdida o una disminución en la expresión de alguna porina.

4.3. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

La emisión del informe microbiológico con una interpretación adecuada de los resultados de sensibilidad y de detección de AmpC es fundamental para la elección de un antimicrobiano que garantice su eficacia terapéutica. En los aislados en los que se ha detectado la producción de una AmpC plasmídica, tanto si éstos no tienen una AmpC cromosómica, como *Klebsiella* spp., *S. enterica* y *P. mirabilis*, como si la tienen, pero ésta no es inducible, como ocurre por ejemplo con *E. coli*, los valores de sensibilidad obtenidos *in vitro* deben informarse sin que sea necesaria la realización de una lectura interpretada de los mismos. En estos casos es aconsejable recomendar el uso de antimicrobianos alternativos a las cefalosporinas de tercera generación para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos con este fenotipo de resistencia AmpC, aunque no existen criterios

unificados ni consensuados sobre esta recomendación.

El CASFM recomienda que si las pruebas de sensibilidad antimicrobiana indican que el aislado presenta sensibilidad disminuida o resistencia a algunas de las cefalosporinas de tercera generación se informen todas ellas como resistentes (si presentan sensibilidad intermedia) o con sensibilidad intermedia (si son sensibles), independientemente de que el microorganismo produzca una AmpC cromosómica o una AmpC plasmídica. En el caso que sean sensibles a todas las cefalosporinas, se aconseja informar, particularmente con *Enterobacter* spp. y *C. freundii*, la posibilidad de que se produzca un fracaso terapéutico si el tratamiento se realiza con cefalosporias de tercera generación, por la selección de mutantes AmpC desreprimidos estables. Si después de 3-4 días de tratamiento antimicrobiano continúa aislándose la misma especie bacteriana se recomienda repetir las pruebas de sensibilidad para determinar si se ha producido un incremento en la resistencia a betalactámicos.

Tabla 5. Patrones de resistencia a antibióticos betalactámicos en algunas enterobacterias de interés clínico y epidemiológico. En sombreado gris se resalta los betalactámicos en los que existen diferencias entre el fenotipo natural o salvaje y el fenotipo AmpC.

Microorganismo	Fenotipo	Patrón de resistencia									Presencia localización <i>bla</i> _{AmpC}	y Nivel expresión <i>bla</i> _{AmpC}
		AMP	AMC	TIC	CFZ	CXM	FOX	CTX	FEP	IPM		
<i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i>	Salvaje	S	S	S	S	S	S	S	S	S	NO	NO
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	PI	Elevado
<i>Klebsiella</i> spp., <i>C. koseri</i>	Salvaje	R	S	R	S	S	S	S	S	S	NO	NO
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	PI	Elevado
<i>E. coli</i>	Salvaje	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Crom	NO o muy bajo
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Crom constitutiva/PI	Elevado
<i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i>	Salvaje	R	R	S	R	S/r	R	S	S	S	Crom inducible	Basal
	AmpC	R	R	R	R	R	R	R	S	S	Crom desreprimida/PI	Elevado
<i>Providencia</i> spp., <i>M. morganii</i> , <i>S. marcescens</i>	Salvaje	R	R	S	R	R	S	S	S	S	Crom inducible	Basal
	AmpC	R	R	R	R	R	R	r/R	S	S	Crom desreprimida/PI	Elevado

AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; TIC, ticarcilina; CFZ, cefazolina; CXM, cefuroxima; FOX, ceftioxitina; FEP, cefepima; IPM, imipenem; S, sensible; r, sensibilidad intermedia; R, resistencia; PI, plasmídica; Crom, cromosómica.

5. CARBAPENEMASAS

5.1. CLASIFICACIÓN, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CARBAPENEMASAS

En los últimos años se ha producido una gran alarma y preocupación por la gran dispersión de los bacilos gramnegativos resistentes a los carbapenémicos en los que el mecanismo implicado es la producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos trasferibles. Estas enzimas se denominan

genéricamente carbapanemasas y se agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010. En la tabla 6 se recogen estas enzimas, indicando las más relevantes y los microorganismos en los que se encuentran habitualmente. Asimismo, en las tablas 1 y 6 se muestran sus características más sobresalientes y que pueden utilizarse para su reconocimiento fenotípico.

Tabla 6. Clasificación general de las carbapenemasas.

Clase molecular ¹ (Grupo funcional ²)	Enzimas	Inhibición por		ATM	Microorganismos	Localización genética
		CLA	EDTA			
A (2f)	Sme, IMI, NmcA	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Crom
	KPC	+	-	R	Enterobacterias	PI
	GES	+	-	R	Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PI
B (3)	L1 CcrA Cpha BclI	-	+	S/R ³	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacteroides. fragilis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bacillus cereus</i>	Crom
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	S	Enterobacterias <i>Pseudomonas</i> spp. BGNNF	PI (Crom) ⁴
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	S	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterias	Crom, PI

¹Según la clasificación de Ambler, ²según la clasificación de Bush y Jacoby, 2010; ³puede aparecer resistente por la coexistencia con otros mecanismos de resistencia, ⁴ocasionalmente de codificación cromosómica. CLA, ácido clavulánico; ATM, aztreonam; BGNNF, bacilos gramnegativos no fermentadores; PI, plasmídica; Crom, cromosómica

Las primeras carbapenemasas de origen plasmídico se describieron en Japón en el año 1991 en *P. aeruginosa* y con posterioridad en diversas especies de enterobacterias, entre ellas *S. marcescens*, y también en *Pseudomonas putida* y *Achromobacter xylooxidans*. La enzima caracterizada se correspondía con una metalo-betalactamasa, y por tanto de clase B o grupo 3 de Bush y Jacoby, a la que se denominó IMP-1. El gen responsable se encontraba localizado en un integrón incluido en plásmidos transferibles. En la actualidad se conocen hasta 29 variantes en el grupo de las enzimas IMP y se han descrito con más frecuencia en *P. aeruginosa* que en las enterobacterias. Asimismo, en el año 1997 se detectó en Italia, también en *P. aeruginosa*, una enzima, igualmente de clase B, de carácter transferible que recibió el nombre de VIM-1 y cuyo gen se asocia a integrones de clase 1. Esta enzima se detectó con posterioridad en Corea en *S. marcescens* y en Grecia en *E. coli* y en *K.*

pneumoniae y está ampliamente distribuida en diferente países, sobre todo en Europa. Hasta la fecha se han descrito al menos 27 variantes, siendo VIM-2 una de las más difundidas, esencialmente en *P. aeruginosa* aunque también se ha encontrado en *A. baumannii* y en enterobacterias. En España se han descrito tanto enzimas del tipo IMP, en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, como del tipo VIM en diferentes enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo relevantes algunos brotes epidémicos descritos que demostraron en el estudio de la estructura poblacional la implicación de diferentes clones de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae*.

Las enzimas IMP y VIM tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos betalactámicos con la excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Sin embargo se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, compuestos

tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico, o el ácido dipicolínico. Con características similares se han descrito con posterioridad enzimas de los grupos SPM, GIM, SIM, AIM, DIM y KHM, y más recientemente la enzima NDM-1 que ha creado una importante alarma mediática debido al perfil mutirresistente o panresistente de los aislados que la producen. Esta enzima, cuyo origen podría situarse en la India, se detectó por primera vez en *K. pneumoniae* en un paciente en Suecia que procedía de la India. Se ha descrito en otros países en Europa, incluyendo España (aunque de forma anecdótica), no solo en esta especie sino también en *E. coli* y en otras enterobacterias y asimismo en *Acinetobacter* spp. El perfil hidrolítico que presenta esta enzima es similar al de otras metalo-betalactamasas. Se ha descrito una variante de ésta denominada NDM-2.

Otro grupo importante de carbapenemasas son las de clase A (grupo 2f). La primera carbapenemasa de clase A era de naturaleza cromosómica y fue detectada por vez primera en 1982, incluso antes de la comercialización de los carbapenémicos. Esta enzima, denominada SME, se encontró por vez primera en *S. marcescens* y después en *E. cloacae* tanto en casos esporádicos como asociados a pequeños brotes epidémicos. Existen al menos tres variantes (SME-1, -2 y -3) que confieren un fenotipo con pérdida marcada de sensibilidad a los carbapenémicos y un perfil hidrolítico que incluye el aztreonam y en menor medida o inexistente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. No son inhibidas por el EDTA pero como peculiaridad destaca la inhibición parcial por ácido clavulánico (mejor con tazobactam). Otras enzimas relacionadas son las de los grupos IMI (IMI-1 y -2) y NMC-A encontradas inicialmente en diferentes especies del género *Enterobacter*. No obstante, dentro de las carbapenemasas de clase A, las que mayor importancia epidemiológica tienen son las denominadas KPC que reciben este nombre por haberse encontrado inicialmente en *K. pneumoniae* (KPC = *K. pneumoniae* carbapenemases). La primera de estas enzimas se describió en los Estados Unidos en 1996 y después en otras áreas geográficas en pacientes que previamente habían estado ingresados en este país y que habrían dado lugar a brotes importantes como en Israel. También se ha aislado en numerosos países de Europa, en la India y en América del Sur. Por el momento se conocen once variantes, siendo KPC-1 y KPC-2 las descritas con mayor frecuencia. Son de naturaleza plasmídica asociadas al trasposón *Tn4401*. Asimismo, y aunque no de manera exclusiva, se han encontrado mayoritariamente ligadas a la secuencia tipo (ST) 258 de *K. pneumoniae*. Las enzimas KPC se han descrito no solo en *Enterobacteriaceae* sino también en *P. aeruginosa* y en *A. baumannii*. En España su aparición ha sido más tardía y no está ligada al clon ST258.

Desde el punto de vista fenotípico, las enzimas KPC hidrolizan de forma eficiente penicilinas,

cefalosporinas y carbapenémicos. Como excepción tendrían una menor tasa de hidrólisis de las cefamicinas (cefoxitina) aunque los valores de CMI que se obtienen suelen estar por encima del punto de corte de sensibilidad. No se inhiben por el ácido clavulánico pero sí por el ácido borónico, inhibidor que se utiliza para el reconocimiento fenotípico. No obstante, la inhibición por el ácido borónico no es exclusiva de las enzimas KPC ya que también es un inhibidor eficiente de las betalactamasas de tipo AmpC (Clase C de Ambler y grupo 1 de Bush y Jacoby) y que con la excepción del enzima CMY-10 no hidrolizan carbapenémicos.

Dentro de las carbapenemasas de clase A deben citarse también algunas variantes de las BLEE de tipo GES como GES-4 encontrada en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y en enterobacterias que hidroliza de forma eficiente penicilinas y cefalosporinas y muy débilmente a los carbapenémicos. Su importancia epidemiológica es mucho menor que las KPC.

En el grupo de las OXA (clase D de Ambler y 2df de Bush y Jacoby) también se encuentran variantes que hidrolizan los carbapenémicos. Entre ellas destacan las variantes de los subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y, en menor medida, OXA-51 descritas en *Acinetobacter* spp. y sobre todo la OXA-48 descrita en enterobacterias en países del entorno mediterráneo. La detección fenotípica de OXA-48 es compleja ya que la hidrólisis de los carbapenémicos es poco eficiente y prácticamente inexistente para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. El perfil de sensibilidad que confieren mantiene las características generales de las OXA al ser poco inhibida por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Por ello, en un antibiograma habitual de *K. pneumoniae* o *E. coli*, enterobacterias en las que mayoritariamente se ha encontrado la OXA-48, se mostrarían resistentes a las penicilinas y sus asociaciones con los inhibidores de betalactamasas de clase A, serían sensibles a las cefalosporinas y mostrarían pérdida de sensibilidad a los carbapenémicos. Recientemente se ha comunicado en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* un nuevo enzima tipo OXA, OXA-181 que deriva de OXA-48 pero que tendría un perfil hidrolítico más amplio que ésta.

En *Acinetobacter* spp. los aislados que presentan OXA-23, OXA-24, OXA-58 u OXA-143 suelen presentar en el antibiograma unos valores de CMI elevados a los carbapenémicos pero cuando se transfieren a *E. coli* el perfil es muy similar al que confiere la OXA-48. Este hecho demuestra la posible superposición de otros mecanismos de resistencia (alteración de la permeabilidad, modificación de PBPs o expresión de otras betalactamasas) que incrementan los valores de las CMI. También se verificó, en ensayos espectrofotométricos, que la hidrólisis de los carbapenémicos es débil y escasa o nula para las cefalosporinas.

En *P. aeruginosa* las carbapenemasas de tipo OXA tienen menos importancia que en el género *Acinetobacter*. Se ha descrito OXA-40 y como

curiosidad, se ha identificado el gen *poxB* en su cromosoma con secuencia similar a OXA-50 pero que en condiciones normales parece no expresarse.

5.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta el perfil hidrolítico general que confiere cada una de sus clases y de manera específica cada una de las enzimas incluidas en estas clases, la posible inhibición por los diferentes inhibidores de betalactamasas, la epidemiología local y la identidad del microorganismo en el que se pretende detectar o inferir la producción de estas enzimas. En este último punto es esencial valorar la posible presencia de otros mecanismos de resistencia que puedan “enmascarar” el fenotipo que confieren las carbapenemasas, entre ellos la alteración de la permeabilidad, la presencia de bombas de expulsión, afectación de las PBPs o presencia simultánea de otras betalactamasas. En este sentido, no es igual la expresión de una carbapenemasa en *P. aeruginosa* o en *A. baumannii* que en *E. coli*, *K. pneumoniae* o en una cepa de *E. cloacae*. Cada una de estas especies tiene sus peculiaridades fenotípicas naturales que deben ser contempladas.

Asimismo, la expresión de las carbapenemasas no es siempre homogénea y se producen fenómenos de heterorresistencia. Este hecho se ha demostrado claramente con las enterobacterias y las metalo-betalactamasas que hace que los valores de CMI no sean en ocasiones reproducibles y se sitúen en un amplio rango de concentraciones, incluso por debajo del punto de corte de sensibilidad. No obstante, estas CMI también pueden ser muy elevadas por la superposición con otros mecanismos de resistencia.

Desde un punto de vista práctico y una vez observado en el antibiograma la expresión de un fenotipo compatible con la presencia de una carbapenemasa, generalmente ilustrado por la sensibilidad disminuida o resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro y a alguno de los carbapenémicos, es importante verificar que existe un mecanismo de inactivación de los carbapenémicos (figura 5). Se recomienda investigar este hecho en las cepas en las que los valores de CMI de los carbapenémicos se incrementan por encima de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos (aquellos que separan las poblaciones salvajes de aquellas que presentan mecanismos de resistencia). El método de referencia, no siempre al alcance de todos los laboratorios de microbiología, sería el ensayo espectrofotométrico, por lo que se han propuesto métodos biológicos (bioensayos) sencillos que permiten su detección. La prueba modificada de Hodge, basada en la diseñada inicialmente por Gots *et al.* en 1945 para detectar la producción de penicilinas en *S. aureus*, fue recomendada por vez primera por el CLSI en el año 2009 como test fenotípico de confirmación. La descripción técnica de

su desarrollo se incluye en el procedimiento PNT-MRN-03 de este documento. Tiene una elevada sensibilidad pero no sirve para la diferenciación del tipo de carbapenemasa. En el caso de *K. pneumoniae* productora de KPC la sensibilidad es superior al 90%. También se ha ensayado con otras carbapenemasas, incluida la NDM-1, ofreciendo igualmente resultados positivos. En el caso de las carbapenemasas de tipo OXA, el test de Hodge es menos útil que con las metalo-betalactamasas o las KPC ya que la hidrólisis de los carbapenémicos es más débil.

A pesar de su sencillez, el test de Hodge modificado tiene detractores por las discordancias observadas con algunas cepas. Se han observado resultados falsos negativos por la baja expresión de la carbapenemasa, sobre todo con cepas con metalo-betalactamasas y oxacilinasas. No obstante, los falsos negativos pueden evitarse añadiendo sulfato de zinc al medio que incrementa la expresión del enzima (en el caso de las metalo-betalactamasas).

También se han comunicado falsos positivos con cepas productoras de CTX-M-15 y pérdida de porinas y con las cepas hiperproductoras de AmpC. Asimismo, se ha discutido cuál es el carbapenémico más adecuado para el test de Hodge modificado, recomendándose la utilización de meropenem y ertapenem en detrimento del imipenem.

Además del test de Hodge modificado, se han propuesto, aunque con mucho menos éxito, otras pruebas basadas en el test de Masuda que consisten en una difusión con discos utilizando un microorganismo indicador sensible a carbapenémicos (por ejemplo *E. coli* ATCC 25922). Es necesario lisar la bacteria a estudiar y colocar el extracto obtenido en un disco de papel que se sitúa en el extremo del halo de inhibición del antibiótico indicador (en este caso un carbapenémico). Si la bacteria produce carbapenemasa distorsionará el halo de inhibición del carbapenémico.

Para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas directamente de muestras clínicas se ha propuesto la utilización de medios cromogénicos, entre ellos los que se emplean para la detección de BLEE y los que específicamente se han diseñado para la detección de KPC. Los medios cromogénicos para BLEE detectan la presencia de microorganismos con carbapenemasas de las clases A y B, pero no las cepas que tienen OXA-48. No obstante tienen el inconveniente de ser poco específicos dado que en ellos también crecen los microorganismos productores de BLEE. Este hecho ha de tenerse en cuenta en aquellas áreas geográficas en las que este tipo de enzimas es muy prevalente ya que pueden enmascarar la presencia de microorganismos con carbapenemasas. Los medios cromogénicos específicos para carbapenemasas como el CHROMagar™ KPC tienen una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de cepas con enzimas tipo VIM y KPC directamente de muestras rectales, si bien no discriminan el tipo de carbapenemasa.

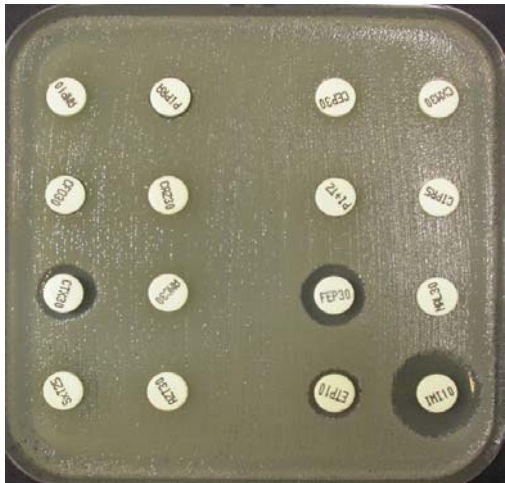
Figura 5. Patrones de resistencia esperados en A) cepa portadora de una metalo-betalactamasa tipo VIM (imagen de *Klebsiella pneumoniae* portadora de VIM-1) y en B) cepa portadora de una carbapenemasa de clase A tipo KPC (imagen de *Klebsiella pneumoniae* portadora de KPC-1).

