

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



55

## Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes

### Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

### Coordinador

Jesús Oteo Iglesias

### Autores

Germán Bou Arevalo  
Fernando Chaves Sánchez  
Antonio Oliver Palomo  
Jesús Oteo Iglesias



ISBN: 978-84-608-5435-7

**EDITORES:**

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

**SUGERENCIA DE CITACIÓN:**

Bou Arevalo G, Chaves Sánchez F, Oliver Palomo A, Oteo Iglesias J. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. 55. Oteo Iglesias J (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.

**AVISO:**

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

## **55.** MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA VIGILANCIA DEL ESTADO DE PORTADOR DE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES. **2015**

Coordinador:

Jesús Oteo Iglesias<sup>1</sup>

Autores:

Germán Bou Arevalo<sup>2</sup>

Fernando Chaves Sánchez<sup>3</sup>

Antonio Oliver Palomo<sup>4</sup>

Jesús Oteo Iglesias<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Laboratorio de Antibióticos, Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. <sup>2</sup> Servicio de Microbiología-INIBIC, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña. <sup>3</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Biomédica Hospital 12 de Octubre i + 12, Madrid. <sup>4</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca

## ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

<b>1.</b>	Introducción.....	6
<b>2.</b>	Diferentes abordajes de la vigilancia microbiológica: consideraciones generales .....	7
	2.1. Recogida, transporte, conservación y procesamiento de la muestra.....	7
	2.2. Métodos tradicionales basados en el cultivo. Medios cromogénicos.....	8
	2.3. Métodos moleculares .....	9
	2.4. Métodos basados en proteómica .....	9
<b>3.</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM).....	10
	3.1. Impacto clínico y epidemiológico .....	10
	3.2. Métodos basados en el cultivo .....	10
	3.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación .....	10
	3.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	11
	3.2.3. Información de los resultados .....	12
	3.3. Métodos moleculares .....	12
	3.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección.....	12
	3.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados.....	12
	3.3.3. Información de los resultados .....	13
<b>4.</b>	<i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos .....	14
	4.1. Impacto clínico y epidemiológico .....	14
	4.2. Métodos basados en el cultivo .....	14
	4.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación .....	14
	4.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	15
	4.2.3. Información de los resultados .....	15
	4.3. Métodos moleculares .....	15
	4.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección.....	15
	4.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados.....	15
<b>5.</b>	Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), AmpC plasmídicas (AmpC-p) y carbapenemasas (EPC) .....	16
	5.1. Impacto clínico y epidemiológico .....	16
	5.2. Métodos basados en el cultivo .....	17
	5.2.1. BLEE y AmpC plasmídicas .....	17
	5.2.1.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación.....	17
	5.2.1.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	18
	5.2.1.3. Información de los resultados .....	18
	5.2.2. Carbapenemasas .....	18
	5.2.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación.....	18
	5.2.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	20
	5.2.2.3. Información de los resultados .....	21
	5.3. Métodos moleculares para la detección de BLEE, AmpC-p y carbapenemasas.....	21
	5.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección.....	21
	5.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados.....	23

<b>6.</b>	<b><i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente a antibióticos.....</b>	<b>25</b>
6.1.	Impacto clínico y epidemiológico .....	25
6.2.	Métodos basados en el cultivo .....	26
6.2.1.	Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación .....	26
6.2.2.	Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	27
6.2.3.	Información de los resultados .....	27
6.3.	Métodos moleculares .....	28
6.3.1.	Tipos de métodos moleculares y selección.....	28
6.3.2.	Criterios para la interpretación e información de los resultados .....	28
<b>7.</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente a antibióticos .....</b>	<b>29</b>
7.1.	Impacto clínico y epidemiológico .....	29
7.2.	Métodos basados en el cultivo .....	31
7.2.1.	Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación .....	31
7.2.2.	Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados .....	31
7.2.3.	Información de los resultados .....	32
7.3.	Métodos moleculares .....	32
7.3.1.	Tipos de métodos moleculares y selección.....	32
7.3.2.	Criterios para la interpretación e información de los resultados .....	33
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>33</b>

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-MMV-01. Métodos microbiológicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en muestras de vigilancia
2. PNT-MMV-02. Métodos microbiológicos para la detección de *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos en muestras de vigilancia
3. PNT-MMV-03. Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia
4. PNT-MMV-04. Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia
5. PNT-MMV-05. Métodos microbiológicos para la detección de *Acinetobacter baumannii* multirresistente a antibióticos en muestras de vigilancia
6. PNT-MMV-06. Métodos microbiológicos para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a antibióticos en muestras de vigilancia

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia combinada a múltiples antibióticos en algunas de las principales bacterias patógenas en humanos está aumentando en los últimos años. Este hecho está generando una importante amenaza para la salud pública y para la salud individual de los pacientes, debido a que limita de manera importante las alternativas terapéuticas frente a las infecciones producidas por estos patógenos.

Aunque se han utilizado diferentes criterios y conceptos para definir la multirresistencia (MDR), Magiorakos et al. la definieron recientemente como la ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de tres o más familias consideradas de utilidad para el tratamiento de las infecciones producidas por cada una de las especies bacterianas consideradas. En este mismo trabajo se definió la resistencia extensa (XDR) como la ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de todas las familias excepto una o dos y la panresistencia (PDR) como la ausencia de sensibilidad a todos los antibióticos de todas las familias habitualmente utilizadas en el tratamiento de la bacteria considerada.

La aparición de MDR afecta tanto a bacterias grampositivas como a gramnegativas, sin embargo merece especial atención la diseminación de bacterias gramnegativas XDR y PDR, en especial *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas especies de enterobacterias, principalmente *Klebsiella pneumoniae*.

El mayor impacto clínico de las bacterias MDR se produce en la infección nosocomial en la que suelen verse afectados pacientes con patología de base grave. No obstante, cada vez son más frecuentes las infecciones por bacterias MDR de inicio comunitario, generalmente asociadas a cuidados sanitarios pero también comunitarias estrictas, como son las producidas por *Escherichia coli* productor de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), o por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM).

Las bacterias MDR más prevalentes suelen presentar una alta capacidad de diseminación epidémica, no sólo intrahospitalaria sino también inter- y extrahospitalaria. Además, la posibilidad de transferencia horizontal de la MDR a través de diversos elementos genéticos móviles añade mayor gravedad al problema y favorece la aparición de brotes. La presencia de pacientes colonizados por este tipo de bacterias es

una de sus principales vías de propagación. La contención de esta expansión es una prioridad asistencial en los centros sanitarios, así como una prioridad de salud pública reconocida por las principales instituciones nacionales e internacionales. Por tanto, además del conocimiento generado por el diagnóstico microbiológico de los pacientes infectados, son necesarios los estudios de vigilancia microbiológica locales que permitan una detección precoz de los pacientes colonizados por este tipo de bacterias.

En 2007, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) publicó un Procedimiento de Microbiología Clínica titulado "Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial" (nº 26). Desde entonces se han producido importantes cambios tanto en la epidemiología de las bacterias MDR en España, principalmente con la irrupción y rápida dispersión de las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC), como en los métodos moleculares para el diagnóstico rápido de muchas de estas bacterias.

El presente documento pretende actualizar y complementar la información previamente recogida en el procedimiento de 2007 adaptándolo a las condiciones epidemiológicas y técnicas actuales; por tanto se remitirá a las recomendaciones recogidas en 2007 que sigan vigentes, realizando un desarrollo más pormenorizado de aquellas técnicas más novedosas.

Aunque muchas son las especies bacterianas que ocasionalmente pueden generar brotes en los centros sanitarios, en este documento se abordan aquellas de mayor interés debido a su frecuencia, su impacto clínico y epidemiológico y las dificultades terapéuticas que suponen: SARM, *Enterococcus* spp. resistente a los glucopéptidos (ERG), enterobacterias productoras de BLEE o de beta-lactamasas plasmídicas de tipo AmpC (AmpC-p), EPC, *A. baumannii* multirresistente y *P. aeruginosa* multirresistente.

Las opciones metodológicas disponibles en la actualidad para la detección de colonización por bacterias multirresistentes son múltiples lo que permite diferentes aproximaciones en función de las características de cada caso. La información general recogida en este documento debe considerarse como una estructura matriz que se beneficiará de una adecuada adaptación a las necesidades específicas de cada centro establecidas por el equipo multidisciplinar de control de la infección nosocomial de cada centro.

## 2. DIFERENTES ABORDAJES DE LA VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA: CONSIDERACIONES GENERALES

### 2.1. RECOGIDA, TRANSPORTE, CONSERVACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su Procedimiento de Microbiología Clínica nº 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología."

Como con cualquier otra muestra recibida en el Laboratorio de Microbiología, se debe comprobar que está correctamente identificada, que se recibe en cantidad suficiente y que se han cumplido las condiciones de transporte y conservación adecuadas. Además debe constar explícitamente que la solicitud corresponde a un "cultivo de vigilancia microbiológica" así como la bacteria y problema de resistencia a vigilar, ya que en función de ello se debe evaluar la adecuación del tipo de muestra a la prueba solicitada. A título orientativo, en la Tabla 1 se recogen las localizaciones de mayor interés para la búsqueda con fines epidemiológicos de los patógenos multirresistentes considerados. Se recomienda procesar la muestra a la mayor celeridad posible en un tiempo inferior a 24 horas; si no se va a procesar de manera inmediata es recomendable su conservación a 2-8°C para facilitar la recuperación de la bacteria a vigilar evitando el sobrecrecimiento de la microbiota comensal.

La toma de muestras en la vigilancia microbiológica de SARM va dirigida a detectar pacientes o personal sanitario colonizados por este microorganismo. En diferentes estudios se han evaluado múltiples muestras, como el exudado nasal y faríngeo, perineal, axilar, orina, heces o exudado vaginal. Aunque muchas de estas muestras pueden ser válidas, es aconsejable emplear las que son más rentables a efectos de la vigilancia. En estudios previos de colonización por SARM, la sensibilidad observada en función del tipo de muestra ha sido: 31-48% el exudado faríngeo, 19-38% el exudado perineal, 78-82% el exudado nasal, 85-92% el nasal junto con el faríngeo, 88-93% el nasal junto con el perineal, y 98% la triple toma nasal, faríngeo y perineal. Por tanto, se considera que el exudado nasal es la muestra más adecuada si se elige una única muestra para los cultivos de vigilancia. El exudado

de piel de la zona perineal-perirrectal no se aconseja como muestra única. Determinadas muestras específicas pueden ser útiles en el caso de pacientes con ventilación mecánica o traqueostomía (muestra respiratoria), solución de continuidad en la piel (exudados de úlceras o heridas) o sonda vesical (orina). Existen estudios que sugieren diferencias importantes, en cuanto a un incremento en la detección de *S. aureus* en muestras nasales, cuando se utilizan torundas con una punta cubierta con fibras de nylon en combinación con un medio líquido de transporte (ESwab®).

El tracto gastrointestinal de los pacientes ingresados constituye el principal reservorio de enterobacterias multirresistentes y ERG en el ambiente hospitalario. Por este motivo, las muestras más habituales para el cultivo de vigilancia de ERG son las muestras rectales y las de heces. En determinadas situaciones clínicas, como ya se ha especificado en el caso de SARM, se pueden aceptar otras muestras como la orina y los exudados de herida. En circunstancias especiales en que se requiera el estudio de contaminación ambiental se analizarán muestras procedentes de las superficies próximas al paciente y del instrumental médico en contacto con él.

Dada la complejidad de la epidemiología de las infecciones por *A. baumannii* multirresistente, es adecuado considerar la toma de muestras tanto del paciente como de muestras ambientales. Las muestras de vigilancia que se han evaluado más frecuentemente incluyen esputo y exudado de traqueostomía, heridas, axila/ingle y frotis rectal. La efectividad del cribado se incrementará si se realiza un muestreo de distintas zonas anatómicas del cuerpo; un estudio español muestra una sensibilidad mayor del 90% cuando se combinan muestras de diferentes localizaciones (por ejemplo axilar-rectal, axilar-faríngeo o faríngeo-rectal). Las muestras ambientales a considerar pueden ser muy diversas; se ha descrito contaminación por *A. baumannii* en los equipos de respiración asistida, líquidos diversos, medicaciones multidosis, ropa de cama, transductores de presión no desechables y carros de curas, entre otros.

De igual forma, los cultivos de vigilancia para *P. aeruginosa* multirresistente pueden contemplar la toma de muestras de pacientes y muestras del medio ambiente y equipos de atención sanitaria. Son particularmente útiles las muestras respiratorias incluyendo esputo, frotis faríngeo, exudado de traqueostomía, etc. La colonización intestinal por *P. aeruginosa* multirresistente se detecta con cierta frecuencia en el frotis rectal.



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

Microorganismo	Muestra clínica						
	Rectal/Heces	Perineal	Faringe	Nasal	*Aspirado traqueal	*Heridas/ulceras	*Orina
<b>SARM</b>	-	+	+++	++++	+++	+++	++
<i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos	++++	++++	-	-	-	+++	++
Enterobacterias productoras de BLEE, AmpC-p y carbapenemasas	++++	++++	+	-	-	+	+++
<i>A. baumannii</i> multirresistente	++++	++++	++++	-	++++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> multirresistente	+++	+++	++++	-	++++	+++	+++

\*En la Tabla se mencionan determinadas muestras específicas que pueden ser útiles en circunstancias específicas como es el caso de pacientes con ventilación mecánica o traqueostomía (muestra respiratoria), solución de continuidad en la piel (exudados de úlceras o heridas) o sonda vesical (orina).

## 2.2. MÉTODOS TRADICIONALES BASADOS EN EL CULTIVO. MEDIOS CROMOGÉNICOS

La selección de medios de cultivo y condiciones de incubación para asegurar un rendimiento óptimo en la recuperación de bacterias multirresistentes está revisada previamente en el Procedimiento de Microbiología clínica de la SEIMC nº 26: "Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial".