A)



	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	4->256	R
Piper/Tazo (PI+TZ)	4->256	R
Amox/clav (AMC)	32->64	R
Cefalotina (CEP)	>128	R
Cefoxitina (CFO)	128->256	R
Cefuroxima (CXM)	>256	R
Cefotaxima (CTX)	8->64	R
Ceftazidima (CAZ)	16->256	R
Cefepima (FEP)	0,06-32	S/R
Aztreonam (AZT)	0,12-2	S
Imipenem (IMI)	0,25-8	r/R

B)



	CMI (mg/L)	Valor
Ampicilina (AMP)	>256	R
Ticarcilina	>256	R
Piperacilina (PIPRA)	16->256	r/R
Piper/Tazo (PI+TZ)	16-128	r/R
Amox/clav (AMC)	64-128	r/R
Cefalotina (CEP)	>256	R
Cefoxitina (CFO)	16->128	r/R
Cefuroxima (CXM)	>256	R
Cefotaxima (CTX)	0,25-64	r/R
Ceftazidima (CAZ)	0,5-32	S/r/R
Cefepima (FEP)	0,5->32	S/r/R
Aztreonam (AZT)	0,5->64	S/r/R
Imipenem (IMI)	1->32	r/R

5.3 DIFERENCIACIÓN FENOTÍPICA DE LAS DIFERENTES CARBAPENEMASAS

Una vez confirmado que la cepa problema produce una enzima que inactiva los carbapenémicos es preciso diferenciar el tipo de carbapenemasa. Hay que tener presente que algunas carbapenemasas producen niveles bajos de resistencia. En

Enterobacteriaceae utilizando diferentes inhibidores puede seguirse el esquema como el que se incluye en la figura 6. En la tabla 7 se indican ejemplos de fenotipos asociados con diferentes carbapenemasas en *E. coli*.

Figura 6. Identificación fenotípica de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas.

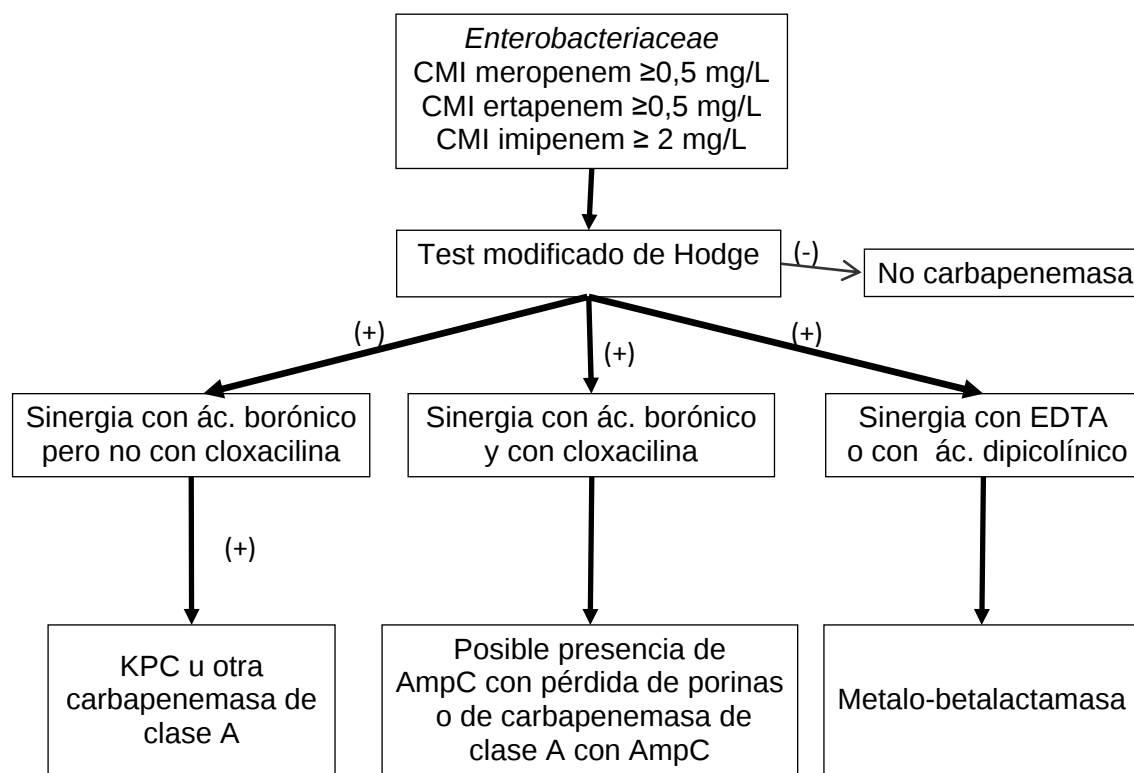


Tabla 7. Fenotipos asociados a la presencia de carbapenemasas (datos obtenidos en *E. coli* una vez transferido el gen responsable por conjugación o transformación). La interpretación se ha realizado según los criterios de EUCAST (versión 1.3, 2011).

Antibiótico	CMI (mg/L) (Interpretación)				
	Clase A			Clase B	Clase D
	Sme-1	KPC-1	GES-4	VIM-1	OXA-48
Ampicilina	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)	>128 (R)
Amox/clav	128 (R)	>32 (R)	>128 (R)	-	>128 (R)
Ticarcilina	>128 (R)	-	>128 (R)	-	>128 (R)
Piperacilina	-	-	64 (R)	128 (R)	64 (R)
Piper/tazob	-	128 (R)	16 (I)	-	64 (R)
Cefazolina ¹	>128	-	-	-	8
Cefoxitina ¹	16	16	>128	128	4
Cefotaxima	0,25 (S)	16 (R)	1 (S)	64 (R)	0,25 (S)
Ceftazidima	1 (S)	8 (R)	64 (R)	128 (R)	0,12 (S)
Cefepima	0,12 (S)	-	0,25 (S)	32 (R)	0,25 (S)
Aztreonam	64 (R)	>64 (R)	2 (I)	0,25 (S)	0,06 (S)
Imipenem	32 (R)	8 (R)	0,25 (S)	2 (S)	2 (S)
Meropenem	2 (S)	4 (I)	0,25 (S)	1 (S)	0,25 (S)

¹ No existen criterios de interpretación de EUCAST para estos antibióticos

En el caso de las metallo-betalactamasas se aprovecha que no hidrolizan el aztreonam (y por tanto aparecen sensibles en el antibiograma) y la posible sinergia entre los carbapenémicos y EDTA o entre ceftazidima y EDTA para inferir su presencia (ver procedimiento PNT-MRN-03). No obstante, con frecuencia las cepas con metallo-betalactamasas también producen BLEE siendo resistentes a este antibiótico. Se han diseñado pruebas de

aproximación de discos, discos de carbapenémicos combinados con EDTA y tiras de Etest con un carbapenémico y EDTA para identificar fenotípicamente estas enzimas. En algunos casos se añade además fenantrolina o se sustituye EDTA por compuestos tiólicos como el ácido mercapto-propiónico para mejorar la sensibilidad de la prueba. También se ha ensayado el ácido dipicolínico con buenos resultados.

En el método de aproximación de discos es importante “acertar” con la distancia entre los discos del carbapenémico y el inhibidor, sobre todo en las cepas con baja expresión de la carbapenemasa en las que los halos de inhibición son amplios. Por este motivo existen métodos que incluyen directamente el inhibidor en el mismo disco que el carbapenémico y se compara el halo de inhibición resultante con el que se produce con el carbapenémico solo. Este mismo principio se utiliza con las tiras de Etest que en un extremo contienen imipenem y en el otro imipenem con EDTA. Por diferencia entre los valores de CMI de imipenem sin y con inhibidor se puede inferir la presencia de las carbapenemasas. La sinergia con EDTA puede dar lugar a falsos positivos, sobre todo en *P. aërruginosa* y *Acinetobacter* spp., aunque puede evitarse añadiendo Zn^{2+} al medio de cultivo. Asimismo, los sistemas expertos de determinados sistemas automáticos son también útiles para la detección de la metalo-betalactamasas, incluida la NDM-1.

Las KPC se muestran resistentes al aztreonam y no se inhiben por el EDTA pero sí por el ácido borónico y discretamente por el ácido clavulánico. No se recomienda utilizar ácido clavulánico por su baja sensibilidad. La utilización del ácido borónico tiene como inconveniente el ser también un buen inhibidor de AmpC, circunstancia que dificulta la detección de las KPC cuando está presente esta enzima (por ejemplo en *E. cloacae*). Se ha propuesto utilizar simultáneamente una prueba de discos combinados con cloxacilina para demostrar la presencia de estas betalactamasas tipo AmpC (ver apartado 4.2). La sinergia con ácido borónico en las cepas productoras de KPC se puede demostrar con los carbapenémicos y también con cefalosporinas de amplio espectro, preferentemente con cefepima. Se han diseñado pruebas que añaden ácido borónico directamente a los discos y que utilizan 300 o 400 µg de este compuesto, aunque también se ha propuesto una concentración de 600 µg y comparar los halos de inhibición con los del carbapenémico sin el ácido borónico (ver PNT-MRN-03). También se puede observar esta sinergia con pruebas de aproximación de discos. Aunque se han propuesto diferentes compuestos derivados del borónico, se prefiere el ácido fenil-borónico al 3'-amino-fenil-borónico por su mayor capacidad inhibitoria. Asimismo, como sustrato se recomienda preferentemente utilizar meropenem o imipenem ya que con ertapenem pueden observarse resultados falsos positivos cuando el microorganismo estudiado produce AmpC, incluidas las AmpC plasmídicas.

Para las carbapenemasas de tipo OXA no es posible utilizar un método fenotípico como el propuesto con las carbapenemasas de clase A o B ya que no existen inhibidores específicos de enzimas de clase D. Por este motivo, se recomienda confirmar la presencia de estas enzimas por medio de métodos moleculares.

Uno de los problemas a los que se enfrenta el esquema propuesto de diferenciación del tipo de

carbapenemasa utilizando diferentes inhibidores es el creciente aumento de microorganismos que producen más de un tipo de betalactamasa, incluidas las cepas productoras de metalo-betalactamasas y carbapenemasas de clase A e incluso algunas simultáneamente con BLEE (mayoritariamente CTX-M o SHV) y AmpC plasmídicas (generalmente de tipo CMY). Para las cepas de *Enterobacteriaceae* que producen KPC y VIM simultáneamente se recomienda utilizar en una misma placa una prueba de discos combinados con los dos inhibidores en discos independientes y en el mismo disco. Se ha propuesto también una prueba similar para las cepas con KPC que produzcan simultáneamente una BLEE pero en este caso se utiliza ácido borónico y ácido clavulánico por separado y simultáneamente en el mismo disco indicador con cefalosporinas.

5.4. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

Con respecto a los antibióticos betalactámicos existen controversias acerca de su utilización cuando los valores de CMI (o halos de inhibición) se encuentran por debajo del punto de corte de sensibilidad, circunstancia bastante habitual para los carbapenémicos y las carbapenemasas de tipo VIM y en menor medida para las KPC. El CLSI y EUCAST recomiendan taxativamente informar la sensibilidad a los carbapenémicos en función de los puntos de corte de sensibilidad establecidos, algo inferiores en el caso del CLSI, sin modificar la interpretación. Esta recomendación está fundamentada en las modelizaciones de PK/PD y la experiencia clínica recogida hasta la fecha. Asimismo, también se basa en el propio concepto de lo que representa un punto de corte; sirve para establecer categorías clínicas de tratamiento y no están encaminados a la detección de mecanismos de resistencia. No obstante, los nuevos puntos de corte de carbapenémicos, sobre todo en *Enterobacteriaceae*, están muy cercanos a los puntos de corte de vigilancia epidemiológica, circunstancia que facilita la detección fenotípica de las carbapenemasas (tabla 8). A pesar de ello, y debido a que la información clínica es todavía muy escasa, muy variable la expresión de las enzimas y baja reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad, sobre todo con los métodos automáticos y muy diferente la frecuencia de este tipo de microorganismos según áreas geográficas, en muchos laboratorios se siguen recomendaciones locales o criterios interpretativos que transforman la categoría sensible de los carbapenémicos a resistente cuando se identifica la presencia de una carbapenemasa (como se hacía con las cefalosporinas de amplio espectro y las cepas que presentaban BLEE con anterioridad al cambio de los puntos de corte).

En el caso de las metalo-betalactamasas y dado que no hidrolizan el aztreonam podría sugerirse este antibiótico como tratamiento de elección. Sin embargo, en la práctica no suelen ser sensibles debido a la producción simultánea de BLEE o

betalactamasas plasmídicas de tipo AmpC, o en el caso de *Enterobacter* spp. o *P. aeruginosa* a la hiperproducción de AmpC cromosómica.

Un caso particular lo constituirían las carbapenemasas de tipo OXA, esencialmente OXA-48, ya que presentan una ligera pérdida de sensibilidad a los carbapenémicos (suficiente en muchos casos para que se categoricen como resistentes) pero que por su perfil hidrolítico aparecen sensibles a las cefalosporinas de amplio espectro, por lo que se deberían informar como sensibles en espera de estudios clínicos que avalen la modificación de las interpretaciones.

Los microorganismos productores de carbapenemasas suelen tener un perfil multirresistente que incluye los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y el cotrimoxazol, circunstancia que restringe sus posibilidades terapéuticas. Este hecho es debido a que en muchos de los casos, los determinantes genéticos que codifican las carbapenemasas están presentes en integrones, siendo relativamente frecuente la presencia de

genes de resistencia a aminoglucósidos (codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos o metilasas) o trimetoprim (codifican dihidrofolato reductasas) y su inherente relación con genes *sul* de resistencia a sulfamidas. También presentar genes de resistencia transferibles (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*) o mutaciones en las topoisomerasas que afectan a la actividad de la quinolonas. Como opciones alternativas se ha sugerido la tigeciclina y la colistina, aunque debe documentarse su sensibilidad con un antibiograma ya que los microorganismos productores de carbapenemasas pueden ser igualmente resistentes. En el caso de *K. pneumoniae* la pérdida de sensibilidad a tigeciclina se produce con mayor facilidad debido a problemas que afectan a su entrada al interior de la bacteria. Se ha recomendado también fosfomicina o nitrofurantoína, sobre todo en el caso de las infecciones urinarias, que debe guiarse por el antibiograma y su interpretación por los puntos de corte correspondientes

Tabla 8. Puntos de corte actuales para *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* del CLSI y EUCAST

Microorganismo	Antimicrobiano	CLSI (2010) ¹		EUCAST (2011) ²		
		S	R	S	R	ECOFF ³
<i>Enterobacteriaceae</i>	Imipenem	≤1	≥4	≤2	>8	≤0,5 / ≤1 ⁴
	Meropenem	≤1	≥4	≤2	>8	≤0,125
	Ertapenem	≤0.25	≥1	≤0,5	>1	≤0,06
	Doripenem	≤1	≥4	≤1	>4	≤0,12
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	≤4	≥16	≤4	>8	≤4
	Meropenem	≤4	≥16	≤2	>8	≤2
	Ertapenem	-	-	-	-	-
	Doripenem	-	-	≤1	>4	≤1

¹ Documento M100-S20-U, junio de 2010 (*Enterobacteriaceae*) y Documento M100-S20 (*P. aeruginosa*);

²versión 1.3, enero 2011; ³punto de corte epidemiológico; ⁴*E.coli* / *K. pneumoniae*.

6. RESISTENCIA A QUINOLONAS

6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS

Las quinolonas ejercen su acción bloqueando las topoisomerasas II (ADN-girasa) y IV, enzimas necesarias en los procesos de replicación, recombinación y transcripción del ADN. Ambas son enzimas tetraméricas compuestas por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la ADN-girasa, y *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV. Las topoisomerasas se acoplan al ADN, provocan un corte en las dos hebras de ADN que posteriormente es reparado, quedando de nuevo libres para una nueva reacción. Las fluoroquinolonas, se unen al ADN roto y a la topoisomerasa formando un complejo ternario quinolona-ADN-topoisomerasa de forma irreversible, impidiendo que el proceso de transcripción o replicación continúe. Su acción sobre las topoisomerasas no explica por sí sola su potente acción bactericida, se acepta que ésta es debida a

procesos secundarios mal conocidos, entre los que la activación del sistema de reparación SOS parece jugar un papel importante.

Las quinolonas son junto a los betalactámicos los antibióticos de mayor uso, y las tasas de resistencia a los mismos han aumentado mucho en los últimos años en prácticamente todo el mundo. Hasta hace poco tiempo, los principales mecanismos de resistencia conocidos a fluoroquinolonas se podían resumir en dos: mutaciones en los genes de las topoisomerasas y disminución en la acumulación del antibiótico en el interior de la célula por la presencia de bombas de expulsión activa o por disminución de la permeabilidad de la membrana externa (por mutaciones que afectan a las porinas o por alteraciones del lipopolisacárido).

Normalmente la resistencia clínica en enterobacterias se alcanza por una acumulación de mutaciones en los genes de las topoisomerasas, fundamentalmente *gyrA* y *parC*, que provocan incrementos adicionales en las CMI de las quinolonas. Estas mutaciones se concentran en una

región denominada QRDR (*quinolone-resistance-determining-region*), que codifica aminoácidos próximos al sitio activo de ambas enzimas, donde un residuo de tirosina se une de forma covalente a una hebra rota de ADN. Ser83 y Asp87 en GyrA, y Ser79 y Asp83 en ParC son sitios de mutación asociados a resistencia particularmente frecuentes. Estas mutaciones darán lugar a topoisomerasas con menor afinidad por las quinolonas que se traducen en un aumento de los valores de CMI de todos estos compuestos. El nivel de resistencia es variable, dependiendo de la diana afectada y del número de mutaciones acumuladas. En general, en las enterobacterias, una única mutación en *gyrA* es suficiente para provocar resistencia de alto nivel a ácido nalidíxico (CMI >32 mg/L) y una disminución de la sensibilidad al resto de las fluoroquinolonas que presentarían valores de CMI entre 0,125 y 1 mg/L (sensible según puntos de corte del CLSI). Sin embargo, mutaciones adicionales en *gyrA* y *parC* aumentarán progresivamente esos valores de CMI, aunque no de forma uniforme en todas las fluoroquinolonas. Mucho menos frecuentes son las mutaciones descritas en *gyrB* y *parE*.