La inoculación de cualquiera de las muestras descritas en la Tabla 1 en un medio de cultivo, con una orientación diagnóstica o con fines epidemiológicos, es la práctica habitual en los laboratorios de microbiología. Considerando el carácter de multirresistencia de la mayoría de las bacterias implicadas, es necesario emplear medios selectivos que eviten el crecimiento de la microbiota sensible. La elección de un medio u otro, así como de las concentraciones de antibiótico a usar, vendrá condicionado por la especie bacteriana y por la situación epidemiológica local del centro donde se va a realizar el cribado. Una vez aisladas las colonias en el medio selectivo, se procederá a la identificación del microorganismo a través de métodos bioquímicos, fenotípicos, moleculares o proteómicos. Sin embargo, en las muestras de vigilancia microbiológica, el uso de medios de cul-

tivo cromogénicos puede ser muy útil. Estos medios permiten la diferenciación o selección de muchos microorganismos usando un sustrato cromogénico que da como resultado un color característico de cada género/ especie bacteriana. La incorporación de diferentes antibióticos en el medio de cultivo lo hace más selectivo permitiendo sólo el crecimiento del microorganismo resistente. Básicamente, las bacterias a estudiar suelen caracterizarse por tener enzimas específicas que son responsables de la escisión del sustrato en el interior del cromógeno. El enzima bacteriano libera el cromóforo y pueden ser detectados visualmente mediante la observación de un cambio de color en el medio. Sus principales ventajas son: i) la reducción del tiempo en dar el resultado; ii) un solo medio sirve para la detección de más de un organismo; iii) la interpretación del resultado es visual sin necesidad de equipamiento complejo; iv) la eliminación en su mayoría de análisis bioquímicos complejos para la identificación del patógeno, aunque en muchos casos se requieren pruebas confirmatorias; y v) la capacidad de realizar pruebas adicionales sobre la propia colonia aislada en el medio.

Estos medios de cultivo cromogénicos son por tanto específicos de cada microorganismo y serán discutidos de manera individual en los apartados correspondientes de este documento.



## 2.3. MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares, en sus distintas vertientes, permiten la identificación rápida del microorganismo resistente, a través de la detección del gen/es de resistencia al antibiótico implicado. Esto tiene una importancia capital en algunas situaciones de control epidemiológico de la infección, especialmente en el caso de brotes nosocomiales. Su principal ventaja respecto a los métodos basados en cultivo es la posibilidad de dar un resultado en la misma jornada de trabajo, habitualmente entre 1-3 horas tras la recepción de la muestra. Es importante resaltar su mayor sensibilidad respecto a los métodos basados en el cultivo y enfatizar la posibilidad de aplicación directa sobre muestra clínica, lo cual es tremendamente importante para tomar decisiones de control de la infección y epidemiológicas. Como inconvenientes, cabe resaltar que sólo identifica aquellos genes de resistencia diseñados en el ensayo, y que muchas veces requiere de un cultivo posterior para la realización de estudios de sensibilidad antibiótica o de tipificación molecular. Los más utilizados en la práctica clínica y con mejor coste-efectividad son aquellos basados en PCRs a tiempo real con sondas Taqman, aunque hay otras modalidades de mayor o diferente complejidad.

El mayor coste económico de las pruebas moleculares respecto a los métodos basados en el cultivo es un aspecto importante a valorar a la hora de decidir su posible introducción en la práctica clínica. Un argumento que se utiliza para sustituir el método de cultivo por los métodos moleculares es que el aumento del coste se puede justificar por la mejoría en los cuidados de los pacientes. Estos se traducen en una disminución en la transmisión y en el número de infecciones por bacterias multirresistentes y, consecuentemente, en una reducción en la morbi-mortalidad y en el coste de los cuidados sanitarios. Esta argumentación no ha sido uniformemente demostrada en los estudios de vigilancia donde se han aplicado las técnicas moleculares. La generalización de estas pruebas moleculares para la vigilancia de bacterias multirresistentes es un tema a debate, pero dependiendo de los programas de vigilancia y control de la infección de los diferentes hospitales pueden existir pacientes y determinadas circunstancias epidemiológicas en los que las pruebas moleculares pueden ser muy útiles y coste-eficaces.

En cada apartado de este documento y para cada mecanismo de resistencia en cada patógeno concreto, se discutirá la cartera de servicios o posibilidades dispo-

nibles para realizar un diagnóstico molecular con fines de control epidemiológico.

## 2.4. MÉTODOS PROTEÓMICOS

La identificación microbiana basada en métodos proteómicos a través de MALDI-TOF ha revolucionado la práctica clínica diaria en los laboratorios de Microbiología. Algunos estudios recientes están además demostrando la posibilidad de detectar mecanismos de resistencia a antimicrobianos, fundamentalmente enzimas BLEE y carbapenemasas, ya sea en aislados clínicos bacterianos, en muestras clínicas con alta carga bacteriana o en los frascos de hemocultivos positivos. Estos últimos aún no están totalmente implementados en los laboratorios de Microbiología y requieren mayor validación, pero aún así se postulan como un método rápido muy prometedor para detectar microorganismos con mecanismos de resistencia a antimicrobianos específicos.

No existen recomendaciones específicas sobre el método preferido para detectar el estado de portador de bacterias multirresistentes. La elección del método de cribado dependerá en gran medida de la política de control de la infección que se lleve a cabo en el hospital (vigilancia activa o no, universal o en determinados servicios clínicos o pacientes, si se realiza o no aislamiento preventivo, etc.) así como de la epidemiología y prevalencia local del patógeno/resistencia a vigilar. Otros factores a considerar son el tipo de institución u hospital, infraestructura del laboratorio, experiencia del personal, y recursos disponibles en el laboratorio. En cualquier caso el cribado debería incluir al menos los pacientes con alto riesgo de estar colonizados por bacterias multirresistentes como son aquellos ingresados en UCIs, trasplantados, inmunodeprimidos o procedentes de hospitales o países con una alta prevalencia de este tipo de cepas. La detección de un paciente infectado y/o colonizado por una de estas bacterias obliga a incluir en el estudio de vigilancia a los otros pacientes que hayan mantenido contacto epidemiológico con él (misma habitación, mismo servicio, mismas pruebas diagnóstico/terapéuticas...). Por otra parte, un tema a debate en la literatura científica reciente es qué estrategia es mejor para reducir las infecciones por determinadas bacterias multirresistentes como por ejemplo el SARM: descolonización universal (baños de clorhexidina y mupirocina nasal) en todos los pacientes de determinados servicios clínicos como UCIs *versus* vigilancia activa y descolonización selectiva de los pacientes colonizados.

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

#### 3.1. IMPACTO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

*S. aureus* es un microorganismo que habitualmente coloniza a los seres humanos. Sin embargo, en determinadas circunstancias puede comportarse como un patógeno oportunista y ser la causa de una gran diversidad de infecciones. La primera cepa de SARM se describió en 1961, pocos meses después del inicio de la utilización clínica de la cloxacilina. En las últimas décadas, la prevalencia de SARM ha aumentado de forma importante, convirtiéndose en un patógeno muy relevante en la infección hospitalaria. Los datos del *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) de 2013 muestran una prevalencia de SARM del 22,6% en aislamientos de sangre en España y del 18% en el total de los países europeos participantes. En España, existen variaciones importantes en su prevalencia dependiendo del área geográfica y del tipo de hospital.

La resistencia a meticilina/oxacilina se puede detectar fenotípicamente mediante determinación de la CMI, pruebas de difusión disco-placa, o mediante la detección de la proteína PBP2a; y genotípicamente mediante PCR. La cefoxitina es un marcador muy sensible y específico para la detección de resistencia a la meticilina en *S. aureus*, y es el antibiótico de elección para el método de difusión con disco. El principal mecanismo de resistencia es la producción de una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), codificada por el gen *mecA*, que presenta baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, a excepción de una nueva clase de cefalosporinas como es la ceftarolina o el ceftobiprole. En el año 2011 se describió un gen homólogo de *mecA* denominado *mecC*. Se han aislado cepas de SARM con *mecC* en humanos y en una gran variedad de animales. Los estudios retrospectivos han demostrado que estas cepas de SARM ya estaban presentes en el año 1975 en Dinamarca, y en otros países como España en el año 2008. Las cepas con *mecC* no se detectan mediante las pruebas de laboratorio basadas en la amplificación del gen *mecA* o en la aglutinación de la proteína PBP2a.

Además, la detección del gen *mec* permite la diferenciación de otras cepas de *S. aureus*, muy poco frecuentes, con bajo nivel de resistencia a la meticilina debido tanto a alteraciones de las PBPs (denominadas “*moderately resistant S. aureus*” MODSA) como a hiperproducción de beta-lactamasa (denominadas

“*bordeline oxacillin-resistant S. aureus*” BORSA). El protocolo que se desarrolla a continuación se refiere a *S. aureus* que contiene el gen *mec*.

#### 3.2. MÉTODOS BASADOS EN EL CULTIVO

##### 3.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

La detección de colonización por SARM basada en el cultivo es la técnica tradicionalmente usada en los laboratorios de Microbiología. La utilización de un medio convencional, no selectivo, como agar sangre no sirve para la detección de SARM, ya que permite el crecimiento de otras especies bacterianas y de poblaciones de *S. aureus* con diferentes sensibilidades a los antibióticos. Por ello, se recomienda la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales que permiten obtener resultados de forma rápida (24-48 horas).

Existen múltiples medios de cultivo selectivos y diferenciales que pueden ser utilizados para la detección de SARM. Los más utilizados son el agar manitol-sal (AMS o medio de Chapman) y los de agar cromogénico. El medio AMS puede prepararse fácilmente en el laboratorio y suplementarse con cefoxitina (4 mg/L). La combinación de una placa de AMS y otra de AMS-cefoxitina permite la detección de SARM, y eventualmente, la colonización por cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM). Un estudio que evaluaba el medio de AMS-cefoxitina con una gran variedad de cepas de SARM y SASM a diferentes concentraciones bacterianas, mostró una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100% después de 48 horas de incubación. Es importante tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos positivos con algunas especies de estafilococo coagulasa negativa, enterococos, e incluso con alguna bacteria gramnegativa. También pueden darse resultados falsos negativos con cepas de *S. aureus* manitol-negativo y con variantes de *S. aureus* de colonia pequeña.

Actualmente existen disponibles diferentes medios cromogénicos comerciales. Estos medios incorporan cromógenos para diferenciar *S. aureus* de otros patógenos y antibióticos para el crecimiento selectivo de SARM. Los estudios que han evaluado la utilidad de los medios cromogénicos han mostrado resultados variables. En general, a las 24 horas de incubación la especificidad es alta para todos los medios de cultivo, pero la sensibilidad varía entre los diferentes medios y los diferentes estudios. La prolongación del tiempo de incubación a 48 horas aumenta la sensibilidad, pero en general reduce la especificidad. Un estudio reciente

que evaluaba cinco medios cromogénicos, [*Brilliance* MRSA agar (Oxoid), ChromID (bioMérieux), MRSASelect (Bio-Rad), CHROMagar (CHROMagar Microbiology), y BBL-CHROMagar (BD Diagnostics)], mostró, tras 24 horas de incubación, una sensibilidad del 90% para el medio *Brilliance* MRSA agar y del 81%-83% para el resto de medios, y una especificidad del 87% para el medio *Brilliance* MRSA agar y del 97 al 99% para el resto de medios cromogénicos. La evaluación de los diferentes medios de cultivo a las 48 horas mostraba una sensibilidad entre el 93 y el 96%, y una especificidad entre el 69 y el 98%. Otro estudio que evaluaba tres medios de cultivo [BBL CHROMagar MRSA II (BD Diagnostic), MRSASelect (Bio-Rad), y Spectra MRSA (Remel)] para la detección de SARM en muestras nasales a las 24 horas, y los comparaba con el cultivo en agar sangre (identificación y detección de resistencia a cefoxitina mediante métodos habituales), mostraba una sensibilidad del 84-88% y una especificidad del 92-98%. Los estudios publicados muestran que existen resultados falsos positivos debidos a la interpretación del color de las colonias en alguno de estos medios cromogénicos. Los resultados falsos negativos se producen, en general, por una escasa carga bacteriana en la muestra clínica. También es importante tener en cuenta las variantes de colonia pequeña de *S. aureus*. En base a los estudios publicados, no existen recomendaciones absolutas a favor o en contra de un determinado medio cromogénico.

Algunos estudios han mostrado que la preincubación de las muestras en un medio líquido de enriquecimiento selectivo, como por ejemplo caldo Mueller-Hinton o tripticasa-soja suplementados con cloruro sódico al 6,5%, aumenta significativamente la sensibilidad de los medios cromogénicos para la detección de SARM. Una posible limitación de esta estrategia sería el retraso en un día de la obtención de resultados.

### 3.2.2 Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

La ventaja de utilizar medios de cultivo selectivos y diferenciales es la posibilidad de emitir resultados positivos (detección de SARM) a las 24 horas de incubación. Sin embargo, el tiempo recomendable de incubación de los diferentes medios de cultivo para emitir un informe definitivo en que no se detecta SARM es de 48 horas.

Debido a los posibles falsos positivos en la identificación, parece recomendable confirmarla mediante un método alternativo rápido. En estos casos, se recomienda la realización de una prueba de coagulasa,

aglutinación con látex o la identificación mediante MALDI-TOF.

Respecto a la confirmación de la resistencia a la metilina en *S. aureus* mediante el método de difusión en placa, se recomienda usar un disco de cefoxitina (30 µg) y realizar la lectura a las 24 horas; se considera resistencia si el halo de inhibición es < 22 mm [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2015]. La cefoxitina es un potente inductor de la producción de PBP2a, ello hace que sea más precoz que la propia oxacilina en la detección de resistencias y que la lectura del halo de inhibición sea más fácil. Además, es de gran utilidad en la detección de cepas de *S. aureus* con expresión heterogénea de la resistencia a metilina. No se recomienda realizar el método de difusión con el disco de oxacilina.

Muchos laboratorios de microbiología utilizan sistemas automatizados o comerciales para el estudio de la sensibilidad a antibióticos en *S. aureus*. Estos sistemas han incluido cefoxitina y oxacilina para la detección de SARM. Los puntos de corte establecidos para considerar resistencia son CMI >4 mg/L para cefoxitina, y CMI >2 mg/L para oxacilina. Las cepas de *S. aureus* con CMI de oxacilina >2 mg/L y de cefoxitina de ≤4 mg/L son muy poco frecuentes. Asimismo, un estudio reciente con el sistema Vitek 2 analizó 896 aislamientos de *S. aureus* (SARM-*mecA*, SARM-*mecC*, y SARM-*mecC*-negativos) y encontró que el perfil de resistencia "oxacilina-S y cefoxitina-R" era sugerente de SARM *mecC*-positivo. En un principio, la interpretación de los resultados discrepantes entre la cefoxitina y oxacilina debería resolverse a favor del resultado resistente (EUCAST 2015). En estos casos, la recomendación es estudiar fenotípicamente y genotípicamente (*mecA* o *mecC*) las cepas de *S. aureus*.