Otros mecanismos de resistencia como la hiperexpresión de bombas de expulsión activa o las alteraciones de las porinas causan un nivel de resistencia bajo, pero la resistencia puede incrementarse si se asocia una mutación en *gyrA*. Se han descrito varios sistemas de expulsión activa, de los que AcrAB-TolC en enterobacterias, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM en *P. aeruginosa* son los más conocidos.

Desde 1998 se empezaron a describir mecanismos de resistencia de origen plasmídico, como la protección de la diana por proteínas Qnr, la modificación de las quinolonas por la acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr, o las bombas de expulsión activa QepA y OqxAB. Las proteínas Qnr, pertenecientes a la familia de los pentapéptidos repetidos, se caracterizan por la presencia de repeticiones en tándem de una serie semiconservada de 5 aminoácidos [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr o Arg] [Gly]. Hasta la fecha se han descrito varios tipos de Qnr codificados por genes de origen plasmídico: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*. Su mecanismo de acción, basado en la protección de la ADN-girasa y de la topoisomerasa IV, se ha estudiado con mucho detalle en cepas que poseen el gen *qnrA1*, y se presume un modo de acción similar para el resto de las proteínas Qnr. El nivel de resistencia que causa Qnr es moderado, y no produce por sí solo plena resistencia según los puntos de corte del CLSI para enterobacterias (≥ 4 mg/L para ciprofloxacino). En ensayos de conjugación, los valores de CMI de ciprofloxacino frente a transconjugantes con *qnrA1* están entre 0,125 y 2 mg/L, que representa un aumento de 16 a 250 veces con respecto a la CMI en el receptor, un aumento superior al observado en la CMI de ácido nalidíxico. El punto de corte que el CLSI establece para el ácido nalidíxico en

enterobacterias (resistente ≥ 32 mg/L) está muy próximo a las CMI que presentan los aislados de *E. coli* con "fenotipo salvaje" o sin mecanismos de resistencia adquiridos (1-8 mg/L), en contraste con lo establecido para las fluoroquinolonas como ciprofloxacino ($R \geq 4$ mg/L), muy distante de lo que habitualmente se encuentra en los aislados "salvajes" (0,004-0,032 mg/L en *E. coli*). Por ello, aunque las proteínas Qnr pueden provocar resistencia al ácido nalidíxico y no a fluoroquinolonas según los criterios del CLSI, el aumento relativo de CMI que se observa es mucho mayor en las fluoroquinolonas.

Además, se han detectado diferentes genes homólogos a los *qnr* en el cromosoma de diferentes bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (*Shewanella algae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, diferentes especies del género *Vibrio* y otras bacterias ambientales), lo que sugiere que los genes *qnr* circulantes en elementos genéticos móviles se han originado desde estas bacterias ambientales, tal vez por la presión que ha ejercido el uso masivo de las quinolonas.

En 2005 se demostró la modificación enzimática de algunas quinolonas mediante una acetiltransferasa codificada por un gen plasmídico variante del gen *aac(6')-Ib* (responsable de resistencia a kanamicina, tobramicina y amikacina) que se denominó *aac(6')-Ib-cr* (de *ciprofloxacin resistance*). Esta acetiltransferasa aumenta en 3-4 veces las CMI de algunas quinolonas como ciprofloxacino y norfloxacino.

En 2002 se describe el sistema de expulsión activa de codificación plasmídica QepA (*quinolone-efflux-pump*). Causa un aumento moderado en el nivel de resistencia a norfloxacino y ciprofloxacino, y no afecta de forma significativa al ácido nalidíxico ni al resto de fluoroquinolonas. En transconjugantes de *E. coli* se observa un aumento de las CMI de ácido nalidíxico, ciprofloxacino y norfloxacino en 2, 32 y 64 veces respectivamente.

Se ha descrito otra bomba de expulsión activa, OqxAB, en enterobacterias aisladas en animales de granja, fundamentalmente cerdos, y se caracteriza por conferir resistencia de alto nivel a olaquinox (usado como promotor de crecimiento en animales) y un aumento muy moderado de las CMI de ácido nalidíxico y ciprofloxacino (8-16 veces). Solo recientemente se ha descrito el gen plasmídico *oqxAB* en un aislado humano de *E. coli* en Corea, pero también se detecta en el cromosoma de *K. pneumoniae* con diferentes niveles de expresión que se correlacionan con los niveles de resistencia a olaquinox y cuya función biológica se desconoce.

Las proteínas Qnr y la acetiltransferasa se han identificado en prácticamente todos los países en los que se han buscado (con frecuencias desde menos del 1% hasta el 40% de las cepas estudiadas), con variaciones en el predominio de los distintos genes en función de la zona geográfica, el microorganismo y el fenotipo de resistencia considerado como criterio de búsqueda. Varios estudios han demostrado

diferencias en los valores de CMI de quinolonas en las cepas portadoras de genes de resistencia plasmídicos, y puede deberse a la existencia de mecanismos adicionales de resistencia, variación del número de copias del gen o diferencias en el nivel de transcripción.

Aunque la resistencia a quinolonas mediada por genes plasmídicos es de bajo nivel, se ha observado (tanto *in vitro* como *in vivo*) que facilitan la selección de mecanismos adicionales de resistencia, que contribuirán a un mayor nivel de resistencia. En un ensayo se comprobó que la expresión adicional del gen *qnrA* en una cepa deficiente en porinas lleva a un aumento de las CMI de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de 8 a 32 veces, pasando las CMI de estas quinolonas de 0,25-0,5 a 4-8 mg/L. Los genes plasmídicos permiten a la bacteria con bajo nivel de resistencia sobrevivir y emerger durante el tratamiento con fluoroquinolonas. Se ha demostrado que en cepas con Qnr aumenta la concentración preventiva de mutantes (CPM), es decir, la concentración de antibiótico a la cual se previene la aparición de mutantes resistentes al mismo.

En el caso de algunas especies como *A. baumannii* o *P. aeruginosa*, presentan un nivel basal de resistencia natural superior al de las enterobacterias por una menor permeabilidad de la membrana o por una mayor importancia de las bombas de expulsión, por ello un número menor de mutaciones en las topoisomerasas puede causar resistencia a fluoroquinolonas. Es conocido el especial riesgo en *P. aeruginosa* de selección de mutantes resistentes tras tratamiento con fluoroquinolonas.

La resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* presenta características particulares, fundamentalmente en el hecho de que las mutaciones en los genes de las topoisomerasas no parecen jugar un papel importante. Mayor relevancia tienen las bombas de expulsión activa o la disminución de la permeabilidad en la resistencia a estos agentes. También se ha descrito un gen *qnr* cromosómico denominado *Smqnr*. Todo ello puede explicar un fenotipo inusual en gramnegativos pero frecuente en *S. maltophilia*, consistente en sensibilidad a ácido nalidíxico y resistencia a

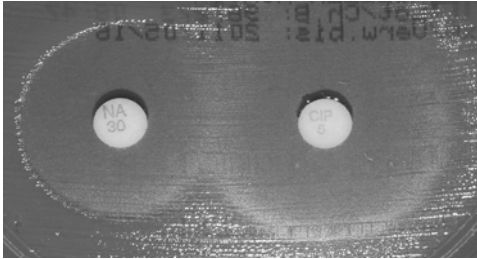
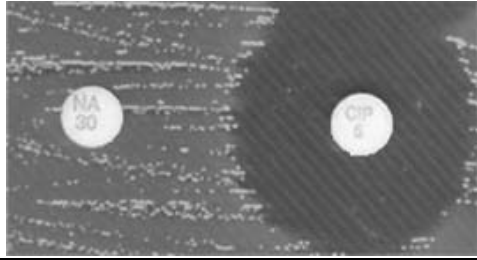
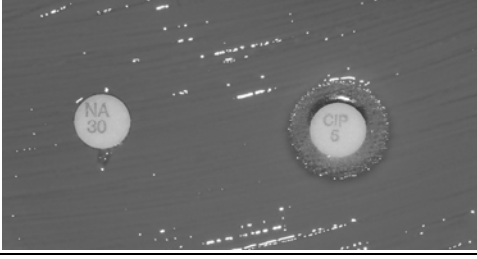
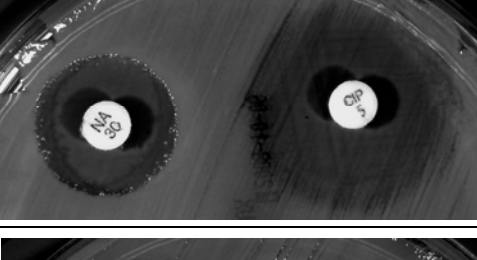
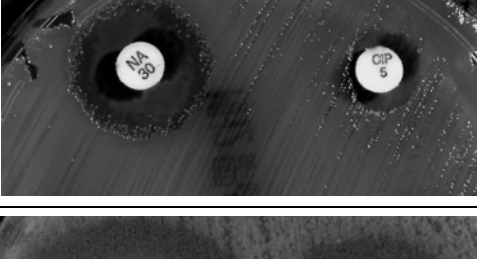
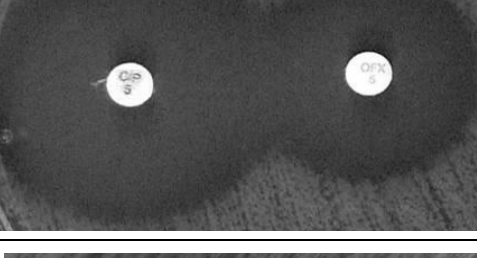
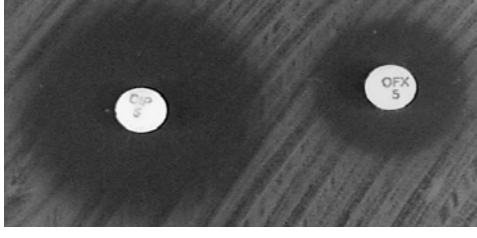
ciprofloxacino, lo que no implica resistencia al resto de las fluoroquinolonas.

6.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS

Como se ha comentado previamente, los mecanismos cromosómicos de resistencia van apareciendo secuencialmente, y el uso de quinolonas es por tanto uno de los factores más importantes en la selección de aislados de *E. coli* con resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas. En cuanto a la detección de determinantes plasmídicos de resistencia, cada vez más importantes, no existen marcadores fenotípicos claros para reconocerlos, ya que pueden estar presentes tanto en cepas sensibles como resistentes, y su detección debe hacerse por métodos moleculares, no siempre accesibles. En los últimos años se ha observado que algunas enterobacterias presentan sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas siendo sensibles a ácido nalidíxico, situación que en muchos casos se ha relacionado con la presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas. Se hace necesario implementar las estrategias de detección en aislados con bajo nivel de resistencia (pero sensibles según los puntos de corte vigentes), con gran riesgo de selección de nivel más alto de resistencia. En este sentido, es importante que los paneles de antibiograma comerciales para los sistemas automáticos tengan suficientes pocillos con bajas concentraciones de quinolonas, con el fin de detectar pequeños niveles de resistencia, y alertar en este caso de un posible fracaso terapéutico aunque las CMI estén dentro de la categoría de sensible según los puntos de corte clínicos vigentes.

Los resultados de sensibilidad al ácido nalidíxico y ciprofloxacino son suficientes para el estudio de mecanismos de resistencias a quinolonas en enterobacterias, *Haemophilus* spp. y *Neisseria* spp. En el caso de la microdilución, concentraciones de 4, 8, 16 y 32 mg/L de ácido nalidíxico y 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 mg/L de ciprofloxacino son adecuadas para este propósito. Las tiras de Etest son una herramienta idónea por su amplia escala de concentraciones de antibiótico, aunque el método de difusión con discos es una alternativa barata y válida para su uso en la rutina diaria (figura 7).

Figura 7. Diferentes patrones de sensibilidad esperados según el mecanismo de resistencia.

	<i>E. coli</i> “salvaje” sin mutaciones en las topoisomerasas
	<i>E. coli</i> con una mutación en <i>gyrA</i>
	<i>E. coli</i> con una mutación en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
	<i>E. coli</i> con <i>qnrA</i> sin mutaciones en los genes de las topoisomerasas.
	<i>E. cloacae</i> con <i>qnrS</i> sin mutaciones en las topoisomerasas, posiblemente asociado a disminución de la acumulación intracelular del antimicrobiano.
	<i>P. aeruginosa</i> “salvaje” sin mutaciones en las topoisomerasas, y con expresión basal de las bombas de expulsión activa. En <i>P. aeruginosa</i> y bacilos gramnegativos no fermentadores en general, no es útil el ácido nalidíxico por la resistencia intrínseca a este compuesto. En la imagen se incluye ofloxacino (OFX).
	<i>P. aeruginosa</i> con hiperexpresión de bomba de expulsión activa Mex EF-OprN

6.3. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

Resistencia de alto nivel al ácido nalidíxico y sensibilidad a ciprofloxacino. Presumiblemente presentan ya una mutación en *gyrA*, por lo que es importante informar el riesgo de seleccionar mutantes con resistencia a fluoroquinolonas tras tratamiento con las mismas en este tipo de cepas. No obstante, debe tenerse en cuenta también el tipo de infección, así en infecciones urinarias parece poco probable el fracaso terapéutico debido a que estos antimicrobianos alcanzan altas concentraciones en la orina. El CLSI solo alerta del fracaso del tratamiento con fluoroquinolonas en caso de infecciones extraintestinales por *S. enterica*. Asimismo EUCAST en su documento "*Expert rules in antimicrobial susceptibility testing*" (versión 1, Abril 2008), recomienda informar como resistentes a todas las fluoroquinolonas los aislados de salmonela resistentes al ácido nalidíxico, pero muchos autores opinan que esta regla debe extenderse al resto de enterobacterias, o al menos interpretarse como "intermedio" sobre todo en situaciones en las que por el lugar de la infección no accedan bien las fluoroquinolonas. Una modificación de los puntos de corte de las fluoroquinolonas con disminución de los mismos evitaría la necesidad de aplicar este tipo de reglas.

Resistencia a ácido nalidíxico de alto nivel (CMI >32 mg/L) y sensibilidad intermedia o resistencia a ciprofloxacino (CMI >1 mg/L). Muy probablemente son aislados con al menos 2 mutaciones en *gyrA* o *gyrA+parC*. Ello implica resistencia a todas las fluoroquinolonas, independientemente de su posible sensibilidad *in vitro* a alguna de ellas. La resistencia a una fluoroquinolona invariablemente conlleva una sensibilidad disminuida al resto de las fluoroquinolonas. No obstante, si se observa una gran divergencia en los valores de CMI de las diferentes fluoroquinolonas, el resultado debe comprobarse ya que puede tratarse de un error.

Sensibilidad disminuida al ácido nalidíxico (CMI 16-32 mg/L) y ciprofloxacino (CMI 0,25-1 mg/L). Este fenotipo sugiere con alta probabilidad la presencia de genes *qnr* y/o de otros genes plasmídicos, sin alteraciones adicionales en las topoisomerasas. Este fenotipo también es compatible (aunque poco frecuente en cepas clínicas) con una disminución de la acumulación intracelular del antibiótico por disminución de la permeabilidad de la membrana externa o por hiperactividad de las bombas de expulsión. No hay consenso al respecto, pero debido al riesgo de selección de mutantes con alto nivel de resistencia, algunos autores han propuesto informarlos como cepas con sensibilidad intermedia a quinolonas. Diversos estudios indican que valores del área bajo la curva (AUC/CMI) mayores de 25-30 para pacientes inmunocompetentes o de 100-125 para pacientes inmunodeprimidos, y una relación pico sérico/CMI mayor de 8, son buenos predictores de una respuesta favorable al tratamiento con quinolonas. Por ello, pequeños aumentos de la CMI

de una quinolona tendrán un impacto desfavorable en la eficacia terapéutica. En un estudio retrospectivo con 16 pacientes con bacteriemia causada por enterobacterias sensibles a quinolonas (de acuerdo a los puntos de corte del CLSI) y tratados con ciprofloxacino, se observó una mortalidad a los 21 días del 50%. Cuatro de las ocho bacterias aisladas de los pacientes que fallecieron poseían el gen *qnrB*, y sus CMI de ciprofloxacino fueron de 0,5-1 mg/L.

7. RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS

El principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos es la inactivación enzimática, habiéndose descrito tres tipos de enzimas inactivantes: las acetiltransferasas (AAC) que acetilan un grupo amino del antibiótico, las fosfotransferasas (APH) que fosforilan un grupo hidroxilo y, finalmente las nucleotidiltransferasas (ANT) que adenilan también un grupo hidroxilo. Cada enzima reconoce un cierto número de antibióticos aminoglucósidos, lo cual se traduce en un fenotipo de resistencia concreto.

Además, una bacteria puede disminuir su sensibilidad a aminoglucósidos mediante mutaciones que afectan la difusión pasiva a través de la membrana externa, porinas o estructura del polisacárido. Las cepas con estas alteraciones conllevan a la vez una resistencia cruzada con otras familias de antimicrobianos y tienen poca relevancia clínica. Las mutaciones que afectan el transporte activo a través de la membrana interna se han descrito principalmente en *E. coli* y *P. aeruginosa*, y comportan una resistencia de bajo nivel que afecta a todos los aminoglucósidos. Las mutaciones en la diana de los aminoglucósidos son poco frecuentes en cepas aisladas en clínica, y son muy específicas para cada aminoglucósido, lo cual no produce un fenotipo de resistencia cruzada.

Desde el 2003 se han descrito distintos genes como responsables de la metilación postranscripcional del ARN ribosómico (*armA*, *rmt* o *npmA*) y de momento con una prevalencia moderada y geográficamente dependiente. En este caso la resistencia observada suele ser de alto nivel a todos los aminoglucósidos excepto a neomicina.

Si bien es importante el conocimiento de los distintos fenotipos para la lectura interpretada del antibiograma, la deducción del posible mecanismo/gen de resistencia implicado a partir de los patrones de resistencia observados es muy compleja y además se debe tener en cuenta que frecuentemente se encuentran varias enzimas diferentes y/o otros mecanismos de resistencia asociados.