La resistencia a metilina también se puede confirmar mediante la aglutinación de partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales de la proteína PBP2a. Es una prueba muy sensible y específica. Los aislamientos que producen pequeñas cantidades de la proteína PBP2a pueden dar resultados débiles o enlentecer la reacción de aglutinación. Es importante tener en cuenta que los ensayos basados en la detección de PBP2a (*mecA*) darán lugar a resultados negativos cuando se analicen cepas de SARM *mecC*-positivas.

Una información complementaria, que puede ser útil en los programas de vigilancia de SARM, es la monitorización de la resistencia a mupirocina. Este antibiótico se utiliza tópicamente para la descolonización nasal.

Diferentes estudios han demostrado que su uso masivo incrementa la resistencia de alto nivel (>256 mg/L), que es la que tiene implicaciones clínicas.

### 3.2.3. Información de los resultados

La información de los resultados dependerá de las muestras y de los medios de cultivo utilizados. Es importante tener en cuenta que este protocolo está orientado a la detección de SARM en muestras clínicas de vigilancia. Una información rápida y precisa tendrá impacto en los programas de control de la infección hospitalaria.

- A. Si se utiliza un medio cromogénico:
1. Si a las 48 horas no hay colonias con la coloración característica definida por el fabricante para SARM, se informará: “No se aísla *S. aureus* resistente a la meticilina” (SARM negativo).
  2. En caso de aislarse un microorganismo con la coloración característica definida por el fabricante, se informará: “Se aísla *S. aureus* resistente a la meticilina” (SARM positivo).
- B. Si se utiliza agar manitol-sal con y sin cefoxitina:
1. Si a las 48 horas no hay colonias manitol positivas, ni compatibles con *S. aureus*, se informará: “No se aísla *S. aureus* resistente a la meticilina” (SARM negativo).
  2. Si se aísla un microorganismo manitol positivo en ambos medios, y se confirma la identificación como *S. aureus*, se informará: “Se aísla *S. aureus* resistente a la meticilina” (SARM positivo).

## 3.3. MÉTODOS MOLECULARES

La necesidad de obtener un resultado rápido en los estudios de vigilancia de SARM ha favorecido el desarrollo de pruebas moleculares para su detección. Estos métodos rápidos incluyen principalmente la amplificación por PCR a tiempo real y permiten la obtención de resultados entre las dos y seis horas.

Actualmente, los métodos basados en la reacción de PCR para la detección del gen *mec* son considerados de referencia para la detección de SARM. La detección del gen *mec* permite la diferenciación de otras cepas de *S. aureus*, muy poco frecuentes, MODSA y BORSA. Existen diferentes métodos comerciales que permiten la detección del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus*. Las cepas de SARM con un resultado

de PCR *mecA* negativo deberían ser estudiadas por la posible presencia del gen *mecC*. Los laboratorios de Microbiología deberían considerar esta posibilidad e incorporar estrategias moleculares que detecten *mecA* y *mecC*. Recientemente, se han desarrollado métodos comerciales que incluyen la detección del gen *mecC*.

### 3.3.1 Tipos de métodos moleculares y selección

Los métodos comerciales que se han aprobado para uso diagnóstico se han validado principalmente en muestras nasales. Estos estudios de validación presentan una gran variabilidad metodológica, algunos métodos comerciales han sido extensamente evaluados y de otros existen muy pocas referencias. Además, una de las principales limitaciones a la hora de comparar los diferentes métodos comerciales es que no existe una prueba de referencia (*gold standard*) con la que comparar. En general, estos estudios muestran una sensibilidad y especificidad que oscilan entre 82-100% y 64-99%, respectivamente. La Tabla 2 recopila información seleccionada sobre diferentes métodos comerciales utilizados en la práctica clínica.

### 3.3.2 Criterios para la interpretación e información de los resultados

Un aspecto importante en este tipo de métodos es que permitan distinguir entre colonización por SARM y una colonización mixta por SASM y por estafilococo coagulasa negativa resistente a la meticilina. Algunas pruebas moleculares combinan la detección de un gen específico de *S. aureus* y del gen *mecA*. Otros métodos tienen como diana la región de unión SCC*mec-orfX*. Aunque esta región se ha considerado específica de SARM, presenta cierta variabilidad, lo que puede generar una disminución en la sensibilidad de determinados métodos. Por otra parte, algunas cepas de SASM pueden contener fragmentos de la estructura del SSC*mec* remanentes (gen *mec*-negativo) y dar resultados falsos positivos. Además, la mayoría de los ensayos moleculares comerciales no detectan las cepas de SARM portadoras del gen *mecC*.

Otras consideraciones importantes sobre los métodos moleculares tienen que ver con las muestras, trabajo técnico, tiempo en la obtención de resultados y prevalencia de SARM en la población. Respecto a las muestras, aunque muchas de estas técnicas han sido aprobadas para muestras nasales, se han utilizado también en otras muestras clínicas (faringeas, perineales/rectales) con buenos resultados. Incluso algún estudio sugiere un incremento en la sensibilidad cuando se realiza la prueba molecular en una mezcla



**Tabla 2. Características de los métodos moleculares comerciales para detección de SARM en muestras nasales.**

Nombre comercial	Diana/s	Tiempo de procesamiento (≈)	Sensibilidad	Especificidad	Observaciones
BD GeneOhm MRSA (BD Diagnostics) BD MAX MRSA Assay* BD MAX MRSA XT Assay**	SCC <i>mec-orfX</i>	2,5 horas	81-100% 87,5%	89-97% 97,1%	No detecta <i>mecC</i>
Xpert MRSA assay (Cepheid) Xpert MRSA/SA Nasal assay*** Xpert MRSA Gen 3**	SCC <i>mec-orfX</i> <i>spa</i> , <i>mecA</i> , SCC <i>mec-orfX</i>	1,5 horas	86-98%	90-95%	No detecta <i>mecC</i> Las muestras se procesan individualmente
Genotype MRSA Direct (Hain)	SCC <i>mec-orfX</i>	4 horas	70-94,6%	96-98%	No detecta <i>mecC</i>
Hyplex StaphyloResist (BioTrading)	Gen específico de <i>S. aureus</i> y <i>mecA</i>	4,5-6 horas	92-98%	84-96%	No detecta <i>mecC</i>
LC MRSA advanced Test (Roche)	SCC <i>mec-orfX</i>	4 horas	83,3-98,3%	90,8-99%	No detecta <i>mecC</i>

\* Ensayo automatizado en el sistema BD MAX (BD Diagnostics). Lepointeur M, et al J Clin Microbiol 2015.  
 \*\* Detecta los genes *mecA* y *mecC*  
 \*\*\* Detecta SARM y SASM

de muestras clínicas de diversas localizaciones. Respecto a los aspectos técnicos, aunque existen diferencias importantes de procedimiento entre los métodos comerciales, en general la realización de las técnicas es cada vez más sencilla. Algunos de estos métodos únicamente requieren la dispensación de la muestra, e incluso están totalmente automatizados. Aunque la mayoría permiten obtener resultados en horas, existe cierta variabilidad entre ellos y no siempre la ventaja de la rapidez se sincroniza con los horarios de trabajo de los laboratorios. A la hora de la elección de un método molecular también es importante conocer la prevalencia de SARM en la población donde se va a implementar esta prueba. Estos métodos tienen en general una alta sensibilidad y un alto valor predictivo negativo. En lugares con baja prevalencia los resultados negativos son útiles para descartar SARM. Los resultados positivos requerirían confirmación mediante cultivo. En lugares con alta prevalencia de colonización por SARM, estos métodos se podrían utilizar como prueba definitiva para identificar portadores de SARM.

### 3.3.3 Información de los resultados

A la hora de informar los resultados es importante tener en cuenta que los métodos moleculares detectan

la presencia o ausencia de ADN de SARM. En el contexto de un estudio de colonización nasal en pacientes que no han recibido tratamiento de descolonización, un resultado positivo equivale a “SARM positivo” (se detecta SARM), y un resultado negativo a “SARM negativo” (no se detecta SARM). Un resultado positivo no necesariamente indica la presencia de bacterias viables. Esto se puede observar en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico para descolonización nasal, y este resultado no indica un fracaso en el tratamiento. Por otra parte, un resultado negativo de una prueba molecular en una muestra nasal no excluye que el paciente pueda estar colonizado en otras localizaciones anatómicas.

En general, la información de resultados con las pruebas moleculares es la siguiente:

1. “SARM positivo: se detecta ADN de SARM”. Se interpreta como colonización nasal por SARM.
2. “SARM negativo: no se detecta ADN de SARM”. Se descarta la colonización nasal por SARM.
3. “Resultado indeterminado o no válido”. Esto puede ocurrir por algún fallo en el procedimiento técnico, y habitualmente el programa informático de

interpretación de los resultados indica el tipo de error. Se requiere nueva muestra.

## 4. *Enterococcus* spp. RESISTENTE A LOS GLUCOPÉPTIDOS (ERG)

### 4.1. IMPACTO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

Los enterococos forman parte de la microbiota de humanos y animales. Aunque se han descrito más de 20 especies, *Enterococcus faecalis* (~80-90%) y *Enterococcus faecium* (~5-10%) son las especies que causan la mayoría de las infecciones en humanos. Estos microorganismos son responsables de aproximadamente el 10% de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria, principalmente infecciones de la herida quirúrgica (14,5%), infecciones del tracto urinario (12,5%), y bacteriemias (8,2%). *E. faecium* y *E. faecalis* son capaces de sobrevivir en el ambiente en condiciones adversas, lo que facilita su diseminación y transmisión entre pacientes. Entre las razones por las que estos microorganismos sobreviven en el ambiente hospitalario se incluyen su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos (incluidas penicilinas resistentes a penicilinasas, cefalosporinas y aminoglucósidos en concentraciones bajas), y su capacidad de desarrollar resistencias a otros antibióticos, bien por adquisición de genes localizados en plásmidos o transposones (como por ejemplo la resistencia a glucopéptidos) o por mutaciones cromosómicas (como por ejemplo la resistencia a fluoroquinolonas). La emergencia de ERG como problema terapéutico fue inicialmente documentada en la década de 1980 en Inglaterra, Francia y Estados Unidos (EE.UU.). Desde entonces, el aislamiento de ERG ha sido una constante en diversas zonas geográficas del mundo. La epidemiología de ERG es diferente en EE.UU. y en Europa. En EE.UU. se produjo un rápido aumento de brotes nosocomiales que condujo a una situación endémica en ciertos hospitales. En contraste, en Europa ERG se aisló inicialmente de fuentes comunitarias (personas sanas, y animales). Este reservorio comunitario se relacionó con el amplio uso de avoparcina, un glucopéptido utilizado como promotor de crecimiento de animales de granja hasta su prohibición en 1997. La resistencia a los glucopéptidos se asocia mayoritariamente a cepas de *E. faecium* resistentes a la ampicilina. Los datos del EARS-Net en 2013 mostraban importantes diferencias en la prevalencia de ERG en los distintos países europeos. Según esos datos, la prevalencia media de resistencia a vancomicina en *E. faecium* de sangre fue del 8,9%, pero cinco países mostraban porcentajes superiores

al 20% (Grecia, Portugal, Chipre, Reino Unido e Irlanda). En España la prevalencia de *E. faecium* resistente a vancomicina según los datos de EARS-Net fue del 0,9% en 2013.

La resistencia adquirida a glucopéptidos en enterococo está mediada por 9 operones diferentes denominados *van* (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*). Dos de estos (*vanA* y *vanB*), los más frecuentes y con mayor relevancia clínica, han sido descritos principalmente en *E. faecalis* y *E. faecium*. El gen *vanA* confiere resistencia inducible de alto nivel a vancomicina y teicoplanina, y se adquiere a través del transposón Tn1546 o de transposones relacionados con la familia Tn3. El gen *vanB* confiere resistencia inducible de alto o moderado nivel a vancomicina y permanece sensible a teicoplanina, y con frecuencia se encuentra presente en el transposón Tn5382 junto con la resistencia a ampicilina.

Aunque el porcentaje de infecciones por ERG en nuestro medio es muy bajo, con cierta frecuencia se describe la aparición de brotes hospitalarios. Entre los factores de riesgo relacionados con la colonización/infección por ERG se han descrito el tratamiento antibiótico previo (vancomicina y cefalosporinas), los ingresos prolongados, la patología de base, la alta tasa de colonización por ERG en el hospital, la exposición a superficies o a equipos contaminados y la estancia previa en residencias de larga estancia o centros sociosanitarios. Las especies de *E. faecium* o *E. faecalis* con resistencia a vancomicina (CMI >4 mg/L) son las de mayor interés epidemiológico y requieren vigilancia microbiológica.

### 4.2. MÉTODOS BASADOS EN EL CULTIVO

#### 4.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

Los medios más frecuentemente utilizados son los selectivos y diferenciales que permiten la detección rápida de ERG a partir de muestras altamente contaminadas. Estos medios contienen vancomicina como agente selectivo, habitualmente a concentraciones de 6-8 mg/L, y otros componentes como esculina, sales biliares, y azida sódica (agar BEAV) que facilitan el crecimiento e identificación de enterococos.

Existen diferentes tipos de medios comercializados, líquidos y sólidos, que se pueden utilizar en el cribado de ERV. Entre estos están Enterococcosel agar (BEAV) (BD Diagnostics), y recientemente se han introducido varios medios cromogénicos como son: ChromID

VRE (bioMérieux), CHROMagar VRE (BD Diagnostics), VRESelect (Bio-Rad), y Spectra VRE (Remel). Estos medios incorporan cromógenos que facilitan la distinción de *E. faecium* y *E. faecalis*. Aunque estos medios cromogénicos no han sido extensivamente evaluados, existen algunos estudios que muestran sensibilidades que oscilan entre el 92% y 95%, y especificidades entre el 96% y 99%. En general, el incremento del tiempo de incubación a 48 horas disminuye ligeramente la especificidad. Entre los microorganismos que dan resultados falsos positivos se encuentran otras especies de enterococos, *Streptococcus* spp., algunos bacilos gramnegativos, y *Candida* spp. Por otra parte, es importante tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos. La utilización de un medio de enriquecimiento previo a la inoculación en el medio cromogénico puede aumentar la sensibilidad. Se ha descrito que la sensibilidad disminuye cuando la densidad de ERG en heces está disminuida, y cuando la CMI de vancomicina es <16 mg/L.