La mayoría de las especies de enterobacterias, son naturalmente sensibles a los aminoglucósidos, con las excepciones de *Providencia* spp. y *S. marcescens* en cuyo cromosoma se encuentran los genes *aac(2')-Ia* y *aac(6')-Ic*, respectivamente. La enzima AAC(2') confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina, mientras que la

enzima AAC(6') confiere solo una leve resistencia a tobramicina, observándose en el antibiograma por difusión con discos halos de inhibición más reducidos que para el resto de enterobacterias, halos que corresponden a CMI para este antibiótico de entre 1 y 4 mg/l. Esta disminución de la sensibilidad a tobramicina se interpreta como que *S. marcescens* es resistente a dicho antibiótico. Mutaciones en este gen causan una hiperproducción de la enzima que confiere una resistencia de alto nivel a tobramicina, kanamicina y netilmicina y moderada a amikacina.

Los aminoglucósidos son una alternativa importante en el tratamiento de las infecciones sistémicas y se utilizan en combinación con betalactámicos o glicopéptidos para conseguir una actividad bactericida. El nivel de resistencia a aminoglucósidos parece no haber cambiado en las últimas décadas. En 1997, en el programa de vigilancia SENTRY realizado en Estados Unidos, Canadá, América del Sur y Europa se encontró que la mayoría de las bacterias gramnegativas eran sensibles a los aminoglucósidos, encontrándose unos porcentajes de sensibilidad entre 96% y 100% para amikacina, 90% y 96% para gentamicina, y entre 94 y 97% para tobramicina. Porcentajes similares se describieron dos años después en el estudio de vigilancia europeo SENTRY realizado solo en *Enterobacteriaceae*: 99,6-97% para amikacina, 98-87% para gentamicina y 97,5-84,7% para tobramicina. En un estudio reciente realizado en *Enterobacteriaceae* en Barcelona en el año 2006 se encontraron porcentajes de sensibilidad algo menores, con porcentajes entre 72,5% y 83,3% para kanamicina, gentamicina y tobramicina, y algo mayores para netilmicina (96,3%) y amikacina (98,4%).

Para la detección de los distintos fenotipos de resistencia adquiridos es importante una correcta elección de los aminoglucósidos en estudio. Puede hacerse un antibiograma completo, por ejemplo para el estudio epidemiológico de los genes de resistencia de las cepas, o bien un antibiograma reducido donde solo se incluyan los aminoglucósidos de uso en terapéutica. Para el antibiograma completo se recomienda el estudio de la amikacina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina y tobramicina. El estudio de la estreptomina puede ser optativo, dado su reducido uso en clínica, sin embargo, en un estudio epidemiológico es el único marcador de la presencia de las enzimas APH (3'')-I y ANT (3'')-I. En cambio para el antibiograma corto es suficiente el estudio de la amikacina, gentamicina y tobramicina.

En la tabla 9 y la figura 8, se muestran los patrones de resistencia esperados ante la presencia de una única enzima inactivante de aminoglucósidos. Estos patrones se pueden desdibujar ante la presencia de otras enzimas y/o otros mecanismos tal como se ha comentado. Además, para interpretar el patrón de sensibilidad a los aminoglucósidos se debe estar alerta ante situaciones donde puede haber una débil

expresión de la enzima. En este contexto debe tenerse en cuenta que:

a) Ante una cepa sensible a amikacina, pero con sensibilidad intermedia o resistente a tobramicina y/o netilmicina y sensible a gentamicina debería interpretarse sensibilidad intermedia a amikacina, ya que puede tratarse de la producción de la enzima AAC(6').

b) Cuando se observa una disminución del halo de inhibición sólo de la gentamicina (comprendido entre 16 y 19 mm), debe considerarse sensibilidad intermedia a gentamicina por producción de la enzima AAC(3)-I.

c) Si la gentamicina es resistente o presenta un halo de inhibición reducido y en la tobramicina también se observa reducción del halo de inhibición (16-19 mm), debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la tobramicina pues puede estar presente la enzima ANT(2'').

d) Debe interpretarse como sensibilidad intermedia a la netilmicina cuando haya una reducción del diámetro de inhibición (comprendido entre 19 y 22 mm), si también aparecen reducidos los halos de la gentamicina y la tobramicina, pues puede estar presente la enzima AAC(3)-II o AAC(3)-IV.

8. RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN *Haemophilus influenzae*

8.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Haemophilus influenzae es uno de los patógenos de adquisición comunitaria más importantes en todo el mundo. La meningitis y bacteriemia por cepas capsuladas de tipo b son importantes en áreas donde no se ha implantado la vacunación frente a este tipo de cepas, mientras que las cepas no tipables son uno de los principales agentes bacterianos de infecciones respiratorias como otitis media, sinusitis, agudizaciones de EPOC y neumonías.

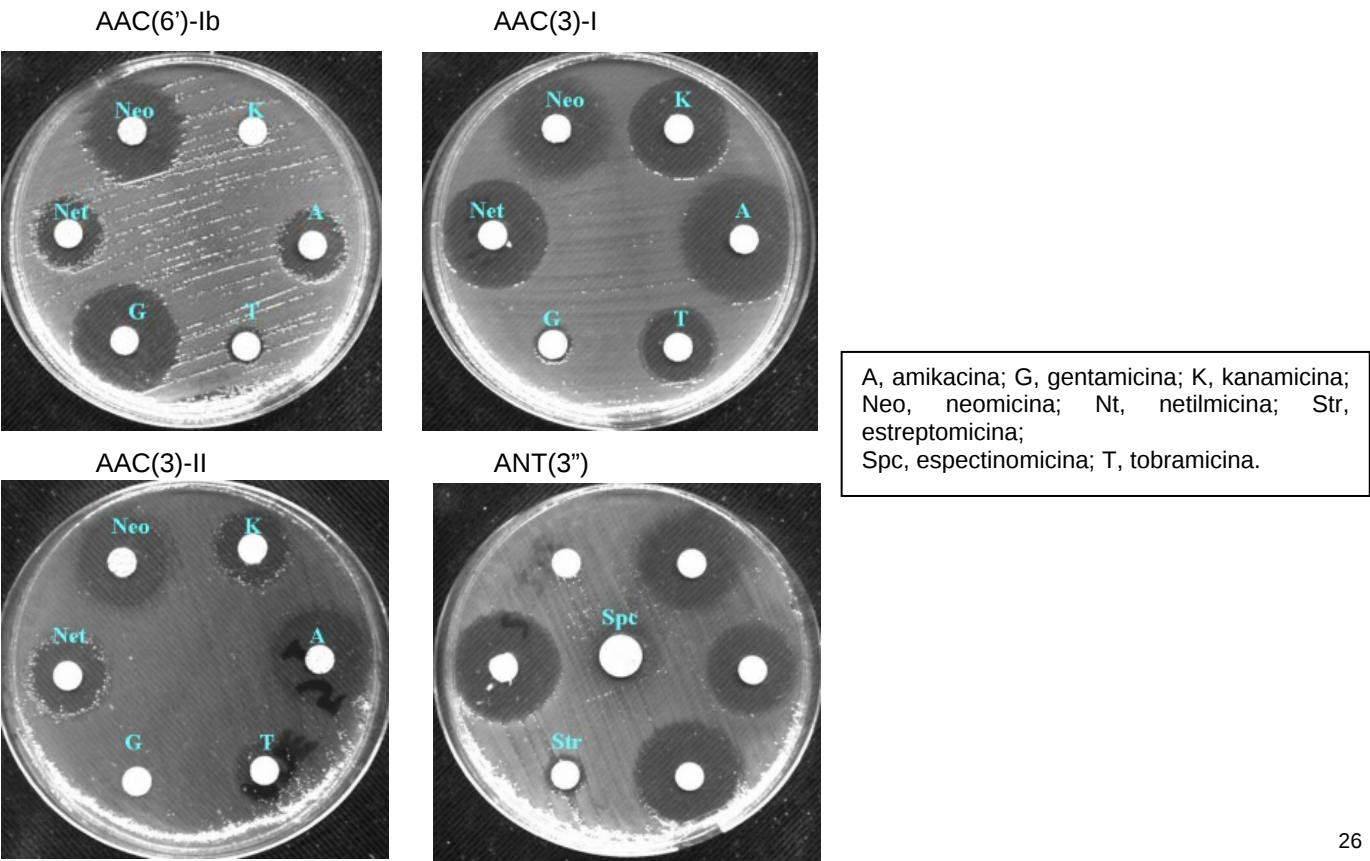
En ausencia de mecanismos de resistencia adquiridos es naturalmente sensible a numerosos grupos de antimicrobianos como betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, rifampicina, quinolonas y trimetoprim. En cambio, presenta resistencia intrínseca a lincosamidas, macrólidos de 16 átomos de carbono y sensibilidad disminuida a cefalosporinas de primera generación, macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, cetólidos y estreptograminas. Clásicamente los betalactámicos son el tratamiento de primera línea de las infecciones causadas por este microorganismo.

Tabla 9. Fenotipos de resistencia a los aminoglucósidos por producción de una sola enzima inactivante.

Fenotipo	Enzima	Comentarios
Str	APH(3'')-I	Resistencia a estreptomina. La utilización de un disco de espectinomicina, discrimina entre la APH(3'') y la ANT(3'') pues esta última confiere resistencia a estreptomina y espectinomicina.
Str/Spc	ANT(3'')-I	
K Neo	APH(3')-I APH(3')-II	Resistencia de alto nivel a kanamicina y neomicina. La enzima de tipo I es más frecuente que la II.
G	AAC(3)-I	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la gentamicina, a veces de difícil visualización
KGT	ANT(2'')-I	Reducción del diámetro del halo de inhibición de la kanamicina, gentamicina y en menor grado de la tobramicina.
KTGnt	AAC(3)-II AAC(3)-IV	Resistencia de alto nivel a gentamicina y tobramicina, disminución importante del halo de la netilmicina y moderada para la kanamicina.
KTANT	AAC(6')-I	Resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina, y netilmicina y moderada para la amikacina. Es un fenotipo fácil de diferenciar pues son cepas sensibles a gentamicina. Presente en <i>Serratia</i> .
GTNtNeo	AAC(2')-I	Resistencia moderada a gentamicina, tobramicina, netilmicina y neomicina. Difícil de detectar. En el género <i>Providencia</i> es una resistencia natural de localización cromosómica.

A, amikacina; G, gentamicina; K, kanamicina; Neo, neomicina; Nt, netilmicina; Str, estreptomina; Spc, espectinomicina; T, tobramicina.

Figura 8. Patrones de resistencia esperados en cepas de *Escherichia coli* portadoras de diferentes enzimas modificadores de aminoglucósidos.



Dos mecanismos principales son la causa de la resistencia a las penicilinas: hidrólisis enzimática del antibiótico por betalactamasas plasmídicas, y alteraciones en la proteína PBP3 por mutaciones en el gen *ftsI*. Las betalactamasas son el mecanismo más común, son mayoritariamente de tipo TEM-1, y más raramente TEM-2 o ROB-1. Estas enzimas confieren un perfil de sensibilidad similar, con resistencia de alto nivel a amino-, carboxi- y ureido-penicilinas, y son eficazmente inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico (fenotipo BLPAR). Sin embargo, puede haber variaciones en los niveles de resistencia en función del promotor asociado al gen TEM-1, estos promotores pueden tener diferentes afinidades por la ARN polimerasa, dando lugar a una mayor o menor producción de enzima que podría incluso afectar a amoxicilina-ácido clavulánico y cefalosporinas de segunda generación.

El fenotipo del mecanismo de resistencia debido a sustituciones de aminoácidos en la PBP3 se conoce como “betalactamasa negativa ampicilina resistente (BLNAR)”, y se caracteriza por bajos niveles de resistencia a los betalactámicos y a sus combinaciones con inhibidores de betalactamasas. Mientras que la resistencia debida a la producción de betalactamasa está asociada a altas CMI de ampicilina y amoxicilina (≥ 4 mg/L), la resistencia por alteraciones en la PBP3 se asocia mayoritariamente a cepas con bajas CMI de ampicilina y amoxicilina (≤ 2 mg/L). En la mayor parte de las cepas BLNAR estudiadas en España las CMI de ampicilina son de 1 mg/L, las de amoxicilina son de 2-4 mg/L y de 2/1 mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico. A partir del análisis genético del gen *ftsI* que codifica la PBP3 en las cepas BLNAR, las sustituciones de aminoácidos en torno al motivo KTG (Lys512-Thr-Gly) y SSN (Ser379-Ser-Asn) parecen ser responsables de la resistencia a betalactámicos. Diferentes grupos de investigadores analizaron la posible correlación de las mutaciones con los niveles de resistencia a los diferentes betalactámicos, y en general coinciden en que las sustituciones de aminoácidos como Asn₅₂₆Lys (N526K) o Arg₅₁₇His (R517H), cerca del motivo KTG, se encuentran comúnmente en los aislados con resistencia moderada a cefotaxima (CMI 0,03 a 0,25 mg/L), y sustituciones adicionales de aminoácidos cerca del motivo SSN, como Met₃₇₇Ile (M377I), Ser₃₈₅Thr (S385T) y/o Leu₃₈₉Phe (L389F), se encontraron con frecuencia en los aislados con mayores niveles de resistencia a cefotaxima dando lugar a valores de CMI de cefotaxima de hasta 60 veces superiores (tabla 10).

Aunque el impacto clínico de las alteraciones en la PBP3 (resistencia clínica) se da fundamentalmente sobre las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación orales, se demuestra un aumento mucho mayor en los valores de CMI para

las cefalosporinas de tercera generación como cefotaxima y cefixima. Este hecho puede explicarse por la mayor afinidad de cefotaxima y otras cefalosporinas por la PBP3, mientras que la ampicilina muestra más afinidad por las PBP1 y PBP4. Por ello se cree que la elevada tasa de cepas BLNAR en países como Japón sea debida a la presión selectiva de un mayor uso de cefalosporinas. En Estados Unidos y Europa, con tasas de cepas BLNAR mucho menores, amoxicilina-ácido clavulánico es el principal antibiótico usado para el tratamiento de infecciones respiratorias comunitarias, a diferencia de Japón, donde las cefalosporinas orales como cefdinir y cefditoren son ampliamente usadas, sobre todo con bajas dosis sin suficiente actividad bactericida que favorece la selección de mutantes resistentes.

También se pueden observar altos niveles de resistencia a ampicilina (CMI de 8-16 mg/L) en cepas BLNAR, en las cuales se suele evidenciar un mecanismo de resistencia adicional, como es la hiperexpresión de la bomba de expulsión activa AcrAB por mutaciones en el gen regulador de la bomba.

Por último, cada vez son más frecuentes las cepas BLPACR (betalactamasa positiva amoxicilina-ácido clavulánico resistente) que producen betalactamasa y poseen alteraciones en la PBP3 y se caracterizan por altos niveles de resistencia a ampicilina y amoxicilina junto a disminución de la sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico. No se detectan diferencias en los valores de CMI para las cefalosporinas de tercera generación entre las cepas BLNAR y las cepas BLPACR, por el efecto nulo de las betalactamasas tipo TEM-1 sobre esos antimicrobianos.

A pesar de la prevalencia de la betalactamasa TEM-1 en *H. influenzae*, no se han informado cepas clínicas productoras de BLEE derivadas de TEM, aunque algunos autores sugieren que podrían pasar desapercibidas por los bajos valores de CMI para cefotaxima que se obtendrían con estas cepas según experimentos con cepas artificialmente transformadas con genes TEM-BLEE. Los puntos de corte de EUCAST (cefotaxima $\leq 0,125$ mg/L) serían suficientes para detectar este tipo de cepas a diferencia de los puntos de corte del CLSI (≤ 2 mg/L). En cambio con cepas con alteraciones en la PBP3 (BLNAR y BLPACR) transformadas con genes TEM-BLEE sí se obtienen altos valores de CMI (2-8 mg/L) que superan los puntos de corte de sensibilidad del CLSI. En cualquier caso, el método de detección de BLEE con discos combinados se ha mostrado eficaz tanto en cepas con alteraciones en la PBP3 o sin ellas. Asimismo, tampoco se ha informado de la presencia de betalactamasas TEM resistentes a los inhibidores (IRTs) en cepas clínicas.

Tabla 10. CMI de betalactámicos frente a cepas de *Haemophilus* spp. según el mecanismo de resistencia.

Fenotipo	CMI (mg/L) de:					
	Ampicilina	Amox/clav	Cefaclor	Cefuroxima	Cefixima	Cefotaxima
Sensible (BLNAS)	0,06-0,5	0,25-1	1-4	0,06-1	0,015-0,06	0,008-0,03
BLPAR	2-64	0,25-2	1-8	0,25-2	0,015-0,12	0,008-0,03
BLNAR						
motivo KTG	0.5-4	1-4	2-16	0,5-16	0,015-0,25	0,015-0,25
motivo SSN	1-4	1-4	4-64	2-16	0.5-4	0,25-4
BLPACR	2-64	1-4	4-16	1-4	0,03-0,25	0,12
BLNAR + AcrAB	4-16	ND	ND	ND	ND	ND

En un estudio con 2736 cepas de *H. influenzae* recogidas en España durante el período 2006-2007 (estudio SAUCE-4), se detectó la producción de betalactamasa en un 15,7 %, y sólo 18 cepas (0,7%) se definieron como BLNAR (betalactamasa negativa, ampicilina ≥ 2 mg/L). Sin embargo, cuando se estudiaron las cepas que presentaban CMI de ampicilina de 0,5-1 mg/L, y de $\geq 2/1$ mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico, todas ellas (134 cepas, 4,9%) presentaban mutaciones en el gen *ftsI*, y son lo que se denominan en la literatura como cepas “low-BLNAR”. Por último, 7 aislados fueron productores de betalactamasa y resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico (BLPACR).