En base a los estudios publicados, no existen recomendaciones absolutas a favor o en contra de un determinado medio cromogénico.

#### 4.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

En el medio de cultivo selectivo y diferencial agar BEAV, la aparición de pequeñas colonias translúcidas acompañadas de una pigmentación negra o marrón a su alrededor hará sospechar de la presencia de ERG. Si se ha utilizado un medio cromogénico, la interpretación del cultivo dependerá del color de la colonia y se realizará de acuerdo con las características especificadas por el fabricante. En general, el tiempo de incubación para la interpretación de los resultados es de 24-48 horas.

Dependiendo del medio utilizado puede ser necesario realizar la tinción de Gram y determinadas pruebas fenotípicas [pirrolidonil beta-naftilamida (PYR), leucino-aminopeptidasa (LAP), movilidad, pigmentación, fermentación de azúcares] para confirmar la identificación. La mayor disponibilidad de instrumentos de espectrometría de masas (MALDI-TOF) en los laboratorios de Microbiología facilita la utilización de este método para confirmar la identificación de las diferentes especies de enterococo.

#### 4.2.3. Información de los resultados

Si el cultivo es positivo para ERG se informará como “Se aísla *E. faecium* / *E. faecalis* resistente a vancomicina” (indicar la especie identificada).

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

El aislamiento de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, con bajo nivel de resistencia intrínseca a vancomicina (*vanC*), no debe informarse cuando se aíslan en cultivos de vigilancia, debido a que se desconoce su verdadero significado epidemiológico y su trascendencia clínica.

### 4.3. MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares rápidos para la detección de ERG incluyen principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Estas técnicas se realizan en torundas rectales/perianales y permiten la obtención de resultados en unas pocas horas (1-4 horas).

#### 4.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección

Los métodos comerciales que se han desarrollado [BD GeneOhm VanR (BD Diagnostics, aprobado por el FDA), LC vanA/vanB detection assay (Roche Diagnostics, uso en investigación), y Xpert vanA/vanB (Cepheid, uso en investigación)] tienen como dianas moleculares los genes *vanA* y *vanB*. Es importante tener en cuenta que estos ensayos moleculares detectan genes *van* y no ERG. Existen pocos estudios que hayan evaluado la utilidad de estas pruebas moleculares en la detección de ERG, pero en general muestran una limitada sensibilidad y sobre todo una baja especificidad. Esta baja especificidad se debe a la presencia del gen *vanB* en otras especies bacterianas diferentes a enterococo que puede ser detectado por estos métodos, lo cual resulta en una sobreestimación de la tasa de ERG. Cuando estos ensayos se utilizan para la detección del gen *vanA* la sensibilidad y especificidad son más elevadas. La realización de estas pruebas en muestra directa para detección rápida de genes *vanA* y *vanB* no excluye la realización del cultivo de vigilancia de ERG. Además, no existen estudios que hayan evaluado el impacto de estas pruebas moleculares en la vigilancia de ERG.

#### 4.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados

Los resultados de los ensayos moleculares hay que interpretarlos con cierta cautela. Un estudio reciente que evaluaba las pruebas comerciales GeneOhm y Xpert mostraba para la detección de *vanA* una sensibilidad del 43,5% y 73,9%, respectivamente, y una especi-



ficidad del 100% y 92,6%, respectivamente. Para la detección del gen *vanB* la sensibilidad era del 100% y 87,5%, y la especificidad del 20,6% y 14,7%. Estos resultados no confirman ni descartan de una forma segura la colonización por ERG.

En caso de realizar alguno de estos ensayos, la información de resultados es la siguiente:

1. “Se detecta el gen *vanA*, *vanB*, o ambos. Se requiere cultivo para confirmar los resultados.”
2. “No se detectan los genes *vanA* / *vanB*. Se requiere cultivo para confirmar los resultados.”
3. “Resultado indeterminado o no válido.” Esto puede ocurrir por algún fallo en el procedimiento técnico, y habitualmente el programa informático de interpretación de los resultados indica el tipo de error. Se requiere nueva muestra.

## 5. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE), AmpC PLASMÍDICAS (AmpC-p) Y CARBAPENEMASAS (EPC).

### 5.1. IMPACTO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

Las enterobacterias son unos de los principales agentes causales de infección, tanto nosocomial como adquirida en la comunidad, en humanos. En conjunto representan el grupo de bacterias patógenas aislado con más frecuencia en infecciones de orina y bacteriemias; además incluyen algunas de las especies comensales habituales en humanos.

La aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de amplio espectro en la última década, principalmente debida a las BLEE, se ha convertido en una de las principales amenazas para el tratamiento antibiótico de las infecciones producidas por estas bacterias. Los primeros casos de BLEE en enterobacterias descritos en *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. productores de enzimas derivadas de las beta-lactamasas TEM y SHV, se limitaban casi exclusivamente a centros hospitalarios donde ocasionalmente generaban importantes brotes. A finales del siglo XX, importantes cambios epidemiológicos facilitaron la amplia diseminación de las BLEE: 1) *E. coli* se convirtió en la principal especie portadora de BLEE lo que generó el aumento de las infecciones adquiridas en la comunidad, principalmente infecciones del tracto urinario, producidas por estas cepas; y 2) la aparición de una nueva familia de BLEE, las CTX-M, muy

diferente a las previas derivadas de TEM o SHV y cuyo origen se atribuye a genes cromosómicos propios de especies ambientales del género *Kluyvera*.

En España, las BLEE, sobre todo del tipo CTX-M-15 y SHV-12, se han extendido rápidamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* alcanzando prevalencias globales de alrededor del 15% en ambas especies. Según datos de la Red de Vigilancia Europea de la Resistencia a Antibióticos, EARS-Net, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de sangre de *Escherichia coli* aumentó en España del 0,5% en 2001 al 13,9% en 2013 ([http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx)).

Aunque con una prevalencia inferior a las BLEE, las AmpC-p están emergiendo como una amenaza adicional a la actividad de las cefalosporinas de amplio espectro en muchas regiones. Las beta-lactamasas cromosómicas inducibles de tipo AmpC están presentes en muchas enterobacterias como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* o *Serratia marcescens*, pero la posibilidad de diseminación es mayor cuando los genes que las codifican están movilizados por plásmidos. Las principales tipos de AmpC-p son CIT y DHA que afectan a algunas de las familias de enterobacterias más comunes como son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Especialmente *K. pneumoniae* productora de AmpC-p se ha asociado a brotes nosocomiales en pacientes con factores de riesgo en los que se ha descrito una alta morbi-mortalidad.

La frecuente asociación de producción de BLEE, y/o AmpC-p, con resistencia a otros antibióticos como fluoroquinolonas y aminoglucósidos ha reducido el abanico terapéutico convirtiendo a los antibióticos carbapenémicos en el tratamiento de primera opción en las infecciones graves por estas bacterias. El aumento del consumo de antibióticos carbapenémicos ha llevado en pocos años a la aparición de cepas resistentes frente a ellos y, como consecuencia, resistentes a la práctica totalidad de los antibióticos disponibles. En la actualidad, la mayor amenaza en el campo de la resistencia a antibióticos en enterobacterias se debe a la rápida diseminación de cepas con MDR y XDR debida a la producción de carbapenemasas transmitidas por plásmidos.

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar la gran mayoría de los antibióticos carbapenémicos y que se agrupan, en su mayoría, en tres clases según la clasificación molecular de Ambler: 1) Clase

A, principalmente enzimas del tipo KPC; 2) Clase B o metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) dependientes de zinc, principalmente enzimas del tipo VIM, IMP y NDM; 3) Clase D, principalmente OXA-48.

Un estudio multicéntrico realizado en 2013 (proyecto GEIH-GEMARA-REIPI) mostró que OXA-48 (71,5%) y VIM-1 (25,3%) fueron las carbapenemasas más frecuentes en enterobacterias en España, y *K. pneumoniae* (74,4%), *Enterobacter cloacae* (10,3%), y *E. coli* (8,4%) las especies más afectadas. En este mismo trabajo se observó una prevalencia del 1,7% de producción de carbapenemasas en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*, lo que mostraba una importante evolución desde el 0,2% detectado en 2009. Además se detectó una amplia diseminación de algunos clones exitosos (también denominados de alto riesgo) de *K. pneumoniae* como ST11/OXA-48, ST15/OXA-48, ST405/OXA-48 y ST11/VIM-1.

Aunque con una prevalencia menor, otras carbapenemasas como las KPC y las NDM también están aumentando en España generando importantes brotes intra- e interhospitalarios.

En la actualidad, mediados de 2015, se han detectado brotes de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa en la mayoría de las regiones españolas, algunos de ellos epidemiológicamente relacionados a pesar de encontrarse en diferentes provincias incluso diferentes comunidades autónomas. Este escenario sugiere una diseminación interregional, situación epidemiológica rápidamente evolutiva desde previas consideraciones de “brotes hospitalarios independientes” y de “diseminación regional” establecidas en 2010 y 2013, respectivamente.

Las alternativas terapéuticas en estos casos son muy escasas y casi nunca óptimas e incluyen tratamiento combinados con colistina, tigeciclina, fosfomicina, amikacina o los mismos antibióticos carbapenémicos siempre que presenten CMIs inferiores o incluso iguales a 8 mg/L. Diversos estudios han comunicado una alta morbi-mortalidad atribuida a las enterobacterias productoras de carbapenemasas, aunque difícil de establecer debido a que en su gran mayoría producen infecciones en pacientes con importante patología de base.

La importancia de los portadores sanos en la persistencia y diseminación de brotes o endemias por enterobacterias productoras de BLEE/AmpC-p y carbapenemasas está bien documentada. Numerosos estudios han demostrado la persistencia de esta co-

lonización incluso en un ambiente extrahospitalario y sin consumo de antibióticos. Por otra parte, algunos autores sugieren la posibilidad de que el estado de portador de enterobacterias con BLEE del tipo CTX-M esté evolucionando hacia una pandemia.

Mientras que la vigilancia de la colonización por enterobacterias productoras de BLEE y carbapenemasas debería abarcar cualquier especie de enterobacteria, la vigilancia de la producción de AmpC-p debería restringirse a aquellas enterobacterias que han demostrado un importante potencial epidémico en la diseminación de AmpC-p y que no poseen beta-lactamasas cromosómicas del tipo AmpC. Por tanto, en general se recomienda la vigilancia de AmpC-p en *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, aunque siempre adaptada a la situación epidemiológica de cada centro.

## 5.2. MÉTODOS BASADOS EN CULTIVO

### 5.2.1. BLEE y AmpC plasmídicas

#### 5.2.1.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

Como norma general es necesario emplear medios selectivos que permitan recuperar enterobacterias resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y que eviten el crecimiento de la microbiota comensal sensible. Diferentes medios como el agar MacConkey o agar de Driglasky suplementado con cefotaxima o ceftazidima han demostrado su utilidad. El uso de ceftazidima en vez de cefotaxima como antibiótico selector puede disminuir la sensibilidad del método debido a la alta prevalencia en algunas zonas de BLEEs del tipo CTX-M con CMIs bajas a ceftazidima. Cabe destacar que con estos medios se detectan bacterias resistentes al antibiótico selector, tanto productores de BLEEs como de AmpC-p e incluso de carbapenemasas, que posteriormente se deben confirmar tanto en la especie como en el mecanismo. Además de las enterobacterias productoras de AmpC-p, en estos medios pueden crecer enterobacterias que poseen beta-lactamasas cromosómicas que hidrolizan las cefalosporinas y son inhibidas por el ácido clavulánico, y cuya hiperproducción puede dar lugar a un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE. Entre ellas se encuentra la beta-lactamasa K1 de *Klebsiella oxytoca*, la SHV-1 de *K. pneumoniae* y las cefalosporinas CepA de *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*.

Recientemente se han desarrollado diferentes medios cromogénicos para el aislamiento selectivo y la identi-

ficación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE en 24 horas. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESBL. Aunque estos medios son en general muy sensibles y aportan una identificación de especie presuntiva en base a un código colorimétrico, todo resultado positivo debe ser confirmado antes de su información.

#### 5.2.1.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

A pesar de que algunos de los medios selectivos presentan una alta sensibilidad para la detección de enterobacterias con BLEE, la especificidad no siempre es tan alta en referencia tanto al mecanismo de resistencia como a la especie. Por tanto, cualquier crecimiento debe ser confirmado a nivel de especie, mediante pruebas bioquímicas convencionales, galerías comerciales, paneles automatizados o espectrometría de masas MALDI-TOF.

Una vez documentado el crecimiento de una enterobacteria en el medio selectivo correspondiente se procederá al estudio de sensibilidad a antibióticos beta-lactámicos y pruebas fenotípicas que confirmen la presencia de una BLEE o una AmpC-p. La detección fenotípica de BLEE y AmpC-p está revisada previamente en el Procedimiento de Microbiología clínica de la SEIMC nº 38: "Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos". Recientemente, EUCAST ha elaborado unas guías para la detección de mecanismos de resistencia de importancia clínica y epidemiológica (*EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*). La Tabla 3 resume los métodos fenotípicos de confirmación de BLEE en enterobacterias recomendados por EUCAST. Especialmente complicada puede resultar la caracterización fenotípica de BLEE en especies bacterianas con una beta-lactamasa AmpC cromosómica, en estos casos se recomienda el uso de cefepime con y sin clavulánico debido a la mayor estabilidad de este antibiótico frente a la hiperproducción de dichas beta-lactamasas cromosómicas.

Aunque aún infrecuente, la coproducción de una BLEE y una AmpC-p en *K. pneumoniae* está aumentando y puede dar un fenotipo difícil de caracterizar. La comparación de la recuperación de la actividad de cefotaxima y/o ceftazidima en presencia de ácido clavulánico, ácido fenil-borónico y ambos mediante la técnica de difusión disco-placa ayuda a detectar fenotípicamente la presencia de ambos mecanismos.