8.2. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA

Para el crecimiento y estudio de sensibilidad de *H. influenzae*, se requieren medios con suplementos de NAD y hierro en forma de hemoglobina, hematina o hemina. Se han propuesto diferentes medios para los estudios de sensibilidad por los diversos comités de estandarización de antibiogramas y es deseable un consenso al respecto para obtener resultados comparables. Entre ellos, el CLSI recomienda el medio HTM (Mueller-Hinton con 15 mg/L de hematina bovina, 5 g/L de extracto de levadura y 15 mg/L de NAD), y el EUCAST el Agar MH-F (Mueller-Hinton con 5% de sangre de caballo desfibrinada y 20 mg/L β -NAD). Pero más allá de esas pequeñas diferencias, es más importante la calidad del medio utilizado, que es especialmente crítico para *H. influenzae*, y se observan importantes diferencias entre los diferentes fabricantes e incluso entre los diferentes lotes. Es esencial una correcta preparación del medio así como respetar la duración y las condiciones de conservación, y es muy recomendable verificar la calidad del medio con una cepa de *H. influenzae* nutricionalmente exigente como la cepa ATCC 10211. Además, se conoce que un pequeño porcentaje de cepas no crecen en el

medio HTM, y es habitual realizar el antibiograma en agar chocolate enriquecido como medio alternativo. Por desgracia, no hay consenso en los puntos de corte de sensibilidad entre los diferentes comités de estandarización. Como se observa en la tabla 11, hay grandes diferencias entre los puntos de corte de CLSI y EUCAST para amoxicilina-ácido clavulánico y las cefalosporinas. La detección cada vez más frecuente de cepas BLNAR mediante técnicas moleculares de PCR y secuenciación del gen *ftsI*, ha demostrado la insuficiencia de los puntos de corte del CLSI para detectar este tipo de cepas. EUCAST, además de los cortes clínicos de sensibilidad, aporta puntos de corte epidemiológicos que podrían ser más eficaces a la hora de detectar cepas con bajos niveles de resistencia. El punto de corte para ampicilina propuesto tanto por CLSI como EUCAST (≤ 1 mg/L) no es útil ya que clasificaría como sensibles a numerosas cepas BLNAR que presentan valores bajos de CMI para ampicilina (low-BLNAR), que son mayoritarias en España.

Numerosos autores han propuesto diferentes puntos de corte para detectar las cepas BLNAR, aunque la mayoría se inclina por valores de CMI ≥ 1 mg/L para amoxicilina o ampicilina, mientras que valores $\leq 0,25$ mg/L descartarían cualquier mecanismo de resistencia. Valores de CMI 0,5 mg/L para amoxicilina o ampicilina no definen con claridad el estado de resistencia de la cepa. Según García-Cobos *et al*, si se utiliza el método de microdilución, valores de CMI de 0,5 mg/L para amoxicilina corresponderían a cepas sin mutaciones en el gen *ftsI*, mientras que la mayoría de las cepas con CMI de 0,5 mg/L para ampicilina (por Etest o microdilución) son BLNAR. Además, valores de CMI $\geq 0,5$ mg/L o diámetros de inhibición ≤ 29 mm para cefixima son muy indicativos de cepas BLNAR con mutaciones en el motivo SSN que conllevan una menor sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación, que podría tener un impacto en el tratamiento de infecciones graves como meningitis.

Tabla 11. Puntos de corte para *Haemophilus influenzae* según CLSI y EUCAST.

Antimicrobiano	CLSI (2010)		EUCAST (2011 v1.3)			Puntos de corte PK/PD	
	S	R	S	R	ECOFF	S	R
Ampicilina	≤ 1	≥ 4	≤ 1	> 1	≤ 1	≤ 2	≥ 4
Amoxicilina	-	-	≤ 1	> 1	≤ 1	≤ 2/1-4/2	≥ 4/2-8/4
Amoxicilina-ácido clavulánico ¹	≤ 4/2	≥ 8/4	≤ 1/2	> 1/2	≤ 1	≤ 2/1-4/2	≥ 4/2-8/4
Cefaclor	≤ 8	≥ 32	≤ 0,5	> 0,5	≤ 8	≤ 0,5	≥ 1
Cefuroxima (parenteral)	≤ 4	≥ 16	≤ 1	> 2	≤ 2	≤ 4	≥ 8
Cefuroxima axetil (oral)	≤ 4	≥ 16	≤ 0,12	> 1	≤ 2	≤ 1	≥ 2
Cefixima	≤ 1	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,12	≤ 1	≥ 2
Cefotaxima	≤ 2	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,06	≤ 2	≥ 4
Ceftriaxona	≤ 2	-	≤ 0,12	> 0,12	≤ 0,06	≤ 2	≥ 4
Doripenem	-	-	≤ 1	> 1	≤ 0,5	-	-
Ertapenem	≤ 0,5	-	≤ 0,5	> 0,5	≤ 0,12	≤ 1	≥ 2
Imipenem	≤ 4	-	≤ 2	> 2	≤ 2	≤ 4	≥ 8
Meropenem (meningitis)	≤ 0,5	-	≤ 0,25	> 1	≤ 0,25	-	-
Meropenem (no meningitis)	≤ 0,5	-	≤ 2	> 2	≤ 0,25	≤ 4	≥ 8

ECOFF, punto de corte epidemiológico

¹Para EUCAST el ácido clavulánico se estudia con una concentración fija de 2 mg/L y para CLSI se estudia a la mitad de la concentración de amoxicilina.

Además del antibiograma convencional, se debe realizar siempre la prueba cromogénica de la nitrocefina para caracterizar las cepas productoras de betalactamasa (BLPAR) y se caracterizan por valores altos de CMI para amoxicilina y ampicilina (> 4 mg/L). Aunque infrecuente, pueden detectarse cepas BLPAR con valores de CMI bajos (1-2 mg/L) particularmente si se utiliza el método de Etest. Algunos estudios han descrito una asociación de ROB-1 con mayores niveles de resistencia a cefaclor en comparación con TEM-1. Por último, valores de CMI ≥ 2 mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico en cepas productoras de betalactamasa indican con alta probabilidad un fenotipo BLPACR. Si se utiliza el método de Etest, también pueden detectarse valores de 0,5-1 mg/L en las cepas BLPACR. En cambio con valores < 0,5 mg/L para amoxicilina-ácido clavulánico se puede descartar la presencia de mutaciones en el gen *ftsI* por ambas metodologías (microdilución y Etest).

El método de difusión con discos se ha demostrado que tiene menos capacidad de discriminación entre cepas BLNAR y cepas sin modificaciones en la PBP3. Si se siguen los puntos de corte establecidos por el CLSI para ampicilina (disco 10 µg), la mayoría de las cepas BLNAR identificadas en nuestro país se identificarían como sensibles. Se han propuesto diferentes alternativas con mejor sensibilidad para detectar BLNAR. EUCAST propone discos de ampicilina 2 µg (< 16 mm), cefaclor 30 µg (< 19 mm), o fenoxi-metilpenicilina 10 µg (< 15 mm). Otras propuestas publicadas incluyen la utilización de discos de amoxicilina-ácido clavulánico de baja carga (2/1 µg), cefalotina, cefalexina, o cefsulodina, entre otros. Desafortunadamente, aún no hay resultados concluyentes sobre un método óptimo que pueda ser utilizado por la generalidad de los laboratorios clínicos, ya que se observa un solapamiento de los

diámetros de inhibición de las cepas con y sin mutaciones en el gen *ftsI*, que hace difícil establecer un punto de corte discriminatorio entre ambos tipos de cepas. Probablemente, la solución más idónea sería establecer un punto de corte muy sensible (pero poco específico) como primera prueba de cribado, para posteriormente ser comprobado por microdilución o Etest. En cualquier caso, las cepas aisladas de infecciones graves deben analizarse con métodos basados en la CMI.

8.3. INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

Las cepas productoras de betalactamasa deben informarse como resistentes a todas las penicilinas. Las cepas BLNAR además de ser resistentes a ampicilina, tienen sensibilidad disminuida al resto de los betalactámicos, particularmente a las cefalosporinas. Según el CLSI (versión 2010), las cepas BLNAR deben informarse como resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefaclor, cefamandol, cefetamet, cefonicid, cefprozil, cefuroxima, loracarbef y piperacilina-tazobactam, con independencia del resultado de su sensibilidad *in vitro*. Según EUCAST las cepas BLNAR y BLPACR deben informarse como resistentes a los mismos antibióticos mencionados por el CLSI incluyendo asimismo piperacilina y piperacilina-tazobactam.

Comentario aparte merece la utilidad clínica de las cefalosporinas orales de segunda generación como cefaclor y cefuroxima independientemente de que sean cepas BLNAR o cepas sin mecanismos de resistencia. Hay una disparidad de criterios entre CLSI y EUCAST al respecto (ver tabla 11), aunque el CLSI comenta que los puntos de corte que aporta para las cefalosporinas orales pueden no ser útiles para el tratamiento de los pacientes. En efecto se ha demostrado que los puntos de corte clínicos del CLSI para cefaclor y cefuroxima axetil no son predictivos

del éxito o fracaso del tratamiento con los mismos. EUCAST propone puntos de corte clínicos ($S \leq 0,5$ mg/L, $R > 0,5$ mg/L para cefaclor, y $S \leq 0,125$ mg/L, $R > 1$ mg/L para cefuroxima oral) muy por debajo del punto de corte epidemiológico (≤ 8 mg/L para cefaclor y ≤ 2 mg/L para cefuroxima), en la práctica eso se traduce en informar casi todos los aislados como resistentes a cefaclor e intermedios a cefuroxima axetil. Ello equivale a diámetros del halo de inhibición ≥ 50 mm como punto de corte de sensibilidad, aunque proponen diámetros < 19 mm con un disco de cefaclor de 30 como *screening* para detectar cepas BLNAR.

Como se ha comentado, las mutaciones en el gen *ftsI* (BLNAR) provocan un aumento importante en las CMI de las cefalosporinas de tercera generación, que es variable dependiendo de las mutaciones detectadas y otros factores aún no conocidos, si bien, no hay consenso en los puntos de corte de sensibilidad y no se conoce suficientemente el impacto clínico de estas mutaciones. En nuestro entorno, aún no son frecuentes las cepas BLNAR, y mucho menos las infecciones graves por estos aislados, por lo que no se han informado fracasos terapéuticos con las cefalosporinas de tercera generación. Muy diferente es la situación en países como Japón, donde aún son importantes las infecciones meníngeas por *H. influenzae* tipo b, y donde además es muy alta la tasa de cepas BLNAR mayoritariamente con mutaciones en el motivo SSN que confieren mayores niveles de resistencia a cefalosporinas. Allí, la monoterapia con cefotaxima o ceftriaxona se ha mostrado insuficiente para el tratamiento de meningitis por BLNAR en algunos pacientes, y se ha propuesto como alternativa una terapia combinada con betalactámicos que tienen dianas diferentes en las PBPs, como imipenem y cefotaxima (o ceftriaxona).

El estudio y la detección cada vez más frecuente de cepas BLNAR permitirán arrojar más luz a cuestiones aún pendientes acerca de este tipo de cepas emergentes que se pueden resumir a continuación:

- ¿Cuál es el impacto clínico de las cepas denominadas *low*-BLNAR?. Las herramientas moleculares han permitido detectar cepas con valores bajos de CMI de ampicilina, y han revelado la insuficiencia de los métodos fenotípicos para detectarlas.
- ¿Es necesario replantear los puntos de corte clínicos de sensibilidad?. La implicación de las cepas BLNAR en el fracaso terapéutico no está claramente demostrado, y posiblemente las cepas *low*-BLNAR no presentan un problema clínico y pueden tratarse con penicilinas a mayores dosis o cefalosporinas en infecciones respiratorias leves.
- Existe variabilidad en los resultados del antibiograma según el método y el medio utilizado, lo que tiene un impacto en la categorización clínica de las cepas, debido a que la mayoría de las cepas BLNAR presentan valores próximos a los puntos de corte. La mayoría de los estudios publicados que

aportan valores de CMI hacen referencia al medio HTM, y se requieren más estudios para conocer el impacto que el uso de medios como el agar MH-F propuesto por el EUCAST o el agar chocolate enriquecido puede suponer en esos valores de CMI.

d) Ante la presencia cada vez más frecuente de cepas BLNAR, es necesario recoger más evidencias de respuesta clínica al tratamiento con cefalosporinas de tercera generación, sobre todo en infecciones graves, y con ello establecer puntos de corte clínicos consensuados.

e) Tradicionalmente se ha considerado a piperacilina-tazobactam como inactivo frente a cepas BLNAR y BLPACR aún cuando no se tenían datos suficientes que pudieran apoyar esta idea. Un trabajo reciente en Japón con 100 cepas BLNAR y 100 cepas BLPACR, en su mayoría con modificaciones en el motivo SSN, demostraron gran potencia de este antibiótico frente a estas cepas (CMI₅₀ 0,06 mg/L y CMI₉₀ 0,12 mg/L frente a BLNAR; CMI₅₀ 0,12 mg/L y CMI₉₀ 0,25 mg/L frente a BLPACR), lo cual hace necesario clarificar con más evidencias el papel que puede jugar piperacilina-tazobactam en el tratamiento de infecciones producidas por este tipo de cepas.

9. RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN *Neisseria* spp.

9.1. *NEISSERIA GONORRHOEAE*

N. gonorrhoeae es un patógeno estrictamente humano causante de la gonorrea que sigue siendo una de las infecciones de transmisión sexual más frecuentes. La falta de tratamiento o un tratamiento incorrecto puede conducir a complicaciones como epididimitis, salpingitis, pelviperitonitis y formas septicémicas con localizaciones secundarias como las articulares. Las formas de inflamación crónica pueden ir acompañadas de secuelas como la estenosis uretral en los hombres o la obstrucción de trompas en mujeres, causa frecuente de infertilidad. La gonorrea ha adquirido gran importancia en las últimas décadas debido a su papel como cofactor en el aumento de infecciones por el VIH, que refuerza la importancia de un tratamiento correcto y temprano de la gonorrea. Tras la aparición de la epidemia de VIH, la frecuencia de infecciones gonocócicas disminuyó debido a la implantación eficaz de medidas de prevención, sin embargo, en los últimos años estamos asistiendo a un aumento de esas infecciones probablemente debido a una relajación de esas medidas. Un factor importante que contribuye a la continua propagación de las infecciones gonocócicas es la notable capacidad de *N. gonorrhoeae* para adquirir resistencia a los antibióticos habitualmente activos. Durante las dos últimas décadas, las cepas de *N. gonorrhoeae* han desarrollado alto nivel de resistencia frente a varios antimicrobianos como penicilina, tetraciclina y quinolonas en numerosos países, incluyendo España. Actualmente, la ceftriaxona y las cefalosporinas orales como cefixima, ceftidoren o ceftibuteno son el tratamiento de elección, sin

embargo también se han informado aislados de gonococo con sensibilidad *in vitro* disminuida a las mismas, e incluso también fracaso terapéutico. Por ello, desde hace años es inexcusable realizar un antibiograma a todos los aislados de *N. gonorrhoeae*.

La penicilina ha sido la base del tratamiento durante varias décadas, pero poco después de su introducción, *N. gonorrhoeae* comenzó a desarrollar resistencia de bajo nivel a penicilina. Casi todos los aislados recogidos en la era anterior a la introducción de la penicilina tenían valores de CMI $<0,0125$ mg/L, y posteriormente estas CMI subieron gradualmente en cepas procedentes de la mayoría de países del mundo y requirieron numerosas escaladas en la dosis recomendada de la penicilina desde las 50.000 unidades en los años 40 a 4,8 millones de unidades en los años 70. Esta disminución gradual de la sensibilidad es el resultado del efecto aditivo de múltiples mutaciones cromosómicas que provocan alteración en las PBPs, hiperexpresión de las bombas de expulsión y disminución de la entrada de los antibióticos a través de la membrana externa. Al menos 5 genes cromosómicos están implicados en esta resistencia: *ponA*, *penA*, *penB*, *pilQ* y *mtr*. Los genes *ponA* y *penA* codifican las PBP1 y PBP2 respectivamente, cuyas alteraciones afectan únicamente a la actividad de las penicilinas, aunque también se han implicado diferentes alteraciones en la PBP2, como genes en mosaico, en resistencia a las cefalosporinas orales y en la disminución de la sensibilidad a la ceftriaxona. Mutaciones en *penB* llevan a alteraciones de una porina que también causa resistencia a otras familias de antibióticos como las tetraciclinas y a una pequeña disminución de la sensibilidad a las quinolonas. La hiperexpresión de la bomba de expulsión MtrCDE favorece la resistencia a penicilinas, macrólidos, rifampicina, tetraciclinas y quinolonas, y puede estar también implicada en la disminución de sensibilidad a cefalosporinas. Mutaciones en *pilQ* (antiguamente denominado *penC*, que codifica una porina) provoca la resistencia de alto nivel a penicilina en cepas con mutaciones de *penA*, *penB* y *mtr*. Así, las diferentes CMI que se observan son producto de la acción sinérgica de estos diferentes mecanismos, pudiendo provocar resistencia de alto nivel a la penicilina.

Actualmente se está observando un aumento preocupante en los valores de CMI de las cefalosporinas frente a *N. gonorrhoeae*, y diversos expertos alertan que está a un solo paso de adquirir resistencia de alto nivel repitiendo el camino que siguieron las penicilinas. Ello podría tener consecuencias desastrosas ya que las cefalosporinas son el último grupo de antimicrobianos que permanecían como tratamiento eficaz de primera línea, y así en Japón la cefixima ha dejado de ser tratamiento de primera línea, permaneciendo únicamente la ceftriaxona y la espectinomocina como opciones de elección. Las cepas que presentan CMI de penicilina alta por mecanismos cromosómicos (2-8 mg/L) pueden

presentar un aumento significativo de la CMI de las cefalosporinas como cefixima y en menor medida la ceftriaxona. Se han descrito fracasos en el tratamiento con cefixima que presentaban CMI de 0,125-0,25 mg/L, e incluso se han descrito cepas con CMI de ceftriaxona de 0,5 mg/L. En varios países europeos se ha informado una tasa de resistencia a cefixima del orden del 5%, y aunque esa resistencia es aún excepcional en nuestro país, debe analizarse la sensibilidad a las cefalosporinas, particularmente en aquellos aislados que presentan resistencia cromosómica elevada a penicilina.

Además de los mecanismos cromosómicos descritos, la penicilina puede afectarse también por la producción de una betalactamasa plasmídica de tipo TEM-1, descrita en los años 70, y que los genes que la codifican pueden estar presentes en diferentes tipos de plásmidos con una frecuencia geográfica variable. Esa resistencia se considera de alto nivel aunque su expresión *in vitro* es variable (1 a 64 mg/L), y se inhibe por ácido clavulánico, aunque generalmente este antimicrobiano no es de utilidad terapéutica. En España, alrededor del 90% de las cepas tienen sensibilidad disminuida o resistencia a penicilina, y se detecta la presencia de penicilinas plasmídica en alrededor de un 20%.

El método de dilución en agar se considera el método de referencia para la determinación de la CMI, sin embargo el método de difusión con tiras de gradiente de antibiótico como el Etest es una alternativa aceptable para la determinación de la CMI en la rutina del laboratorio. Hay coincidencia en los puntos de corte de sensibilidad para penicilina del CLSI y EUCAST ($S \leq 0,064$ mg/L; $R >1$ mg/L).