#### 5.2.1.3. Información de los resultados

El aislamiento de una enterobacteria en la que se confirma la producción de una BLEE se informará como "Se aísla [nombre de especie] productora de BLEE".

Si tras 48 horas el cultivo es negativo o bien no se confirma la presencia de una enterobacteria productora de BLEE se informará como "No se aíslan enterobacterias productoras de BLEE".

El aislamiento de una cepa de *K. pneumoniae* o de *P. mirabilis* en las que se confirma la producción de una AmpC-p se informará como "Se aísla [nombre de especie] productora de AmpC-p".

Si tras 48 horas el cultivo es negativo o bien no se confirma la presencia de *K. pneumoniae* o *P. mirabilis* productor de AmpC-p se informará como "No se aíslan [nombre de especie] productor de AmpC-p".

En cualquier caso, el diseño del informe de resultados debe realizarse en función de los objetivos específicos perseguidos por el programa de vigilancia que se esté realizando.

### 5.2.2. Carbapenemasas

#### 5.2.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

La mayoría de los medios selectivos para la detección de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación pueden utilizarse para el cribado de carbapenemasas realizando una comprobación ulterior de dicha producción. Esta aproximación presenta el inconveniente de la gran carga extra de trabajo que supone la comprobación de todos los aislamientos BLEE que en muchas zonas geográficas presentan una alta prevalencia. Además, se perderían los aislamientos productores de la carbapenemasa OXA-48 (carbapenemasa que no confiere resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación) no productores de BLEE ni AmpC; aunque estos aislamientos son infrecuentes en *K. pneumoniae*, no los son tanto en *E. coli* y, en general, están aumentando.

Se han utilizado diferentes medios selectivos para la detección específica de enterobacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos, principalmente el agar MacConkey suplementado con concentraciones bajas de carbapenémicos (1 mg/L de imipenem) o con el uso de discos de 10 µg de imipenem o ertapenem. Sin embargo, se puede optimizar la sensibilidad de estas técnicas si se realiza un enriquecimiento previo intro-

**Tabla 3. Métodos fenotípicos de confirmación de BLEE en enterobacterias positivas en el cribado de BLEE según EUCAST.**

Método	Antibiótico (Carga del disco)	La confirmación de BLEE: es positiva si
Tiras con gradiente de antibiótico	Cefotaxima +/- ácido clavulánico	Razón de CMI $\geq 8$ o deformación de la elipse
	Ceftazidima +/- ácido clavulánico	CMI ratio $\geq 8$ o deformación de la elipse
	*Cefepima +/- ácido clavulánico	CMI ratio $\geq 8$ o deformación de la elipse
Comparación halos de inhibición con y sin ácido clavulánico	Cefotaxima (30 $\mu\text{g}$ ) +/- ácido clavulánico (10 $\mu\text{g}$ )	Aumento del halo de inhibición $\geq 5$ mm
	Ceftazidima (30 $\mu\text{g}$ ) +/- ácido clavulánico (10 $\mu\text{g}$ )	Aumento del halo de inhibición $\geq 5$ mm
	*Cefepima (30 $\mu\text{g}$ ) +/- ácido clavulánico (10 $\mu\text{g}$ )	Aumento del halo de inhibición $\geq 5$ mm
Microdilución en caldo	Cefotaxima +/- ácido clavulánico (4 mg/L)	Razón de CMI $\geq 8$
	Ceftazidima +/- ácido clavulánico (4 mg/L)	Razón de CMI $\geq 8$
	*Cefepima +/- ácido clavulánico (4 mg/L)	Razón de CMI $\geq 8$
Test de sinergia con discos de cefalosporinas y amoxicilina ácido clavulánico	Cefotaxima, ceftazidima y *cefepima	Aumento del halo de inhibición de al menos una de las cefalosporinas hacia el disco de amoxicilina/ácido clavulánico

\* Para enterobacterias que poseen una AmpC cromosómica (*Enterobacter* spp, *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp.) se debe utilizar cefepima debido a su mayor estabilidad ante la hiperproducción de dicha AmpC.

duciendo el hisopado rectal en un caldo BHI en el que se ha introducido un disco de 10  $\mu\text{g}$  de imipenem, tras incubación de 18-24 h a 35-37°C se realiza un subcultivo en una placa de agar MacConkey a partir de este caldo y se sitúa sobre el subcultivo otro disco de 10  $\mu\text{g}$  de imipenem, incubándose 18-24 h a 35-37°C; la presencia de carbapenemasas se debería confirmar en aquellas colonias que crezcan alrededor del disco de imipenem.

Debido a que meropenem parece ser el antibiótico carbapenémico con un mayor equilibrio entre sensibilidad y especificidad para detectar EPC, cualquiera de las técnicas previamente descritas podría beneficiarse del uso de este antibiótico en lugar de imipenem y ertapenem.

En los últimos años se han desarrollado diferentes medios cromogénicos con suplementos que impiden el

crecimiento de las bacterias sensibles a carbapenémicos. Entre ellos se encuentran los medios chromID (bioMérieux, Francia) que incluyen el CARBA medium (detecta cepas productoras de KPC y metalo-beta-lactamasas), el OXA-48 medium (específico para cepas productoras de OXA-48) y el CARBA SMART medium (medio biplaca que permite la detección de carbapenemasas en la mitad de la placa y específicamente de carbapenemasas OXA-48 en la otra mitad); el medio CRE Brilliance (Thermo Fisher Scientific, UK), y el medio SUPERCARBA, que contiene agar Driglasky, ertapenem, cloxacilina y sulfato de zinc. Excepto los dos primeros, que deberían ser utilizados en conjunto, estos medios han demostrado una alta sensibilidad para detectar cualquier tipo de las carbapenemasa actualmente circulantes en enterobacterias.

Para la utilización de cualquiera de los medios basados en el cultivo se parte de una torunda rectal que



se inocula directamente en el medio y se procede a su lectura a las 18-24 horas y a las 48 horas; excepto para aquellos casos en los que se proceda a un enriquecimiento previo. Para un mayor rendimiento es importante que la torunda rectal contenga heces, siempre que sea posible.

#### 5.2.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

Una vez obtenido crecimiento en los medios específicos habría que confirmar la especie de enterobacteria que se trata y la sensibilidad a carbapenémicos. Se recomienda estudiar la producción de carbapenemasa en las cepas en las que los valores de CMI de los carbapenémicos se incrementan por encima de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos, EUCAST los ha establecido recientemente en  $>0,12$  mg/L para ertapenem y meropenem y  $>1$  mg/L para imipenem (*EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*). En los últimos años se han desarrollado diferentes pruebas que permiten la confirmación fenotípica de la producción de carbapenemasas como son el test de Hodge modificado, la medición de la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos por espectrofotometría, los métodos basados en la inhibición específica de las diferentes clases de carbapenemasas, los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH (*CarbaNP* y *BlueCarba*), y el método recientemente descrito de la inactivación de carbapenémicos (*carbapenem inactivation method* o CIM). El CarbaNP se recomienda por el CLSI como método de confirmación de la producción de carbapenemasa.

Las técnicas de espectrofotometría permiten la detección de la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos y por tanto la producción de carbapenemasas, la comparación de dicha hidrólisis en presencia y ausencia de inhibidores carbapenemasas de clase B (EDTA o ácido dipicolínico) o de clase A (tazobactam o ácido clavulánico) ayudan a la caracterización de este tipo de enzimas. Se trata de una técnica considerada de referencia pero que no es fácilmente asequible para la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica.

Los métodos colorimétricos se basan en la detección del cambio de pH que produce la hidrólisis del antibiótico carbapenémico mediante una escala colorimétrica. Este método se puede utilizar con cultivos bacterianos en agar Mueller-Hinton, agar sangre o la mayoría de los medios selectivos usados para el cribado de carbapenemasas; sin embargo en el caso del

CarbaNP se desaconseja su uso en colonias desde agar Drigalski o agar McConkey. Son métodos muy sensibles y específicos que necesitan de un cuidadoso cumplimiento de todos sus pasos para obtener un máximo rendimiento. En cepas productoras de OXA-48, con el CarbaNP se puede detectar un viraje de color (rojo a amarillo) menor del esperado, alcanzado un color anaranjado en vez de amarillo que puede dificultar su interpretación.

El test de Hodge modificado es una técnica sencilla y ampliamente utilizada para la detección de la actividad carbapenemasa. A pesar de ser un método recomendado por el CLSI, tiene detractores debido a la presencia de falsos negativos (fundamentalmente MBL, que se pueden evitar en gran parte añadiendo sulfato de zinc al medio) y de falsos positivos (fundamentalmente cepas con hiperproducción de AmpC más pérdida de porinas, que se puede solventar en gran parte añadiendo cloxacilina u oxacilina al medio). Su lectura conjunta con las técnicas basadas en inhibidores de carbapenemasas aporta una información rápida y fácilmente interpretable. Para su realización se recomienda el uso de discos de ertapenem o meropenem en vez de imipenem.

Las carbapenemasas de clase A hidrolizan todos los beta-lactámicos y son inhibidas por el ácido fenil borónico, por tanto los estudios fenotípicos para la caracterización de estas carbapenemasas se basan en la recuperación de la actividad de los antibióticos carbapenémicos en presencia de este compuesto. Dichos estudios se pueden realizar mediante difusión disco-placa o mediante dilución en agar, aunque lo más habitual es comparar el halo de inhibición de discos/tabletas de meropenem (10 µg) con y sin ácido fenil borónico. Esta técnica tiene una alta sensibilidad pero muy baja especificidad por los falsos positivos que se producen en cepas productoras de AmpC más disminución de permeabilidad por pérdida de porinas; este problema se puede evitar probando en paralelo discos de meropenem con y sin cloxacilina (u oxacilina). Si se detecta recuperación de la actividad de meropenem (halo  $\geq 5$  mm) con ácido fenil borónico y cloxacilina se atribuirá la disminución de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos a la producción de AmpC más pérdida de porinas, si se detecta recuperación sólo en presencia de ácido fenil borónico se sospechará producción de carbapenemasa de clase A.

Las carbapenemasas de clase B hidrolizan todos los antibióticos carbapenémicos excepto aztreonam y se inhiben por quelantes del zinc como el EDTA y ácido

dipicolínico. No obstante, es frecuente que los aislamientos productores de carbapenemasa de clase B sean resistentes a aztreonam por la co-producción de BLEE o de beta-lactamasas de tipo AmpC, ya sean cromosómicas o adquiridas. Se han desarrollado diferentes pruebas en diferentes formatos (difusión disco-placa, tiras con gradientes de concentración de antibiótico, microdilución) basados en la inhibición de las carbapenemasas de clase B por EDTA o ácido dipicolínico utilizando imipenem, meropenem e incluso ceftazidima como sustratos. EUCAST recomienda el uso de discos/tabletas de meropenem (10 µg) con y sin EDTA o ácido dipicolínico; la recuperación de la actividad de meropenem (halo  $\geq$  5 mm) se interpretará como producción de una carbapenemasa de clase B. El EDTA tiene cierta actividad intrínseca frente a algunas cepas (también se puede observar con el ácido dipicolínico pero con menos frecuencia), en estos casos se puede detectar una recuperación en el límite (5-6 mm) en ausencia de carbapenemasas de clase B, este hecho se puede evaluar probando el halo de inhibición que tiene un disco que contenga sólo EDTA. En cepas con sospecha de producir una carbapenemasa de clase A que sean resistentes a aztreonam se puede demostrar la co-producción de una BLEE probando la recuperación de la actividad de aztreonam en presencia de ácido clavulánico.

Las carbapenemasas de clase D, principalmente OXA-48, hidrolizan en mayor o menor grado antibióticos carbapenémicos sin afectar (ceftazidima, cefepime) o haciéndolo a muy bajo nivel (cefotaxima) a las cefalosporinas de amplio espectro. No obstante, las cepas productoras de OXA-48 presentan una alta asociación, más en *K. pneumoniae* que en otras especies como *E. coli* o *Enterobacter spp.*, con la producción de BLEE. Estas enzimas no se inhiben por ácido clavulánico, ácido fenil borónico, cloxacilina, EDTA o ácido dipicolínico, pero sí suelen presentar resistencia de alto nivel a temocilina (>64 mg/L) y piperacilina/tazobactam. Por tanto, una primera aproximación para la sospecha de producción de OXA-48 podría ser la presencia de disminución de sensibilidad a algún antibiótico carbapenémico, cuya actividad no se recupera con ningún inhibidor, y que presente alto nivel de resistencia a temocilina y piperacilina/tazobactam, considerando tanto las cepas sensibles a cefalosporinas de 3ª generación como las que presentan un perfil de producción de BLEE. Sin embargo, las resistencias a temocilina y piperacilina/tazobactam no son marcadores específicos de OXA-48, por lo que para la confirmación de carbapenemasas de clase D es altamente recomendable la realización de un método genotípico.

Alternativamente, existen métodos enzimáticos comercializados diseñados para detectar la carbapenemasa OXA-48, que presentan una buena sensibilidad y especificidad, son de muy fácil realización y proporcionan los resultados en 15 minutos. Estos métodos enzimáticos también se han comercializado para detectar carbapenemasas de tipo IMP.

En general, la presencia de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos carbapenémicos (carbapenemasas, BLEE y/o AmpC más pérdida de porinas u otros) dificultan en gran medida la técnicas de confirmación fenotípica a nivel de clase. Para estos casos, y en general para acelerar la obtención del resultado confirmatorio a nivel de clase, se aconseja la utilización de técnicas moleculares (ver apartado 6.3.2 de este documento).

La Figura 1 muestra un algoritmo de actuación para la confirmación de mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos en enterobacterias.

#### 5.2.2.3. Información de los resultados

El aislamiento de una enterobacteria en la que se confirma la producción de una carbapenemasa se informará como “Se aísla [nombre de especie] productora de carbapenemasa”.

Si los resultados fenotípicos son muy sugerentes de la clase de carbapenemasa producida se informará como “Se aísla [nombre de especie] productora de carbapenemasa con alta sospecha de pertenecer a la clase [A o B o D]”

Si tras 48 horas el cultivo es negativo o bien no se confirma la presencia de una enterobacteria productora de carbapenemasas se informará como “No se aíslan enterobacterias productoras de carbapenemasa”.

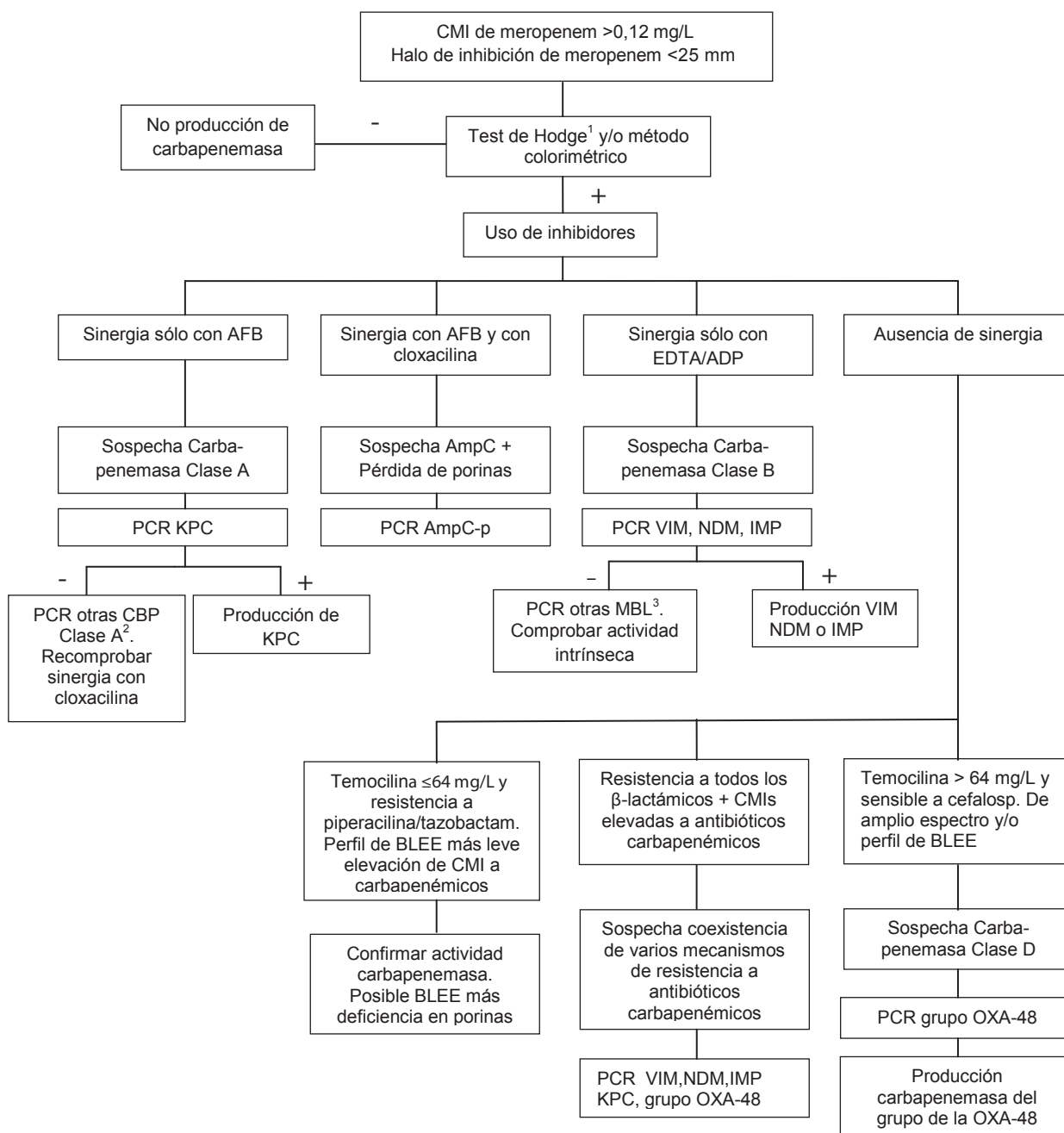
En cualquier caso, el diseño del informe de resultados debe realizarse en función de los objetivos específicos perseguidos por el programa de vigilancia que se esté realizando.

### 5.3. MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE BLEE, AmpC-p Y CARBAPENEMASAS

#### 5.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección

Existen diferentes métodos moleculares rápidos que permiten detectar genes adquiridos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos de amplio espectro en

Figura 1. Algoritmo de actuación para la confirmación de mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos en enterobacterias.



AFB: ácido fenil-borónico. ADP: ácido dipicolínico. EDTA: ácido etildiaminotetraacético. MBL: metalo-beta-lactamasas. CBP: carbapenemasa. BLEE: beta-lactamasa de espectro extendido. 1. En el caso de utilizar el test de Hodge se recomienda su realización e interpretación junto con las técnicas que emplean inhibidores de beta-lactamasas. 2. GES, SME, IMI, NMC. 3. SIM, GIM, AIM, SPM entre otras.

enterobacterias. Se clasifican en función del número de genes buscados (PCR simple o PCR múltiple) y de la técnica utilizada (PCR en tiempo real, microarray y pirosecuenciación).

La amplificación de ADN mediante PCR simple convencional permite la identificación de un solo gen y requiere de iniciadores específicos para la diana buscada. Aunque es posible distinguir variantes alélicas muy



similares con el diseño de iniciadores que incluyan los lugares de variación entre alelos, en general para la caracterización de variantes alélicas específicas se requiere una posterior secuenciación del amplicón obtenido. Por otra parte, mediante una PCR convencional simple con iniciadores degenerados se pueden detectar diferentes variantes de una misma familia, por ejemplo para la detección de los diferentes grupos de las BLEE de la familia CTX-M.

La utilización de PCRs múltiples permite la caracterización de diferentes mecanismos en una sola reacción de amplificación, circunstancia especialmente útil en el estudio de beta-lactamasas de amplio espectro debido a su diversidad. Requiere de varios pares de iniciadores que sean altamente específicos de la diana a amplificar, que tengan condiciones de amplificación semejantes y que amplifiquen fragmentos de tamaños diferentes que permitan su fácil diferenciación. En la última década se han propuesto diferentes PCRs múltiples para la detección de genes que codifican enzimas plasmídicas de tipo AmpC, BLEEs y carbapenemasas. Se han descrito diferentes limitaciones a algunas de estas técnicas entre las que destacan el tamaño poco discriminativo de los amplicones que dificulta su diferenciación, la utilización de diferentes condiciones de amplificación que obliga a realizar varias PCRs múltiples en paralelo, la amplificación cruzada con genes de beta-lactamasas cromosómicas intrínsecas de determinadas especies y, en general, la inclusión de un número limitado de genes, con frecuencia agrupados por familias como carbapenemasas de clase A o de clase B. Recientemente se han comercializado diferentes sistemas basados en PCRs múltiples y algunas permiten el diagnóstico rápido de BLEE y carbapenemasas, en general con una alta sensibilidad y especificidad.

Existen otros métodos moleculares alternativos a los métodos basados en PCR. El microarray es una metodología muy útil para analizar un gran número de genes en un mismo ensayo y poder detectar variaciones nucleotídicas de un alelo. Es una tecnología versátil, fácil de aplicar y de actualizar. Diferentes microarrays comerciales para la detección de genes codificantes de BLEE, AmpC-p y carbapenemasas han demostrado una alta sensibilidad y especificidad.

Recientemente se han desarrollado métodos alternativos para la detección molecular de BLEEs y carbapenemasas, entre ellos destacan la amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP).

Como se ha ido reflejando en el texto, se han comercializado en los últimos años numerosos métodos moleculares de detección rápida de BLEE, AmpC y carbapenemasas en muestras rectales; la Tabla 4 resume algunos de los principales métodos comerciales disponibles.

### 5.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados

Los métodos moleculares deben ser utilizados y evaluados en un contexto multidisciplinar acorde con la situación específica de cada hospital. Aunque los métodos moleculares pueden alcanzar una alta sensibilidad y especificidad no pueden reemplazar en su totalidad al cultivo microbiológico, que sigue siendo el procedimiento de referencia en la mayoría de los protocolos y que permite comprobar la identificación de la especie, la viabilidad de la cepa, y realizar estudios fenotípicos y epidemiológicos ulteriores.

La detección mediante métodos moleculares de un gen codificante de una beta-lactamasa de amplio espectro directamente de muestra clínica debe informarse especificando la metodología empleada pero no la especie, la cual desconocemos con este tipo de aproximaciones.

Por tanto se informará como “Mediante [método empleado] se detecta la presencia de un gen codificante de [tipo de BLEE, AmpC-p o carbapenemasa]” Por ejemplo, “Mediante PCR en tiempo real se detecta la presencia de un gen codificante de carbapenemasa tipo NDM”

En el caso de que se haya aplicado el método molecular para confirmación sobre colonia bacteriana previamente identificada y con sospecha fenotípica se debe informar también la especie: “Se aísla [nombre de la especie] productora de [tipo de BLEE, AmpC-p o carbapenemasa]”. Por ejemplo, “Se aísla *Enterobacter cloacae* productor de carbapenemasa tipo VIM.”

Dependiendo del mecanismo y de la técnica empleada se podrá especificar la beta-lactamasa concreta que se detecta o bien, que es lo más habitual, un grupo o familia. En la mayoría de los casos, la caracterización del mecanismo concreto sólo se puede hacer tras la secuenciación completa del gen que lo codifica. La detección de un beta-lactamasa perteneciente a un grupo de BLEE, AmpC-p o carbapenemasas se informará como “Mediante [método empleado] se detecta la presencia de un gen codificante de [grupo/familia de BLEE, AmpC-p o carbapenemasa]”. Por ejemplo, “Me-

Tabla 4. Métodos comerciales para la detección molecular de BLEE, AmpC-p y carbapenemasas en muestras rectales\*.

Método	Diana	Nombre	Compañía
PCR Múltiple más hibridación	TEM, SHV, CTX-M, OXA	Hyplex ESBL	Amplex Diagnostic
	KPC, IMP, VIM, NDM y OXA-48 like	Hyplex Superbug	Amplex Diagnostic
	OXA-23, OXA-24 y OXA-51 like	Hyplex CarbOXA	Amplex Diagnostic
NASBA (Amplificación simple a tiempo real)	KPC	NucliSENS EasyQ KPC Test	bioMerieux
PCR Múltiple a tiempo real	KPC, NDM, OXA-48, VIM, CTX-M-1, CTX-M-9	eazyplex® SuperBug CRE	Amplex Diagnostic
	KPC, NDM, OXA-48, VIM, OXA-23, OXA-40 y OXA-58 (A) o OXA-181 (B)	eazyplex® SuperBug complete A and B	Amplex Diagnostic
	TEM, SHV, CTX-M	PCR Check-MDR ESBL kit	Checkpoints Health BV
	KPC, IMP, OXA-48 like, VIM y NDM	PCR Check-MDR Carba kit	Checkpoints Health BV
	KPC, IMP-1, OXA-48 like, VIM, NDM	PCR Xpert Carba-R Assay	Cepheid/Werfen
	CTX-M, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM	PCR ePlex BCID-GN	GenMark Dx/ Werfen
	ADN de <i>E. coli</i> , CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9	PCR RealCycler CTXE	Progenie Molecular/ Werfen
	CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9	PCR RealCycler BLACTX	
	AmpC de los grupos ACC, EBC, CIT y DHA.	PCR RealCycler AMPC	
	IMP, VIM	PCR RealCycler IMVI	
	KPC, NDM-1	PCR RealCycler KPND	
	VIM, OXA-48 like, KPC	PCR RealCycler OXVIKP	
	KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM-1/2, GES	LightMix Modular Assays	Roche Applied Science (TibMolBiol)
LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)	Diseños "in house"	OC-SENSOR System. Compatible con PCR simples o múltiples a tiempo real.	Eiken Chemical CO, LTD
	VIM, OXA-48, NDM, KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-58, grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-9	Eazyplex (Amplex)	Menarini Diagnostics
Microarray	TEM, SHV, CTX-M, IMP, KPC, OXA-48 like	Check-MDR CT102	Checkpoints Health BV/ HAIN Lifescience
	SHV, CTX-M, AmpC, carbapenemasas,	Check-MDR CT103	Checkpoints Health BV/ HAIN Lifescience
	KPC, OXA-48 o VIM/NDM	Check-Direct CPE	Checkpoints Health BV/ HAIN Lifescience
	OXA, GIM, KPC, BLEE	Identibac CarbDetect AS-1 Kit	Alere Technologies GmbH

\* Varias de estas técnicas han demostrado su eficacia sobre otras muestras clínicas diferentes a las torundas rectales

dante PCR múltiple se detecta la presencia de un gen codificante de una BLEE del grupo CTX-M-1". Sobre colonia, el informe se realizará como "Se aísla [nombre de la especie] productora de [grupo/familia de BLEE, AmpC-p o carbapenemas]". Por ejemplo, "Se aísla *P. mirabilis* productor de una AmC-p de la familia CIT".

La ausencia de detección se informará como "Mediante [método empleado] no se detecta la presencia de genes codificantes de [tipo de BLEE, AmpC-p o carbapenemas]". Por ejemplo, "Mediante PCR simple no se detecta la presencia de genes codificantes de carbapenemasas del grupo OXA-48".

## 6. *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE A ANTIBIÓTICOS

### 6.1 IMPACTO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

*A. baumannii* es un cocobacilo gramnegativo, aerobio estricto, no fermentador que pertenece a la familia Moraxellaceae. Son patógenos oportunistas con relevancia creciente en las infecciones tanto nosocomiales como en menor grado, comunitarias, especialmente entre los pacientes admitidos en las UCIs. El espectro clínico de las infecciones producidas por *A. baumannii* incluye neumonía asociada a ventilación mecánica, endocarditis, meningitis, infecciones de la piel y partes blandas, del tracto urinario y asociados a dispositivos protésicos. También cabe destacar que *A. baumannii* se ha aislado de numerosas fuentes incluyendo superficies ambientales, agua, animales y humanos. Aunque su reservorio no está bien definido, puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo en superficies tanto secas como húmedas y es común su aislamiento en ambiente hospitalario y pacientes hospitalizados, donde su control es muy difícil.