El método de difusión con discos presenta en cambio resultados más aleatorios principalmente para diferenciar los aislados sensibles de aquellos con sensibilidad disminuida a la mayoría de los antibióticos pero particularmente a los betalactámicos. Para la determinación de la sensibilidad por este método, el CLSI propone el medio Agar GC con 1% de un suplemento definido que contiene en g/l: vitamina B 12 (0,01), L-glutamina (10), adenina (1), clorhidrato de guanina (0,03), ácido para-aminobenzoico (0,013), L-cisteína (1,1), glucosa (100), NAD (0,25), cocarboxilasa (0,1), nitrato férrico (0,02) y clorhidrato de tiamina (0,003).

El antibiograma debe acompañarse además de la prueba cromogénica de nitrocefina para detectar la posible producción de betalactamasa, lo cual implicará resistencia a amino-, carboxi- y ureidopenicilinas, con independencia de su resultado de sensibilidad *in vitro*, mientras que las cefalosporinas no se ven afectadas por este mecanismo.

9.2. NEISSERIA MENINGITIDIS

N. meningitidis sigue siendo una de las principales causas de meningitis bacteriana y sepsis severa en todo el mundo. También puede ser causa de infecciones respiratorias como neumonía, otitis media, y epiglotitis. El hombre es el único reservorio

conocido de esta especie que se aísla de la nasofaringe de individuos sanos en porcentajes que oscilan entre el 4% y el 20%, variación asociada a factores como la edad, las condiciones de endemia o epidemia, entre otros.

La penicilina ha sido históricamente el tratamiento de elección, y desde los años 80 se empezaron a describir aislados con sensibilidad disminuida a penicilina (CMI de 0,12-0,25 mg/L) en todo el mundo, siendo España uno de los países con mayores tasas de sensibilidad disminuida, superiores al 50%. El mecanismo de resistencia de este fenotipo denominado PenI tiene que ver sobre todo con alteraciones en la PBP2 (codificado por el gen *penA*), como resultado de la formación de una estructura de genes en mosaico derivado de una recombinación con secuencias homólogas de especies de *Neisseria* comensales como *N. cinerea*, *N. lactamica* y *N. flavescens*. El fenotipo afecta con mayor o menor intensidad a las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, imipenem y aztreonam, y se mantiene la actividad de las cefalosporinas de tercera generación. No está claro el significado clínico, ya que las infecciones por estas cepas con CMI relativamente elevadas pueden ser tratadas eficazmente con dosis elevadas de penicilina o amoxicilina, sin embargo se prefiere el tratamiento con cefotaxima o ceftriaxona ya que se han descrito algunos casos de fracaso terapéutico con penicilina y también se describen mayores tasas de complicaciones. Con menor frecuencia se describen por este mecanismo cepas con CMI de penicilina de 1 mg/L, y existe la preocupación de que aumenten estos casos, e incluso de que aparezcan cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

A partir de 1983 se describieron cepas productoras de betalactamasa plasmídica de tipo TEM-1 en Canadá, España y Sudáfrica, y hoy en día, su hallazgo sigue siendo excepcional. Es responsable de valores de CMI de penicilina ≥ 2 mg/L y puede alcanzar valores de 256 mg/L. Estas penicilinasas se inhiben por ácido clavulánico, no afectan a las cefalosporinas de segunda y tercera generación, y se detectan fácilmente en el laboratorio utilizando discos de nitrocefina.

El método de dilución en agar o la microdilución en caldo se consideran los métodos de elección, aunque también es aceptable el método de Etest o similar, mientras que el método de difusión con discos no es fiable para el estudio de sensibilidad a betalactámicos. Se observa una alta tasa de errores menores (sensible o resistente por el método de referencia o de difusión con discos pero intermedio por el otro método) cuando se usan discos de penicilina y ampicilina, incluso con discos de baja carga como penicilina de 1 U o ampicilina de 2 µg. Afortunadamente, CLSI y EUCAST proponen los mismos puntos de corte de sensibilidad para penicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona y meropenem (tabla 12).

Tabla 12. Puntos de corte para *N. meningitidis* según CLSI y EUCAST.

Antimicrobiano	CLSI (2010)		EUCAST(2011 v1.3)	
	S	R	S	R
Penicilina	$\leq 0,06$	$\geq 0,5$	$\leq 0,06$	$> 0,25$
Ampicilina	$\leq 0,12$	≥ 2	$\leq 0,12$	> 1
Cefotaxima	$\leq 0,12$	-*	$\leq 0,12$	$> 0,12^*$
Ceftriaxona	$\leq 0,12$	-*	$\leq 0,12$	$> 0,12^*$
Meropenem	$\leq 0,25$	-*	$\leq 0,25$	$> 0,25^*$

*Ambos comités consideran que las cepas no sensibles a cefalosporinas de tercera generación y meropenem son muy raras por lo que debe confirmarse su identificación y el resultado de la sensibilidad. EUCAST indica que mientras no haya evidencia de respuesta clínica eficaz en las infecciones producidas por estas cepas, se deben informar como resistentes.

El CLSI propone el medio Mueller-Hinton ajustado en cationes y suplementado con 2,5-5% de sangre lacada de caballo para el método de microdilución, y el medio Mueller-Hinton con 5% de sangre de oveja desfibrinada para el método de difusión en agar. El método del Etest en Mueller-Hinton con 5% de sangre de oveja presenta un alto grado de concordancia en los valores de CMI con el método de dilución en agar propuesto por el CLSI, por lo que puede ser una herramienta útil y accesible para la mayoría de los laboratorios clínicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Barry PM, Klausner JD. The use of cephalosporins for gonorrhea: the impending problem of resistance. Expert Opin Pharmacother 2009; 10:555-77.
2. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.
3. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:969-76.
4. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. Clin Microbiol Infect 2010; 16:102-11.
5. Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MA, Liñares J, López-Cerezo L, Marco F, Mirelis B, Morosini MI, Navarro F, Oliver A, Pérez-Trallero E, Torres C, Martínez-Martínez L; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25:394-400.
6. Cantón R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl 1):53-62.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth

- Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20-U (June 2010 Update). Wayne, PA. 2010
 9. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2010. (Edition de Janvier 2010). http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf.
 10. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1608-14.
 11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) (<<http://www.eucastr.org>>). 2011.
 12. García-Cobos S, Campos J, Román F, Carrera C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J. Low β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2407-14.
 13. García-Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avil C, Vila J. 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Picazo JJ, ed. Procedimientos en Microbiología Clínica. (<http://www.seimc.org/>) 1ª edición. 2000.
 14. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 2005; 41 (S2):120-6.
 15. Jacoby, GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2009; 22:161-82.
 16. Jorgensen JH, Crawford SA, Fulcher LC, Glennen A, Harrington SM, Swenson J, Lynfield R, Murray PR, Tenover FC. Multilaboratory Evaluation of disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria meningitidis* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44:1744-54
 17. Juan Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28 (Suppl 1):19-28.
 18. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2010; 10:597-602.
 19. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH.. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7:88-91.
 20. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. Clin Microbiol Infect 2008; 14:3-10.
 21. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1119-25.
 22. Martín O, Valverde A, Morosini MI, Rodríguez-Domínguez M, Rodríguez-Baños M, Coque TM, Cantón R, del Campo R. Population Analysis and epidemiological features of inhibitor-resistant-TEM- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from both community and hospital settings in Madrid, Spain. J Clin Microbiol, 2010; 487:2368-72.
 23. Martínez-Martínez L, Cano ME, Rodríguez-Martínez JM, Calvo J, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance. Expert Rev Anti Infect Ther 2008; 6:685-711.
 24. Mata C, Miró E, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Prevalence of acquired AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal *ampC* genes at a Spanish hospital from 1999 to 2007. Clin Microbiol Infect 2010; 16:472-6.
 25. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24:370-2.
 26. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martínez-Martínez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect 2010; 16:112-22.
 27. Miró E, Navarro F, Mirelis B, Sabaté M, Rivera A, Coll P, Prats G. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant β -lactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3991-4.
 28. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28:638-45.
 29. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9:228-36.
 30. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers? J Clin Microbiol 2011; 49:719-718.
 31. Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, de Abajo FJ, y Spanish Members of EARSS. Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. Emerg Infect Dis 2008; 14:1259-62.
 32. Paterson DL, Bonono RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18:657-86.
 33. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 40-58.
 34. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother 2010 Oct 1. [Epub ahead of print]
 35. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003; 51:1109-17.
 36. Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:2487-92.
 37. Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC, the SENTRY Participants Group. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial Surveillance programme. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18:414-421.
 38. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clin Microbiol Rev 2009; 22:664-89.
 39. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Cantón R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- β -

- lactamase in Spain: toward endemicity? Clin Infect Dis 2007; 45:1171-8.
40. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007; 20:368-89.
41. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev 2003;16:430-450.
42. Vázquez JA, Enríquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: Any need to act? FEMS Microbiol Rev 2007; 31:64-70.
43. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010; 36 (Suppl 3):S8-14.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-MRN-01

DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

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

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología 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 fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	PNT-MRN-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología para la detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante las técnicas de sinergia de doble disco, discos combinados con inhibidor y Etest ESBL. Estos procedimientos son aplicables a aislados clínicos de la familia *Enterobacteriaceae* y a *Pseudomonas aeruginosa* que presenten un patrón fenotípico sugestivo de producción de BLEE (sensibilidad disminuida o resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cefepima).

La incorporación de alguna de estas técnicas en las pruebas de sensibilidad de rutina permite una detección más rápida de BLEE.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas para la detección fenotípica de BLEE se basan en la propiedad que presentan la mayor parte de estas enzimas de ser inhibidas por ácido clavulánico y en la utilización de cefalosporinas de tercera y cuarta generación y aztreonam como indicadores.

La prueba de sinergia de doble disco consiste en situar un disco con amoxicilina-ácido clavulánico próximo a discos de betalactámicos indicadores. La producción de BLEE se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por la acción del ácido clavulánico.

La prueba de discos combinados con inhibidor es uno de los métodos que recomienda el CLSI (*Clinical Laboratory and Standards Institute*). Este método consiste en comparar los halos de inhibición de una cefalosporina de tercera o cuarta generación sola y con ácido clavulánico incorporado en los discos. La potenciación de la actividad de la cefalosporina en presencia de ácido clavulánico indica la producción de BLEE.

La prueba de Etest ESBL se fundamenta en el mismo principio que el de la prueba de discos combinados pero en este caso se comparan los valores de CMI. El Etest ESBL presenta en un extremo un gradiente de concentración de cefotaxima, ceftazidima o cefepima y en el otro un gradiente de la cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico.

Para mejorar la detección de BLEE en cepas que producen simultáneamente una betalactamasa de tipo AmpC cromosómica o plasmídica, estos métodos pueden modificarse con la adición de cloxacilina, al medio de cultivo o a los discos, que es un inhibidor de enzimas AmpC.

Algunos sistemas comercializados de estudio de sensibilidad por microdilución ya incorporan las asociaciones de cefalosporinas con ácido clavulánico para detectar las BLEE.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad
- Documento CLSI vigente
- Documento EUCAST vigente (www.eucast.org)
- Procedimientos en Microbiología n° 11, 1ª edición. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a

antimicrobianos. SEIMC. 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Estas técnicas se pueden realizar a partir del crecimiento obtenido en una placa de antibiograma o bien con colonias aisladas en una placa de cultivo reciente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos con solución salina estéril 0,9%
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina (250 µg/ml)
- Discos/tabletas: ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 µg), ceftazidima-ácido clavulánico (30/10 µg), cefotaxima-ácido clavulánico (30/10 µg), cefepima-ácido clavulánico (30/10 µg), cefotaxima-cloxacilina (30/500), cefotaxima-ácido clavulánico-cloxacilina (30/10/500 µg).
- Reactivos para la preparación de discos con inhibidor (en caso de no disponer de discos comerciales):
 - Ácido clavulánico
 - Cloxacilina
 - Agua destilada estéril
- Tiras para el estudio de CMI por la técnica de difusión en gradiente (Etest u otras). Un ejemplo son las tiras Etest ESBL (bioMérieux) que contienen cefotaxima (0,25-16 µg/mL) (CT) / cefotaxima (0,016-1 µg/mL) más 4 µg/mL de ácido clavulánico (CTL), ceftazidima (0,5-32 µg/mL) (TZ) / ceftazidima (0,064-4 µg/mL) más 4 µg/mL de ácido clavulánico (TZL), cefepima (0,25-16 µg/mL) (PM) / cefepima (0,064-4 µg/mL) más 4 µg/mL de ácido clavulánico (PML).
- Estándar de turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland

6. APARATOS Y MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Escobillones estériles
- Pinzas
- Pie de rey
- Mechero Bunsen o incinerador eléctrico
- Estufa incubadora de 36 °C
- Nevera 5 °C
- Agitador
- Nefelómetro

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

- Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	PNT-MRN-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

b) Situar un disco con cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa. En este sentido, en el caso de *Proteus mirabilis* se recomienda una distancia de 40-45 mm.

c) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

Consideraciones:

i) Hay que tener en cuenta los diámetros de inhibición con el fin de ajustar la distancia de separación entre los discos.

ii) En aislados productores de AmpC seguir el mismo procedimiento utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina en lugar de agar Mueller-Hinton.

7.2. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Colocar un disco con ceftazidima, ceftazidima-ácido clavulánico, cefotaxima, cefotaxima-ácido clavulánico, cefepima y cefepima-ácido clavulánico.

c) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

Preparación de los discos con inhibidor:

- Preparar la solución madre de inhibidor con las concentraciones siguientes:

- ácido clavulánico 1 mg/mL (disuelto en agua estéril)

- cloxacilina 50 mg/mL (disuelto en agua estéril)

- Añadir 10 µL de la solución de inhibidor a los discos con cefalosporinas.

- Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

Consideraciones:

i) Las soluciones madre pueden utilizarse después de su preparación o bien a partir de alícuotas congeladas a -70°C.

ii) Los discos combinados no deben almacenarse y deben utilizarse inmediatamente después de su preparación.

iii) Este procedimiento no puede realizarse con tabletas.

iv) En aislados productores de AmpC, se pueden aplicar cualquiera de las modificaciones siguientes:

- Seguir el mismo procedimiento utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina en lugar de agar Mueller-Hinton.

- Seguir el mismo procedimiento incluyendo un disco con cefotaxima-cloxacilina y cefotaxima-ácido clavulánico-cloxacilina. Se puede aplicar también la misma metodología con discos con ceftazidima.

7.3. ETEST ESB

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Dejar absorber el inóculo y asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tiras de Etest ESB.

c) Aplicar las tiras de Etest ESB sobre el agar con unas pinzas.

d) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

Consideraciones:

i) Asegurarse que la tira contacta completamente con la superficie de la agar. En caso de que se formen burbujas de aire bajo la tira, eliminarlas presionando ligeramente con las pinzas.

ii) Debido a que la difusión del antibiótico es inmediata, las tiras no se pueden recolocar una vez que han estado en contacto con la superficie de la agar.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se realizará siguiendo las directrices especificadas en los documentos de referencia adoptados por cada centro. Se recomienda realizar un control con cada nuevo lote de reactivos con las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 (control negativo) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (portadora de SHV-18 control positivo). Los resultados esperados del control de calidad se muestran en la tabla 1.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.

b) Negativo. No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepima o aztreonam ni presencia de "zona fantasma".

8.2. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco). Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

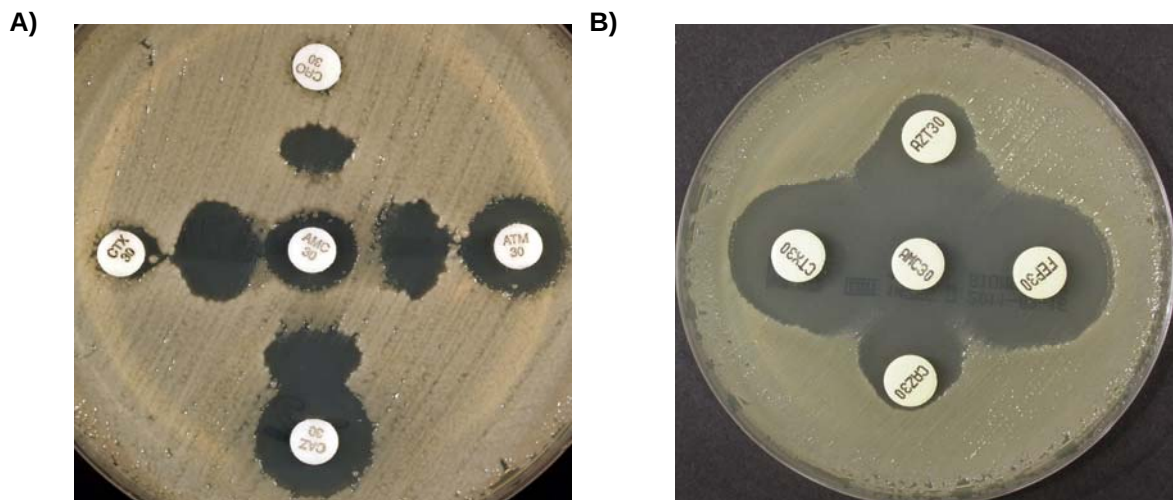
a) Positivo. Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima, cefotaxima o cefepima en presencia de ácido clavulánico ≥5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico, independientemente de la presencia o ausencia de cloxacilina en el disco/tableta.

Tabla 1.

Procedimiento	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
Sinergia de doble disco	Ausencia de sinergia	Presencia de sinergia
Discos combinados con inhibidor	Diferencia de diámetros de inhibición de cefalosporinas más clavulánico ≤2 mm respecto a las cefalosporinas correspondientes sin clavulánico	Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima, cefotaxima o cefepima en presencia de ácido clavulánico ≥5 mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin clavulánico
Etest ESBL	Valores de CMI inferiores al rango de las tiras	CT 1-4 µg/mL CTZ 0,125-1 µg/mL TZ 8-≥32 µg/mL TZL 0,125-0,5 µg/mL PM 0,25-1 µg/mL PML 0,064-0,25 µg/mL

CT, cefotaxima; CTZ, cefotaxima + ác. clavulánico; TZ, ceftazidima; TZL, ceftazidima + ác. clavulánico; PM, cefepima; PML, cefepima + ác. clavulánico

Figura 1. Cepa de *Escherichia coli* productora de CTX-M-15 (A) y cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 productora de SHV-18 (B). Se observa la sinergia positiva entre las cefalosporinas y ácido clavulánico.