El género *Acinetobacter* se compone de 30 especies con un nombre asociado y 9 especies genómicas definidas a través de estudios de hibridación ADN-ADN. Entre ellas, *A. baumannii* destaca como uno de los patógenos más problemáticos para las instituciones de salud en todo el mundo debido a su carácter de multirresistencia antibiótica. Sin embargo, *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis* (antiguamente *Acinetobacter* especie genómica 3 y 13TU, respectivamente) están emergiendo como patógenos de cierta consideración y ya se han descrito implicados en brotes hospitalarios en UCIs. Los métodos fenotípicos son incapaces de distinguir entre *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* así como la especie ambiental *Acinetobacter calcoaceticus*, de ahí que tradicionalmente se hayan incluido dentro del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (Acb). Por el contrario, los métodos moleculares son más efectivos. Entre ellos, el análisis de restricción del ADN tras amplificación del 16S ribosómico, el análisis del patrón genético del espaciador tRNA y la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante AFLP<sup>TM</sup>. También destacar que se pueden utilizar secuencias específicas de genes como marcadores moleculares tal y como son los espaciadores intergénicos (ITS), la región entre los genes ribosómicos 16S-23S ARNr, *recA*, *rpoB*, y *gyrB*. Su principal inconveniente es la necesidad de personal especializado debido a su complejidad y el tiempo requerido. Por ello, no están implementados de manera rutinaria en los laboratorios de Microbiología. De gran importancia son los métodos basados en proteómica a través del MALDI-TOF. Recientemente se han publicado trabajos que demuestran la utilidad de MALDI-TOF (Bruker Biotyper) para identificar correctamente las diferentes especies de *Acinetobacter*.

Respecto a su sensibilidad a los antibióticos, es notable la capacidad de *A. baumannii* para adquirir resistencia a los antimicrobianos. En la década de los 90, las infecciones causadas por *A. baumannii* eran fácilmente tratadas con antibióticos convencionales. Sin embargo, en la actualidad presenta resistencia a prácticamente todos los antibióticos de uso clínico. Según los datos obtenidos en el último estudio multicéntrico nacional (proyecto GEIH-GEMARA-REIPI-Ab2010) en el que se incluyeron 446 aislados de *A. baumannii* obtenidos de 43 hospitales españoles entre febrero y marzo del 2010, se detectó una alta prevalencia de resistencia (incluida también la sensibilidad intermedia) a la mayoría de los antimicrobianos: >94% (ceftazidima, piperacilina y ciprofloxacino), 82-86% (carbapenemas y tetraciclina), 60-70% (tobramicina, sulbactam, gentamicina y doxiciclina), 49% (amicacina), 30% (minociclina, rifampicina), 24% (tigeciclina) y 3% (colistina). En comparación con los datos obtenidos en el primer estudio GEIH-Ab2000 realizado una década antes, estos aislados fueron más resistentes a ceftazidima (99% vs 83%), carbapenemas (82-86% vs 43%-48%), doxiciclina (70% vs 68%), sulbactam (65% vs 53%) y colistina (3% vs 0%), pero más sensibles a los aminoglucósidos (particularmente gentamicina: 70% vs 96%), tetraciclina (83% vs 91%) y rifampicina (30% vs 51%), respectivamente. Atendiendo a estos datos es por tanto importante considerar que la mayoría de los aislados clínicos de *A. baumannii* que se obtienen en la práctica clínica diaria muestran un perfil de MDR o XDR, según criterios de Magiorakos et al.

Respecto a los mecanismos que confieren resistencia a los antimicrobianos en *A. baumannii*, este microorganismo muestra una extraordinaria capacidad para adquirir resistencia a múltiples antibióticos. Se han descrito beta-lactamasas de distintas clases moleculares tal y como clase A (tipo TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, CARB, GES, KPC, SCO-1...), clase B o metaloenzimas (IMP, VIM, SIM, NDM...) o clase D con actividad sobre los carbapenémicos, tal y como OXA-23,-24 -58,-143, y -235, siendo este grupo de carbapenemasas de clase D las más importantes tanto clínica como epidemiológicamente. De igual manera, la reducción en la permeabilidad, la hiperexpresión de distintos sistemas de expulsión activa, la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos y cloranfenicol, metilasas, y modificaciones del sitio de interacción de la diana están implicados en la resistencia a distintas familias de antibióticos en *A. baumannii*.

Para entender la epidemiología clínica de esta bacteria, uno de los trabajos más relevantes en nuestro país se ha realizado en el seno del estudio multicéntrico antes mencionado. Se compararon los datos de dos estudios prospectivos de cohortes multicéntricos en nuestro país: uno realizado en el 2000 (183 pacientes) y otro en el 2010 (246 pacientes); incluyendo pacientes consecutivos infectados o colonizados por *A. baumannii*. La tasa de incidencia de la colonización o infección por *A. baumannii* se incrementó significativamente desde el 0,14 al 0,52 (2000-2010) en los servicios médicos ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, el número de casos asociados a instituciones sanitarias no nosocomiales se incrementó desde el 1,2% al 14,2%, respectivamente ( $p < 0,001$ ), destacando que la exposición previa a carbapenémicos se incrementó en el 2010 en un 10,4% ( $p = 0,03$ ). Los antibióticos más frecuentemente usados para el tratamiento definitivo de los pacientes con infecciones fueron los carbapenémicos en el 2000 (45%) y la colistina en el 2010 (50,3%). Es de destacar también el incremento en la frecuencia de la adquisición de *A. baumannii* en unidades no-UCI en 2000 vs 2010 (7,6%-19,2%, respectivamente,  $p = 0,01$ ). El estudio epidemiológico a través de MLST también puso de manifiesto un incremento del grupo clonal ST2 en 2010, el cual mostró mayor resistencia a imipenem y se asoció a un mayor riesgo de sepsis. A modo de resumen, es notorio el cambio epidemiológico en 10 años de *A. baumannii* afectando más a pacientes ingresados en servicios convencionales (no críticos) y también como causa de infecciones en instituciones de cuidados sanitarios no hospitalarios.

En los seres humanos, *Acinetobacter* spp. se ha aislado prácticamente de todos los sitios cultivables y pue-

de formar parte de la microbiota bacteriana de la piel, especialmente en las regiones húmedas, como los pliegues de las axilas, ingle, y de los pies. De manera interesante, *A. baumannii*, como patógeno nosocomial más importante, ha sido raramente encontrado en la piel humana (<3%) y en heces humanas (<1%).

Los pacientes colonizados por *Acinetobacter* spp. tienen a menudo un historial de hospitalización prolongada o terapia antimicrobiana previa. La estancia en UCI, sobre todo ante la presencia de otros pacientes que están colonizados con *Acinetobacter* spp., predispone a los pacientes a la colonización. Ello se ve favorecido sobre todo en pacientes que están intubados y en aquellos que tienen catéteres intravenosos, dispositivos invasivos, drenajes quirúrgicos, o sondas urinarias permanentes. *Acinetobacter* spp. suele cultivarse del paciente hospitalizado a partir de muestras de esputo o secreciones respiratorias, heridas, y la orina y puede aislarse habitualmente en soluciones de irrigación y fluidos intravenosos. Su capacidad de sobrevivir en desecación unido a su facilidad para contaminar el ambiente hospitalario y su capacidad de transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal favorece su implicación como causa de brotes hospitalarios. En España, se han descrito brotes por *A. baumannii* portadores de las carbapenemasas OXA-23, OXA-24 y OXA-58.

## 6.2. MÉTODOS BASADOS EN EL CULTIVO

### 6.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

*A. baumannii* presenta una gran facilidad para crecer en los medios de cultivo convencionales. Con el fin de facilitar el aislamiento de esta bacteria tanto en muestras clínicas como ambientales, el uso de medios habitualmente utilizados para el aislamiento de bacterias gramnegativas, como por ejemplo agar MacConkey, puede ser una buena alternativa. Considerando que buscamos bacterias multirresistentes, el uso de agar MacConkey suplementado con gentamicina a una concentración de 8 mg/L o incluso cefotaxima a una concentración de 2 mg/L puede permitir aislar en un primer paso *A. baumannii*. El uso de cefotaxima (o incluso ceftazidima) a baja concentración, permitiría no solo aislar *A. baumannii* sino también otros bacilos gramnegativos multirresistentes de interés nosocomial, como puede ser *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* o *S. maltophilia*.

Otro medio de cultivo que ha sido usado para el aislamiento selectivo de *Acinetobacter* tanto en mues-



tras clínicas como ambientales ha sido el medio LAM (Leeds *Acinetobacter* medium), que es un medio diferencial desarrollado para permitir el crecimiento selectivo de especies de *Acinetobacter*. El medio LAM posee cefsulodina (15 mg/L) y cefradina (50 mg/L) para inhibir a los gramnegativos, así como vancomicina (10 mg/L) para prevenir el crecimiento de grampositivos. El medio LAM contiene también fructosa y sacarosa, azúcares que no son fermentados por las especies de *Acinetobacter*, por lo que las colonias crecen con un color rosado tras el periodo de incubación. Aquellas colonias capaces de crecer en este medio con estas características se identifican posteriormente mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Un estudio español donde se estudia el valor predictivo de este medio para la detección de especies de *Acinetobacter* reveló un alto valor predictivo positivo para detectar *A. baumannii* (90,7%) a partir de muestras ambientales, siendo capaz también de detectar la presencia de *K. pneumoniae*, aunque ambos microorganismos son fácilmente distinguibles en este medio. Existen también otros medios cromogénicos como el CHROMagar *Acinetobacter*. Este medio inhibe el crecimiento de la mayoría de los cocos grampositivos y levaduras y emplea un método de identificación basado en un cambio de color que permite a las especies de *Acinetobacter* aparecer como colonias de color rojo. Este medio con la adición de suplementos específicos ha mostrado una buena sensibilidad y especificidad para la detección de aislados de *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* resistentes a carbapenémicos, aunque aún requiere un número mayor de estudios para su validación clínica.

Como en otros casos, los medios de cultivo se incubarán durante 48 horas en aerobiosis a 35-37°C.

### 6.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

Se realizará una primera lectura de los cultivos a las 24 horas y si es negativa a las 48 horas de incubación. El crecimiento de un microorganismo en agar MacConkey (especialmente si está suplementado con antibióticos), cuya tinción de Gram revele diplococos (cocobacilos) gramnegativos, oxidasa negativo, y catalasa positivos sugiere la presencia de *Acinetobacter* spp. La identificación fenotípica es compleja debido al gran número de especies distintas y a la ausencia de especificidad de las pruebas bioquímicas para diferenciarlas. Por ello, el uso de galerías o paneles comerciales no garantiza con exactitud la identificación a nivel de especie. En el supuesto de usar este sistema de identificación, y en el caso de obtener una identificación de *A. baumannii*, es recomendable hacer alusión

en la identificación al complejo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*, debido a la similitud a nivel fenotípico con otras especies tal y como *A. pittii*, *A. nosocomialis* y *A. calcoaceticus*.

Si bien, la identificación molecular proporciona la identificación de especie a nivel definitivo, la complejidad de estos procedimientos y el tiempo requerido para su logro complica enormemente su implementación en los laboratorios de Microbiología en la práctica rutinaria diaria.

La irrupción de los métodos basados en proteómica (MALDI-TOF), su rápida implementación en los laboratorios de Microbiología unido a la razonable exactitud en la identificación a nivel de especie en el género *Acinetobacter* ha favorecido que en la actualidad la gran mayoría de laboratorios usen este sistema de identificación en detrimento (o de manera paralela y complementaria) cada vez más de los métodos fenotípicos.

Una vez identificada la especie de *Acinetobacter* o su asignación al género "*Acinetobacter* spp." se procederá a realización del antibiograma (disco difusión, tiras con gradiente de concentración de antibióticos, o microdilución manual o automatizada en paneles comerciales) lo cual permitirá determinar la sensibilidad a los antimicrobianos, su fenotipo de resistencia, y su asignación como MDR, XDR, o PDR según criterios definidos anteriormente (Magiorakos et al.). Sin embargo, debido a la complejidad de mecanismos de resistencia a antimicrobianos que pueden coexistir en este microorganismo, desde un punto de vista práctico el carácter MDR en *Acinetobacter* spp. se va a definir por la presencia de resistencia a antibióticos carbapenémicos independientemente de la resistencia a otras familias de antibióticos.

### 6.2.3. Información de los resultados

El aislamiento e identificación de *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii* u otra especie si fuese la situación) multirresistente se informará: "Se aísla *Acinetobacter* spp. multirresistente".

Si a las 48 horas de incubación no se aísla el microorganismo, se informará: "No se aísla *Acinetobacter* spp".

Si dentro del período de incubación se aísla una cepa que no muestra el perfil de multirresistencia, se informará: "No se aísla *Acinetobacter* sp.p multirresistente" (no resistente a los antibióticos carbapenémicos independientemente de la sensibilidad a otras familias de antimicrobianos).

## 6.3. MÉTODOS MOLECULARES

### 6.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección

Es importante diferenciar los distintos tipos de métodos moleculares en función de su finalidad:

- a. Identificación microbiana a nivel de especie a partir de colonia aislada. Para ello, su principal inconveniente es que requieren disponer de la bacteria aislada antes de su aplicación. Entre algunos de ellos, análisis de restricción del ADN tras amplificación del 16S ribosómico, el análisis del patrón genético del espaciador tRNA, y la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante AFLP™. También destacar que pueden ser utilizados como marcadores moleculares secuencias específicas de genes tal y como los espaciadores intergénicos (ITS), la región entre los genes ribosómicos 16S-23S ARNr, *recA*, *rpoB*, y *gyrB*. Otras especies de *Acinetobacter*, tal y como *A. ursingii* y *A. haemolyticus*, aunque en menor grado, se están también describiendo como patógenos nosocomiales, aunque su potencial patógeno humano difiere bastante de *A. baumannii* en mayor medida y también respecto a *A. pittii* y *A. nosocomialis*.
- b. Métodos moleculares para detectar la presencia de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario. En el estudio previamente referenciado, se probó la detección de *A. baumannii* en superficies ambientales de una unidad de críticos usando PCR cuantitativo en tiempo real con el gen de la proteína de membrana externa OmpA como diana, como método comparativo se utilizó el cultivo en medio LAM. En general, la PCR en tiempo real detectó la superficie contaminada en 4 horas con una alta sensibilidad (100%) respecto al cultivo convencional. Sin embargo, 38% de las muestras fueron positivas por PCR y negativas por cultivo, lo cual pone de manifiesto la existencia de ADN bacteriano no asociado con bacterias viables, o una limitación del propio método del cultivo bacteriano.
- c. Métodos moleculares orientados a detectar *A. baumannii* multirresistente a antibióticos (MDR). Debido a la complejidad de mecanismos de resistencia a antibióticos que pueden coexistir en este microorganismo, desde un punto de vista práctico la presencia de multirresistencia (referido arriba) desde un enfoque molecular se va a definir por la presencia de enzimas carbapenemasas, y de manera más específica por los genes del tipo OXA (OXA-23,-24-58,-143,-235 e ISAb1-OXA-51).