ATM/AZT, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepima; AMC, amoxicilina -ácido clavulánico.

b) Negativo. No incremento o diferencia <5 mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con ácido clavulánico respecto a los de las cefalosporinas correspondientes sin ácido clavulánico. Los resultados positivos se interpretan según la tabla 2.

8.3. ETEST ESBL

Leer los valores de CMI de las diferentes cefalosporinas en presencia y en ausencia de ácido clavulánico. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Reducción de la CMI ≥3 diluciones dobles en presencia de ácido clavulánico para cualquier cefalosporina. La presencia de una zona fantasma o la deformación de la elipse de inhibición de las cefalosporinas también se considera positivo independientemente del ratio de CMI.

b) Negativo. No diferencia o reducción < 3 diluciones dobles de la CMI en presencia de ácido clavulánico ni presencia de zona fantasma ni deformación de la elipse de las cefalosporinas.

c) Ininterpretable. Valores de CMI por encima del rango de ambos gradientes de la tira.

El resultado positivo se informará como cepa portadora de BLEE. Se interpretarán resistentes todas las cefalosporinas (excepto cefoxitina) y aztreonam independientemente de la sensibilidad *in vitro* si se siguen los criterios del CLSI o EUCAST

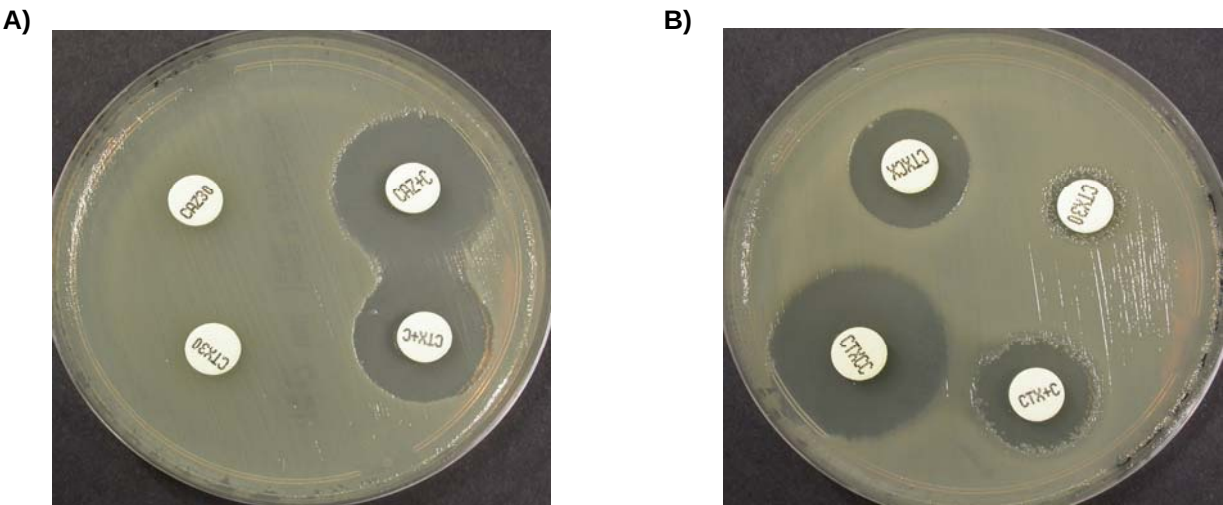
anteriores a 2009. Esta interpretación no es necesaria si se aplican los nuevos criterios y puntos de corte del CLSI o del EUCAST de 2010.

Tabla 2.

Mecanismo de resistencia		CTX	CTX+CLA	CTX+CLO
BLEE	CTX+CLA o	≥ 5 mm	-	-
	CTX+CLA+CLO	-	< 4 mm	≥ 5 mm
AmpC	CTX+CLO o	≥ 5 mm	-	-
	CTX+CLA+CLO	-	≥ 5 mm	< 4 mm
BLEE+AmpC	CTX+CLA y	< 4 mm	-	-
	CTX+CLA+CLO	-	≥ 5 mm	≥ 5 mm

CTX, cefotaxima; CLA, ácido clavulánico; CLO, cloxacilina.

Figura 2. Cepa de *Escherichia coli* productora de CTX-M-15 (A) y cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-9 y CMY-2 (B). Se observan diferencias > 5mm entre las cefalosporinas sin y con ácido clavulánico (A) y/o cloxacilina (B).



CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CAZ+C, ceftazidima + ácido clavulánico; CTX+C, cefotaxima + ácido clavulánico CTXCX, cefotaxima + cloxacilina; CTXCC, cefotaxima + ácido clavulánico + cloxacilina.

Figura 3. Cepas productoras de diferentes BLEE con Etest positivo.



CT, cefotaxima; CTL, cefotaxima + ácido clavulánico.

Servicio de Microbiología. Hospital.....	Detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	PNT-MRN-01	
		Edición Nº 01	Página 6 de 6

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización correcta de la técnica y del mantenimiento y calidad óptimos de reactivos y aparatos.

El facultativo será el responsable de la validación del informe y de contactar con el clínico para orientar el tratamiento y/o establecer las medidas de control que cada centro tenga consensuadas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La elección de cualquiera de las técnicas descritas dependerá de las preferencias de cada centro.

La prueba de sinergia de doble disco requiere que la distancia de separación de los discos sea óptima para evitar resultados falsos negativos o no concluyentes y la repetición de la prueba. La interpretación de la técnica de discos combinados con inhibidor es más objetiva que la prueba de sinergia de doble disco ya que los resultados obtenidos son cuantificables.

Para no perder sensibilidad en cualquiera de las pruebas es necesario estudiar como mínimo cefotaxima y ceftazidima. En el caso de cepas que produzcan simultáneamente betalactamasas de tipo AmpC, la resistencia a ácido clavulánico puede enmascarar el efecto sinérgico de la BLEE, por lo que es recomendable incluir cefepima como indicador.

Puede ser necesario confirmar y caracterizar el mecanismo de resistencia involucrado mediante técnicas de biología molecular.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La detección de BLEE utilizando estos procedimientos presenta algunas limitaciones derivadas principalmente de la presencia de otros mecanismos de resistencia en el mismo microorganismo, como pueden ser alteraciones en la permeabilidad o producción simultánea de otras betalactamasas.

En las *Enterobacteriaceae* se pueden observar fenotipos compatibles con BLEE con presencia de sinergia entre alguna cefalosporina de tercera o cuarta generación o aztreonam y amoxicilina-ácido clavulánico en diversas situaciones:

- hiperproducción de betalactamasa cromosómica K1 de *Klebsiella oxytoca* (ceftazidima se mantiene sensible y no se produce sinergia entre ésta y amoxicilina-ácido clavulánico pero sí con otras cefalosporinas de tercera generación, aztreonam y cefepima).
- hiperproducción de la enzima SHV-1 natural en *K. pneumoniae* y adquirida en otras especies (sinergia entre ceftazidima y amoxicilina-ácido clavulánico).
- hiperproducción de betalactamasas cromosómicas inducibles de *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* y *Citrobacter koseri* (sinergia entre cefotaxima y amoxicilina-ácido clavulánico).
- hiperproducción de enzimas tipo OXA no BLEE como OXA-1 (sinergia entre cefepima y amoxicilina-ácido clavulánico).

Además, las BLEE tipo OXA (OXA -11, -14, -18, -28, etc.) pueden no ser detectadas con estos métodos

debido a que son débilmente inhibidas por ácido clavulánico.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976.
2. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 1:90-103. Erratum in: *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 5: 21-24.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.
4. 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>).
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) 2011. (<http://www.eucast.org>).
6. Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MA, Liñares J, López-Cerezo L, Marco F, Mirelis B, Morosini MI, Navarro F, Oliver A, Pérez-Trallero E, Torres C, Martínez-Martínez L; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:394-400.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-MRN-02

DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS PLASMÍDICAS TIPO AmpC

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

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

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología 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.....	Detección fenotípica de betalactamasas plasmídicas tipo AmpC	PNT-MRN-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología para realizar la detección fenotípica de betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas (AmpCp) mediante las técnicas de sinergia de doble disco, discos combinados con inhibidor y aproximación de discos. Estos procedimientos son aplicables a aislados de la familia *Enterobacteriaceae* que no producen una betalactamasa AmpC cromosómica, natural de la especie. Es por tanto útil en *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter koseri* y *Salmonella* que presenten un patrón fenotípico sugestivo de producción de AmpCp (sensibilidad disminuida o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y cefalosporinas de tercera generación). La prueba de aproximación de discos también es aplicable a aislados que producen una betalactamasa AmpC cromosómica no inducible tales como *Escherichia coli*.

La incorporación de algunas de estas técnicas en las pruebas de sensibilidad de rutina permite una detección más rápida de betalactamasas AmpCp.

2. FUNDAMENTO

Las pruebas de sinergia de doble disco y de discos combinados con inhibidor para la detección fenotípica de AmpCp se basan en la propiedad que presentan estas enzimas de ser inhibidas por cloxacilina o ácido borónico y en la utilización de cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima) como indicadores. La prueba de sinergia de doble disco consiste en situar un disco con cloxacilina o ácido borónico próximo a discos de betalactámicos indicadores de producción de AmpC. La producción de AmpCp se demuestra por la ampliación del halo de inhibición de cualquiera de los indicadores por la acción del inhibidor.

La prueba de discos combinados con inhibidor consiste en comparar los halos de inhibición de un disco con alguna cefalosporina de tercera generación con el de un disco con la misma cefalosporina más cloxacilina o ácido borónico. La potenciación de la actividad de la cefalosporina en presencia del inhibidor indica la producción de AmpCp.

La prueba de aproximación de discos permite evidenciar el carácter inducible de la betalactamasa AmpCp. Consiste en situar un disco con un betalactámico inductor débil (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) cercano a un betalactámico inductor fuerte (imipenem, cefoxitina). El achatamiento del halo del betalactámico inductor débil en la zona adyacente al del inductor fuerte demuestra la expresión inducible de la betalactamasa.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad.
- Documento CLSI vigente.
- Documento EUCAST vigente (www.eucast.org)
- Procedimientos en Microbiología nº 11, 1ª edición. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. SEIMC. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Estas técnicas se pueden realizar a partir del crecimiento obtenido en una placa de antibiograma o bien con colonias aisladas en una placa de cultivo reciente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos con solución salina estéril 0,9%
- Agar Mueller-Hinton
- Discos/tabletas: ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima-cloxacilina (30/500 µg), cefotaxima-cloxacilina (30/500 µg), ácido borónico (250-400 µg), cloxacilina (500 µg)
- Reactivos para la preparación de discos con inhibidor (en caso de no disponer de discos comerciales):
 - Cloxacilina
 - Ácido amino-fenil-borónico o ácido fenil-borónico
 - Agua destilada estéril
 - DMSO
 - Discos blancos
- Estándar de turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland

6. APARATOS Y MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Escobillones estériles
- Pinzas
- Pie de rey
- Mechero Bunsen o incinerador eléctrico
- Estufa incubadora de 36°C
- Nevera 5°C
- Agitador
- Nefelómetro

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LOS DISCOS CON INHIBIDOR

- Preparar la solución madre de ácido amino-fenil-borónico (disuelto en agua estéril) o fenil-borónico (disuelto en DMSO y agua estéril) o cloxacilina (disuelta en agua estéril).
- Añadir el volumen adecuado de la solución de inhibidor a los discos blancos (prueba de sinergia de doble disco) o a los discos con cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) (prueba de discos combinados) según la cantidad final por disco que se desee.
- Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

7.2. PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

- Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.
- Situar un disco con cefotaxima y un disco con ceftazidima a una distancia de 20-25 mm (centro a centro) de un disco con cloxacilina o ácido borónico.

Servicio de Microbiología.....	Detección fenotípica de betalactamasas plasmídicas tipo AmpC	PNT-MRN-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

c) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

Consideraciones:

Hay que tener en cuenta los diámetros de inhibición con el fin de ajustar la distancia de separación entre los discos.

7.3. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Colocar un disco con ceftazidima, ceftazidima-cloxacilina, cefotaxima y cefotaxima-cloxacilina. Alternativamente se pueden utilizar discos combinados de las cefalosporinas con ácido borónico.

c) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

7.4. PRUEBA DE APROXIMACIÓN DE DISCOS

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Situar discos de betalactámicos inductores débiles tales como cefotaxima, ceftazidima y aztreonam cercanos a discos de betalactámicos inductores fuertes tales como cefoxitina y imipenem.

c) Incubar a 35±2°C durante 16-20 horas.

Consideraciones:

Hay que tener en cuenta los diámetros de inhibición con el fin de ajustar la distancia de separación entre los discos.

7.5. CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se realizará siguiendo las directrices especificadas en los documentos de referencia adoptados por cada centro. Se recomienda realizar un control con cada nuevo lote de reactivos con las cepas *E. coli* ATCC 25922 (control negativo) y *E. coli* TG22 productora de CMY-2 y utilizada en un estudio de control de calidad nacional (cepas del Control de Calidad SEIMC) o cualquier otra cepa control positivo. Para la prueba de aproximación de discos para ver la inducción se puede utilizar cualquier aislado de *Enterobacter cloacae* o *Pseudomonas aeruginosa*. En este caso, se observará un achatamiento del halo de inhibición (forma de D) de los betalactámicos inductores débiles (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) en la zona a próxima al disco con el betalactámico inductor fuerte (cefotaxima, imipenem).

Procedimiento	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> TG22
Sinergia de doble disco	Ausencia de sinergia	Presencia de sinergia
Discos combinados con inhibidor	Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima o cefotaxima en presencia de cloxacilina o ácido borónico ≤2 mm al de la cefalosporina correspondiente sin inhibidor	Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima o cefotaxima en presencia de cloxacilina o ácido borónico ≥5 mm al de la cefalosporina correspondiente sin inhibidor

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1 PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con cloxacilina o ácido borónico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor.

b) Negativo. No ampliación de los halos de inhibición de las cefalosporinas ni presencia de "zona fantasma".

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp.

8.2. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) con un pie de rey. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

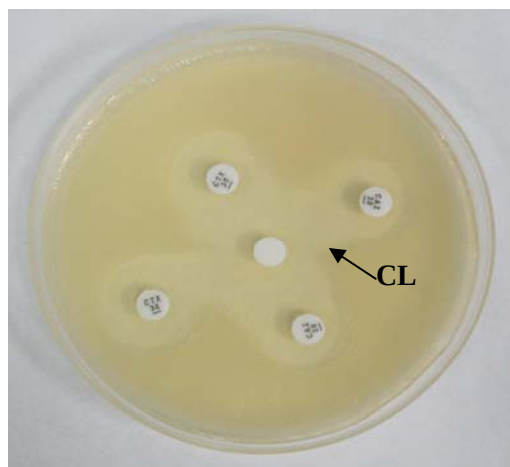
a) Positivo. Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima o cefotaxima en presencia de cloxacilina o ácido borónico ≥5 mm al de la cefalosporina correspondiente sin inhibidor.

b) Negativo. No diferencia o diferencia <5 mm en los halos de inhibición de las cefalosporinas con cloxacilina o ácido borónico con respecto al de las cefalosporinas correspondientes sin inhibidor.

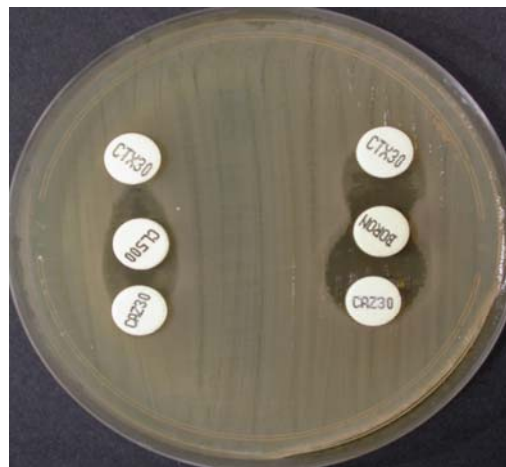
El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp.

Figura 1. A) Cepa de *K. pneumoniae* productora de CMY-2. B) Cepa de *P. mirabilis* productora de CMY-2. Se observa sinergia positiva entre las cefalosporinas y la cloxacilina y el ácido borónico.

A)



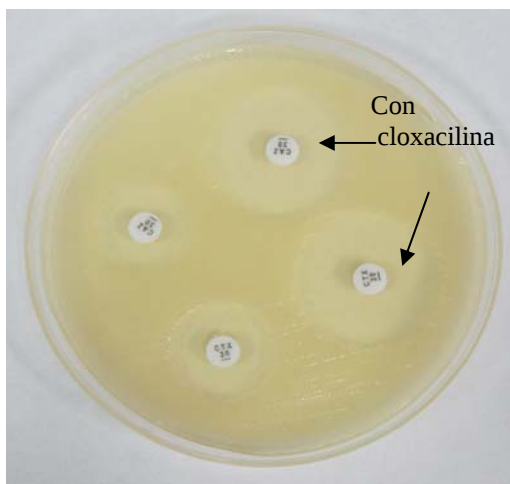
B)



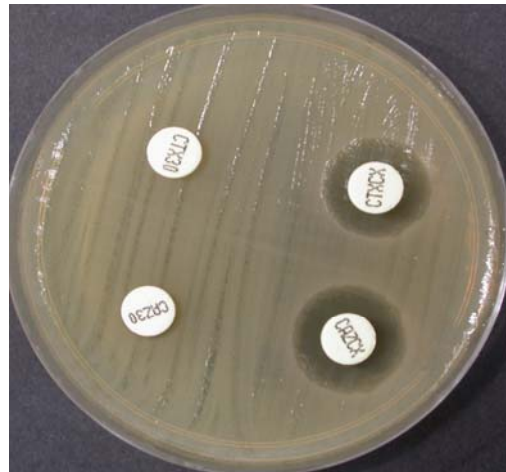
CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CL, cloxacilina; BORON, ácido borónico.

Figura 2. A) Cepa de *K. pneumoniae* productora de CMY-2. B) Cepa de *P. mirabilis* productora de CMY-2.

A)



B)



CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; CTXCX, cefotaxima + cloxacilina; CAZCX, ceftazidima + cloxacilina

8.3. PRUEBA DE APROXIMACIÓN DE DISCOS

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Achatamiento del halo de inhibición (forma de D) de los betalactámicos inductores débiles (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) en la zona a próxima al disco con el betalactámico inductor fuerte (cefoxitina, imipenem).

b) Negativo. No modificación de los halos de inhibición.

El resultado positivo se informará como cepa portadora de AmpCp Inducible. En caso de obtener un resultado positivo en *E. coli* nos indica sin duda que se trata de una AmpCp y no de una hiperproducción de su betalactamasa cromosómica, dado que esta última no es inducible.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización correcta de la técnica y del mantenimiento y calidad óptimos de reactivos y aparatos.

El facultativo será el responsable de la validación del informe y de contactar con el clínico para orientar el tratamiento y/o establecer las medidas de control que cada centro tenga consensuadas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

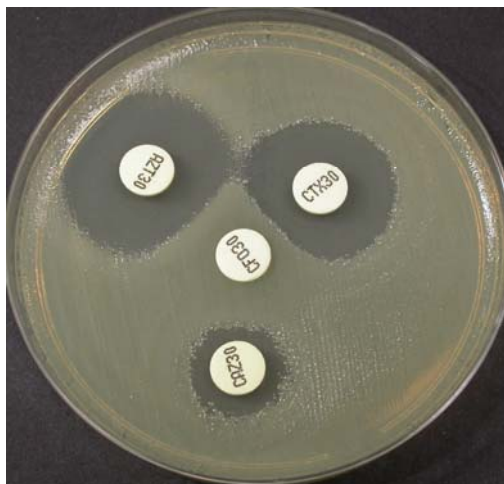
La presencia de colonias en el interior de los halos de cefalosporinas y aztreonam en la zona próxima al margen de inhibición constituye una característica fenotípica altamente sugestiva de la presencia de AmpCp. Este hecho puede ser especialmente útil en *E. coli* para sospechar la presencia de una AmpCp en lugar de una hiperproducción de su betalactamasa cromosómica.

Servicio de Microbiología.....	Detección fenotípica de betalactamasas plasmídicas tipo AmpC	PNT-MRN-02	
		Edición Nº 01	Página 5 de 5

Puede ser necesario confirmar y caracterizar el mecanismo de resistencia involucrado mediante

técnicas de biología molecular.

Figura 3. Cepa de *K. pneumoniae* productora de DHA-1 (betalactamasa AmpCp inducible). Se observa el achataamiento de los halos de aztreonam (AZT) y cefotaxima (CTX) en la zona cercana al disco de cefoxitina (CFO).



AZT, aztreonam; CAZ, ceftazidima; CFO, cefoxitina; CTX, cefotaxima

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación de estos métodos es que sólo son aplicables a determinadas especies bacterianas ya que no permite diferenciar entre betalactamasas AmpC plasmídicas y cromosómicas. Adicionalmente, la utilización de ácido borónico reduce la especificidad en la detección ya que también puede dar resultados positivos en cepas productoras de carbapenemasas de clase A como las KPC.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:969-976.
2. Jacoby, G A. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161-182.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.

4. 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>)
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) 2011. (<http://www.eucast.org>).
6. Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MA, Liñares J, López-Cerezo L, Marco F, Mirelis B, Morosini MI, Navarro F, Oliver A, Pérez-Trallero E, Torres C, Martínez-Martínez L; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 394-400.
7. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A. Detection and reporting beta-lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62: 317-325.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-MRN-03
DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

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

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología 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 fenotípica de carbapenemasas	PNT-MRN-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la metodología para la detección fenotípica de carbapenemasas mediante las técnicas de Hodge modificado, sinergia de doble disco, discos combinados con inhibidor y Etest MBL.

Estos procedimientos son aplicables a aislados de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos que presenten un patrón fenotípico compatible con la producción de carbapenemasas (sensibilidad disminuida o resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos).

2. FUNDAMENTO

Las carbapenemasas son un grupo heterogéneo de betalactamasas distribuidas en las clases moleculares A, B y D que presentan actividad hidrolítica sobre los carbapenémicos y la práctica totalidad de los antibióticos betalactámicos clínicamente relevantes.

El test de Hodge modificado es la técnica que el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda para la detección fenotípica de carbapenemasas. La inactivación de los carbapenémicos por la cepa productora de carbapenemasa permite el crecimiento de un microorganismo indicador sensible a los lados de una estría efectuada con la cepa productora, en una placa con un disco de carbapenémico. Esta técnica permite detectar la producción de carbapenemasas pero no proporciona información sobre la clase a la que pertenecen. Para ello se utilizan las técnicas de sinergia de doble disco, discos combinados con inhibidor y Etest MBL que se basan en la potenciación de la actividad de los carbapenémicos en presencia de inhibidores de carbapenemasas. Para la detección de carbapenemasas de clase A, el inhibidor utilizado es el ácido borónico. Para la detección de carbapenemasas de clase B los inhibidores son el ácido dipicolínico o EDTA.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de bioseguridad
- Documento CLSI vigente
- Documento EUCAST vigente (www.eucast.org)
- Procedimientos en Microbiología nº 11, 1ª edición. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. SEIMC. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Estas técnicas se pueden realizar a partir del crecimiento obtenido en una placa de antibiograma o bien con colonias aisladas en una placa de cultivo reciente.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tubos con solución salina estéril 0,9%
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina (250 µg/ml)

- Discos/Tabletas: imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem-cloxacilina (10/500-750 µg), meropenem-cloxacilina (10/500-750 µg), imipenem-ácido borónico (10/300-600 µg), meropenem-ácido borónico (10/300-600 µg), imipenem-ácido dipicolínico (10/250-1000 µg), meropenem-ácido dipicolínico (10/250-1000 µg), imipenem-EDTA (10/730-1500 µg), meropenem-EDTA (10/730-1500 µg), ácido borónico (300-600 µg), ácido dipicolínico (250-1000 µg), EDTA (750-1500 µg), Etest MBL (bioMérieux).

- Reactivos para la preparación de discos con inhibidor (en caso de no disponer de discos comerciales):

- Cloxacilina
- Ácido amino-fenil-borónico o ácido fenil-borónico
- Ácido dipicolínico
- EDTA
- Agua destilada estéril
- DMSO
- Discos blancos

- Estándar de turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland

- Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

6. APARATOS Y MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Escobillones estériles
- Pinzas
- Portaobjetos
- Pie de rey
- Mechero Bunsen o incinerador eléctrico
- Estufa incubadora de 36°C
- Nevera 5°C
- Agitador
- Nefelómetro

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LOS DISCOS CON INHIBIDOR

a) Preparar las soluciones madre de ácido amino-fenil-borónico (disuelto en agua estéril) o fenil-borónico (disuelto en DMSO y agua estéril), cloxacilina (disuelto en agua estéril), ácido dipicolínico (disuelto en DMSO y agua estéril) o EDTA (disuelto en agua estéril).

b) Añadir el volumen adecuado de la solución de inhibidor a los discos blancos (prueba de sinergia de doble disco) o a los discos con carbapenémicos (prueba de discos combinados) según la cantidad final por disco que se desee.

c) Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

7.2. TEST DE HODGE MODIFICADO

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en solución salina con una

Servicio de Microbiología Hospital	Detección fenotípica de carbapenemasas	PNT-MRN-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland diluida al 1:10.

b) Colocar un disco con un carbapenémico (imipenem, meropenem o ertapenem) en el centro de la placa.

c) Inocular 3-5 colonias de la cepa problema formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa.

d) Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas.

Consideraciones:

i) Se pueden estudiar hasta cuatro o cinco cepas por placa.

ii) En las cepas que presenten un fenotipo de hiperproducción de AmpC utilizar agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina (250 $\mu\text{g/mL}$) o bien discos de carbapenémicos con cloxacilina puesto que las enzimas AmpC presentan una cierta actividad hidrolítica sobre carbapenémicos que dan lugar a resultados falsamente positivos.

iii) Cuando se evalúan cepas del género *Proteus*, la presencia de *swarming* puede dificultar la lectura de la pruebas. En este caso se recomienda realizar la prueba en medios cromogénicos como el CPS ID, o en agar MacConkey.

iv) Si el resultado es ininterpretable (inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría) se recomienda repetir la prueba utilizando otra cepa indicadora como *E. coli* ATCC 35218.

v) No utilizar ertapenem en *P. aeruginosa* puesto que es intrínsecamente resistente.

7.3. PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Colocar discos con carbapenémicos (imipenem, meropenem) y un disco con inhibidor (ácido borónico para descartar carbapenemasas de clase A y ácido dipicolínico o EDTA para carbapenemasas de clase B) a 1-2 cm (margen a margen). La separación óptima de los discos puede variar en función de la cepa.

c) Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas.

Consideraciones:

Hay que tener en cuenta los diámetros de inhibición para ajustar la distancia óptima de separación entre los discos.

7.4. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Colocar un disco con meropenem, meropenem+cloxacilina, meropenem+ácido borónico y meropenem+ácido dipicolínico o meropenem+EDTA. También pueden utilizarse discos con imipenem y las mismas combinaciones de inhibidores.

c) Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas.

7.5. ETEST MBL

a) Seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos e inocular una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland.

b) Dejar absorber el inóculo y asegurarse que la superficie del agar está completamente seca antes de aplicar las tira de Etest MBL.

c) Aplicar la tira de Etest MBL sobre el agar con unas pinzas.

d) Incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas.

Consideraciones:

i) Asegurarse que la tira contacta completamente con la superficie del agar. En caso de que se formen burbujas de aire bajo la tira, eliminarlas presionando ligeramente con las pinzas.

ii) Debido a que la difusión del antibiótico es inmediata, las tiras no se pueden recolocar una vez han estado en contacto con la superficie del agar.

7.6. CONTROL DE CALIDAD

Se realizará siguiendo las directrices especificadas en los documentos de referencia adoptados por cada centro. Se recomienda realizar un control con cada nuevo lote de reactivos con las cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 o *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (controles negativos) y cepas portadora de carbapenemasa como *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (portadora de NDM-1), *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (portadora de KPC-2) o cepas controladas por el laboratorio (controles positivos).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. TEST DE HODGE MODIFICADO

Examinar visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

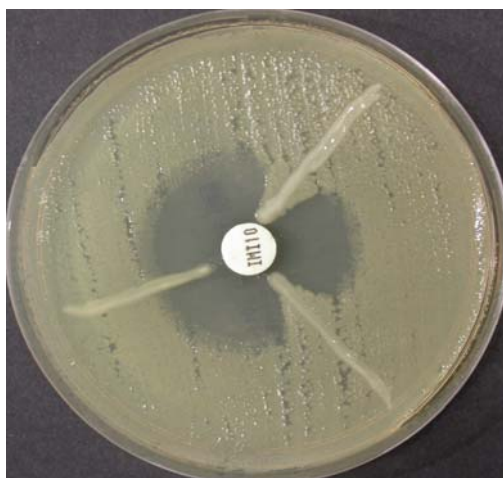
a) Positivo. Presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido de al crecimiento de la cepa indicadora.

b) Negativo. Ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría.

c) Ininterpretable. Inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría.

Los resultados positivos se deben confirmar con otros métodos.

Figura 1. Test modificado de Hodge donde se observan dos cepas positivas y una negativa.



8.2. PRUEBA DE SINERGIA DE DOBLE DISCO

Examinar visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de

inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el inhibidor.

b) Negativo. No ampliación de los halos de inhibición del carbapenémico ni presencia de “zona fantasma”.

Figura 2. Prueba de sinergia de doble disco positiva en el caso de una cepa de A) *Klebsiella pneumoniae* portadora de la betalactamasa KPC y B) *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la betalactamasa VIM-2.

A)



B)



BORON, ácido borónico; ETP, Ertapenem; IMI, imipenem; MRP, meropenem; D.P.A, ácido dipicolínico.

Los resultados positivos se interpretan según la tabla siguiente:

Resultado	Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia
Sinergia carbapenémico- ácido borónico	Carbapenemasa de Clase A y/o Hiperproducción de AmpC
Sinergia carbapenémico-ácido dipicolínico o Sinergia carbapenémico-EDTA	Carbapenemasa de Clase B

8.3. PRUEBA DE DISCOS COMBINADOS CON INHIBIDOR

Medir en milímetros los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) con un pie de rey. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

a) Positivo. Incremento ≥ 5 mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

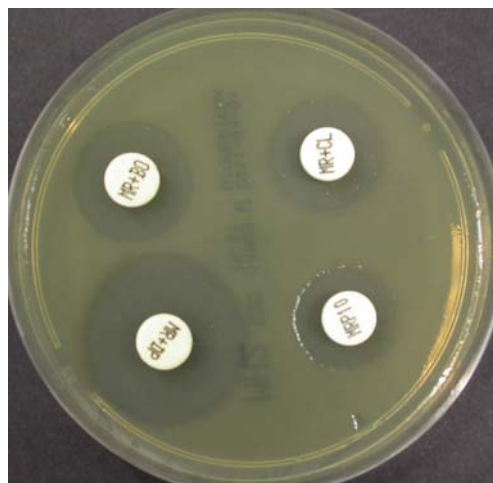
b) Negativo. No diferencia o incremento < 5 mm en el halo de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico.

Figura 3. Prueba de discos combinados con inhibidor positivas en el caso de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* portadora de la betalactamasa KPC, A) y de *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la betalactamasa VIM-2, B).

A)



B)



MRP, meropenem; MR+DP, meropenem + ácido dipicolínico; MR+CL, meropenem + cloxacilina; MR+BO, meropenem + ácido borónico.

Los resultados positivos se interpretan según la tabla siguiente:

Resultado	Tipo de Carbapenemasa/Mecanismo de resistencia
CAR+BOR ≥ 5 mm CAR y CAR+CLO < 5 mm CAR ¹	Carbapenemasa de Clase A
CAR+DPA ≥ 5 mm CAR CAR+EDTA ≥ 5 mm CAR	Carbapenemasa de Clase B
CAR+BOR y CAR+CLO ≥ 5 mm CAR	Hiperproducción de AmpC o Hiperproducción de AmpC + Carbapenemasa de Clase A

CAR, carbapenémico; BOR, ácido borónico; CLO, cloxacilina; DPA, ácido dipicolínico.

¹La ausencia de inhibición con cloxacilina descarta la hiperproducción de betalactamasas AmpC.

8.4. ETEST MBL

Leer los valores de CMI de imipenem (IP) e imipenem más EDTA (IPI) en la escala de la tira en los puntos de intersección de las elipses de inhibición del crecimiento.

Figura 4. Prueba de Etest positiva en el caso de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* portadora de la betalactamasa VIM-2. Se observa zona fantasma en el centro.



Servicio de Microbiología Hospital	Detección fenotípica de carbapenemasas	PNT-MRN-03	
		Edición Nº 01	Página 6 de 7

Los resultados se interpretan según la tabla siguiente:

Resultado	Observación
Positivo	El valor del ratio de CMI de IP/IPI es ≥ 8 o $\geq 3 \log_2$ $\left(\frac{\text{MIC imipenem}}{\text{MIC imipenem} + \text{EDTA}} \right) \geq 8$ Presencia de una zona fantasma entre las dos secciones de gradientes o deformación de la elipse de IP independientemente del ratio de CMI de IP/IPI
Negativo	El valor del ratio de CMI de IP/IPI es < 8 o $< 3 \log_2$. $\left(\frac{\text{MIC imipenem}}{\text{MIC imipenem} + \text{EDTA}} \right) < 8$ Ausencia de zona fantasma entre los dos gradientes o de deformación de la elipse de IP
Ininterpretable	Valores de CMI de IP $< 4 \text{ mg/L}$ o IPI $> 64 \text{ mg/L}$

El resultado positivo se informará como cepa productora de carbapenemasa de clase B o metalo-betalactamasa.

Resumen de interpretación de las técnicas descritas:

Técnica		Mecanismo de resistencia			
		Carbapenemasa		AmpC + reducción permeabilidad	BLEE + reducción permeabilidad
		Clase A	Clase B		
THM		+	+	+/-	+/-
Sinergia doble disco	CAR-BOR	+	-	+/-	-
	CAR-DPA	-	+	-	-
	CAR-EDTA	-	+	-	-
Discos combinados	CAR-BOR	+	-	+/-	-
	CAR-CLO	-	-	+/-	-
	CAR-DPA	-	+	-	-
Etest MBL		-	+	-	-

THM, Test de Hodge modificado; CAR, carbapenémico; BOR, ácido borónico; DPA, ácido dipicolínico; CLO, cloxacilina; BLEE, betalactamasa de espectro extendido.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos serán los responsables de la realización correcta de la técnica y del mantenimiento y calidad óptimos de reactivos y aparatos.

El facultativo será el responsable de la validación del informe y de contactar con el clínico para orientar el tratamiento y/o establecer las medidas de control que cada centro tenga consensuadas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Puede ser necesario confirmar y caracterizar el mecanismo de resistencia involucrado mediante técnicas de biología molecular.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El principal inconveniente del test de Hodge modificado es su baja especificidad, ya que también puede resultar positivo en cepas con hiperproducción de betalactamasas AmpC o producción de

Servicio de Microbiología Hospital	Detección fenotípica de carbapenemasas	PNT-MRN-03	
		Edición Nº 01	Página 7 de 7

betalactamasas de espectro extendido (BLEE) CTX-M, junto con alteraciones en las porinas. Si bien las betalactamasas AmpC pueden ser inhibidas con la adición de cloxacilina al medio de cultivo o a los discos, en zonas con elevada prevalencia de BLEE de tipo CTX-M los resultados positivos deben ser confirmados con otros métodos.

Los métodos basados en la utilización de ácido borónico pueden presentar baja especificidad y pueden producirse resultados falsos positivos debido a la hiperproducción de enzimas de tipo AmpC ya que también es un inhibidor de estas enzimas.

El Etest MBL presenta baja sensibilidad en *Enterobacteriaceae* productores de carbapenemasas con bajas CMI de imipenem (≤ 4 µg/mL). También se han descrito resultados falsos positivos con este método en *Acinetobacter baumannii* debido a la producción de determinadas oxacilinasas.

Adicionalmente, los métodos fenotípicos resultan inadecuados para la detección de las carbapenemasas tipo OXA.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-976.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA. 2010.
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. (EUCAST) 2011. (<http://www.eucast.org>).
5. Cantón R, Alós JI, Baquero F, Calvo J, Campos J, Castillo J, Cercenado E, Domínguez MA, Liñares J, López-Cerezo L, Marco F, Mirelis B, Morosini MI, Navarro F, Oliver A, Pérez-Trallero E, Torres C, Martínez-Martínez L; Grupo de Consenso de Recomendaciones para Selección de Antimicrobianos y Concentraciones en Estudio de Sensibilidad *in vitro* con Sistemas Automáticos y Semiautomáticos. Recomendaciones para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad *in vitro* con sistemas automáticos y semiautomáticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 394-400.
6. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martínez-Martínez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:112-122.