No obstante, también habrá que considerar genes que codifiquen MBL como IMP, VIM, NDM y SIM. En este sentido, se ha definido y validado una PCR en tiempo real con sondas Taqman capaz de detectar de manera rápida las carbapenemasas de clase D presentes en *A. baumannii*. Se están haciendo esfuerzos desde la industria diagnóstica para implementar esta tecnología a partir de muestra clínica directa, en lugar de partir de la colonia aislada, lo que se traduciría en una importante reducción en los tiempos de respuesta.

### 6.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados

En función de la finalidad de la técnica molecular los resultados se informarán como:

- a. A nivel de detección de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario. Los resultados no son solo cualitativos, sino que la propia técnica permite cuantificar las copias de ADN genómico, por lo que el resultado obtenido permite determinar el grado de contaminación de la superficie expuesta analizada y por tanto, la probabilidad de favorecer una transmisión a partir de la misma. Es conveniente realizar las determinaciones por duplicado, con el fin de proporcionar un resultado lo más fiable posible, y además usar otra torunda para cultivo bacteriano. Se deben incluir controles positivos y negativos en cada determinación. Las muestras se considerarán positivas si el ciclo umbral aparece dentro de los 38 ciclos del ensayo. En esta aproximación y si tras la PCR se observa un resultado positivo podemos informar el resultado como: “Se detecta ADN de *A. baumannii*” (en el caso de una identificación precisa o *Acinetobacter* spp. si no es el caso). En caso contrario se informará como “No se detecta ADN de *A. baumannii*”. No hay evidencia suficiente que justifique informar un resultado de manera cuantitativa.
- b. A nivel de detección de un *Acinetobacter* spp. MDR. Los resultados serán cualitativos en todos los casos a través de PCR simple o múltiple con todos los genes tipo OXA-o MBL-amplificados (con controles positivos y negativos).

Si la técnica molecular se aplica sobre colonias aisladas, se informará del gen codificante de la carbapenemasa detectado tras el nombre y especie del aislamiento; como se ha mencionado previamente se informará como *Acinetobacter* spp. o *A. baumannii* en función de la exactitud en la identificación: “Se aisla [nombre del microorganismo] productor de [tipo

de carbapenemasa]”. Si la técnica se realiza sobre muestra clínica se informará como “Mediante [método empleado] se detecta la presencia del gen codificante de [tipo de carbapenemasa]”; en caso contrario se informará como: “Mediante [método empleado] no se detecta la presencia de genes codificantes de [tipo de carbapenemasa]”.

## 7. *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTE A ANTIBIÓTICOS

### 7.1. IMPACTO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO

*P. aeruginosa*, microorganismo ubicuo en la naturaleza y de gran versatilidad, es uno de los principales patógenos implicados en infecciones humanas oportunistas. *P. aeruginosa* es una de las causas más frecuentes de infección en pacientes hospitalizados, afectando especialmente a pacientes ingresados en las UCI con neumonía asociada a ventilación mecánica o con infección de quemaduras extensas, ambos procesos asociados con una elevada mortalidad. Asimismo, *P. aeruginosa* es la principal causa de infección respiratoria crónica en pacientes con fibrosis quística (FQ), bronquiectasias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). *P. aeruginosa* puede también causar neumonía comunitaria, infecciones urinarias, endocarditis, meningitis, diversas formas de otitis, queratitis y endoftalmitis y osteomielitis entre otras. Aunque el microorganismo no suele formar parte de la microbiota normal del ser humano, puede producirse la colonización a nivel del tracto gastrointestinal y de otras zonas, como faringe, axila, y periné.

*P. aeruginosa* posee múltiples factores de virulencia. Entre ellos cabe destacar especialmente el sistema de secreción tipo III, utilizado por este microorganismo para inyectar potentes exotoxinas en las células eucariotas. *P. aeruginosa* puede producir cuatro de estas exotoxinas, codificadas por los genes *exoS*, *exoT*, *exoY*, y *exoU*. Mientras que la presencia de *exoT* es prácticamente uniforme en *P. aeruginosa*, la presencia de los otros genes es más variable. Particularmente, las cepas positivas para *exoS* son negativas (y viceversa) para *exoU*, que es menos frecuente pero codifica la citotoxina más potente.

La patogenia de las infecciones por *P. aeruginosa* además se relaciona estrechamente con la situación del huésped. En este sentido son importantes la rotura de la barrera cutáneo-mucosa, los trastornos de la inmunidad humoral y la neutropenia. Los principales facto-

res relacionados con la multirresistencia son la gravedad de la infección, el uso de dispositivos invasivos, la hospitalización prolongada y la exposición previa a antimicrobianos, especialmente carbapenemas y fluoroquinolonas.

La creciente prevalencia de infecciones nosocomiales por cepas de *P. aeruginosa* MDR y XDR, llegando en ocasiones incluso a la PDR, compromete enormemente la selección de tratamientos efectivos, y por tanto se asocia con una elevada morbilidad y mortalidad. La prevalencia de cepas MDR se sitúa ya en cifras superiores al 30% a nivel mundial, incluyendo los hospitales españoles; aproximadamente la mitad de las cepas MDR serían además XDR. Esta creciente prevalencia de fenotipos MDR/XDR resulta de la conjunción de la extraordinaria capacidad de *P. aeruginosa* para desarrollar resistencia frente a casi todos los antimicrobianos disponibles mediante la selección de mutaciones cromosómicas, con la cada vez más frecuente producción de determinantes de resistencia exógenos, generalmente localizados en integrones codificados en plásmidos o transposones.

Una de las características más preocupantes de *P. aeruginosa* es su notable resistencia intrínseca y su extraordinaria capacidad para ampliar esta resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos disponibles por selección de mutaciones en un complejo entramado de genes implicados en la resistencia y su regulación. Este hecho tiene graves repercusiones sobre la eficacia del tratamiento de la infección por *P. aeruginosa*, sobre todo cuando afecta a pacientes críticos ingresados en la UCI o aquellos con infecciones crónicas donde este problema se magnifica debido a la alta frecuencia de cepas hipermutadoras (cepas con una tasa de mutación espontánea hasta 1000 veces más altas de lo normal).

El principal mecanismo para desarrollar resistencia a las penicilinas (como la ticarcilina o la piperacilina) o las cefalosporinas (como la ceftazidima o cefepima) antipseudomónicas es la selección de mutantes con hiperproducción constitutiva (desrepresión) de la cefalosporinasa cromosómica inducible AmpC. Entre los mecanismos de resistencia mutacionales destaca también la represión o inactivación de la porina OprD, que junto con la expresión inducible de AmpC confiere resistencia a imipenem y sensibilidad disminuida al meropenem. La inactivación de OprD frecuentemente actúa también de forma sinérgica con la desrepresión de AmpC confiriendo resistencia a todos los betalactámicos. Finalmente, la hiperexpresión de alguna



de las múltiples bombas de expulsión, principalmente MexAB-OprM y MexXY-OprM y en menor medida MexEF-OprN y MexCD-OprJ, contribuye de forma notable a los fenotipos de resistencia. MexAB-OprM es la que presenta un perfil de sustratos más amplio. Su expresión constitutiva juega un papel notable en la resistencia intrínseca y su hiperexpresión por mutaciones cromosómicas afecta a todos los antibióticos beta-lactámicos (excepto el imipenem) y a las fluoroquinolonas. La hiperexpresión de MexAB-OprM sumada a la inactivación de OprD es una de las causas más frecuentes de resistencia clínica a meropenem. La expresión inducible de MexXY juega un papel importante en la resistencia intrínseca a aminoglucósidos y su hiperexpresión mutacional además juega un papel importante en la resistencia adquirida a cefepima. La hiperexpresión de MexEF-OprN y MexCD-OprJ es menos frecuente y afecta sobre todo a las quinolonas. No obstante, las mutaciones (*mexT/mexS*) que llevan a la hiperexpresión de MexEF-OprN también confieren sensibilidad disminuida a carbapenemas por represión de *oprD*. La hiperexpresión de MexCDF-OprJ, más frecuente en infecciones crónicas, también contribuye a la resistencia a cefepima, a pesar de conferir hipersensibilidad a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos y a los aminoglucósidos. Las interacciones entre todas estas mutaciones de resistencia son complejas pero pueden resultar en fenotipos MDR/XDR.

Aunque proporcionalmente es todavía mucho menos común que la resistencia mutacional, cada es vez más frecuente a nivel mundial la detección de elementos genéticos transferibles (integrones localizados en transposones y/o plásmidos) portadores de genes de carbapenemasas o BLEE junto con determinantes de resistencia a aminoglucósidos. Particularmente relevantes son las MBL, cuya prevalencia en aislados de *P. aeruginosa* en España ha aumentado más de 10 veces (del 0,08% al 1%) en cinco años (2003-2008) y han sido responsables de importantes brotes epidémicos. Estudios recientes sugieren que los bacilos gramnegativos no fermentadores ambientales podrían ser los reservorios de estos elementos, amplificados por transferencia a determinados clones de *P. aeruginosa* con gran capacidad de diseminación. De hecho, estudios recientes demuestran que la mayoría las cepas de *P. aeruginosa* productoras de carbapenemasas o BLEE, pertenecen a los denominados clones de alto riesgo, principalmente los ST235, ST111 o ST175. Si bien estas líneas clonales MDR/XDR están ampliamente extendidas a nivel internacional, cabe destacar que existe una importante variabilidad en los determinantes de resistencia exógenos implicados, sugiriendo

que la expansión de estos clones MDR/XDR precede a la adquisición de los elementos genéticos transferibles. Asimismo, cabe destacar que estos clones de alto riesgo MDR/XDR siempre albergan una importante carga de mecanismos de resistencia mutacionales además de la codificada en elementos genéticos transferibles. Las MBL descritas en *P. aeruginosa* incluyen las VIM, IMP, SPM, GIM, SIM, NDM, AIM, y FIM. Al contrario de lo que ocurre en las enterobacterias, la MBL detectada con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* en España es con gran diferencia la VIM-2. No obstante, también se han descrito casos de VIM-1, VIM-13, VIM-20 y variantes de IMP como la IMP-15. Entre las carbapenemasas de clase A detectadas en *P. aeruginosa* cabe destacar las de tipo GES, particularmente la GES-5, causante de un importante brote epidémico en un hospital de Madrid. Entre las BLEE detectadas en *P. aeruginosa* cabe destacar las de tipo OXA, con varios derivados descritos por primera vez en España, así como las de tipo PER, VEB o BEL. En principio el hallazgo de este tipo de beta-lactamasas en nuestro país se limita todavía a casos esporádicos, si bien la dificultad de su detección podría llevarnos a infraestimar su incidencia.

De todo lo expuesto se deduce que el escenario epidemiológico de la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*, además de ser extraordinariamente complejo, se caracteriza por presentar múltiples niveles que debemos considerar para optimizar las estrategias de vigilancia y control. Estos niveles incluyen la resistencia MDR y XDR, la resistencia mutacional y la transferible y la resistencia mediada por clones esporádicos o epidémicos (de alto riesgo). Idealmente, la vigilancia debería hacerse de todas las cepas MDR, ya que constituyen la base del problema, pero quizás las medidas de control, como el aislamiento de los pacientes o la búsqueda activa de casos de colonización, podría limitarse a las cepas XDR, mucho más preocupantes desde el punto de vista terapéutico y con unos números de incidencia más asequibles para este objetivo. Sin duda, aunque solo fuera por la transmisibilidad del mecanismo, las cepas productoras de carbapenemasas y BLEE deberían vigilarse y controlarse de forma específica. El interés de esta vigilancia específica cobra aun más fuerza con la reciente introducción de nuevas alternativas terapéuticas, como ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam, que son muy activas frente a las cepas MDR/XDR por mecanismos mutacionales (por ejemplo hiperproducción de AmpC) pero inactivos frente a las cepas productoras de muchas de las beta-lactamasas adquiridas, particularmente las MBL. Finalmente, dada su extraordinaria capacidad de dise-

minación a nivel global, sería pertinente llevar a cabo una estrategia específica de vigilancia y control de los clones de alto riesgo.

## 7.2. MÉTODOS BASADOS EN EL CULTIVO

### 7.2.1. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

*P. aeruginosa* sobrevive en la mayoría de ambientes y temperaturas propias del entorno clínico y crece con facilidad en los medios de cultivo habituales, incluyendo los diferenciales para bacterias gramnegativas, como el agar MacConkey. También disponemos de medios con agentes selectivos (esencialmente con cetrimida) para favorecer el crecimiento de *P. aeruginosa* a partir de muestras clínicas que puedan contener microbiota mixta y muestras ambientales. El uso de medios que incluyan antimicrobianos como agentes selectivos estará guiado por los fines de los cultivos de vigilancia. La práctica totalidad de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* son resistentes a las concentraciones de cefotaxima (1-2 mg/L) que habitualmente se emplean en los medios selectivos de vigilancia microbiológica diseñados para el aislamiento de enterobacterias multirresistentes, por lo que su uso serviría para la detección de colonización por *P. aeruginosa* con independencia de si el correspondiente aislado es o no multirresistente. Los medios de cultivo deben incubarse en aerobiosis a 35°C durante 48 horas. Para el aislamiento específico de *P. aeruginosa* MDR/XDR deben utilizarse medios selectivos apropiados, generalmente utilizando también como base el agar MacConkey. Para su diseño deben considerarse dos posibles escenarios, la vigilancia genérica de *P. aeruginosa* MDR/XDR o el seguimiento de una cepa MDR/XDR concreta en el contexto de un brote o situación de endemidad. En el primer caso debemos elegir un antipseudomónico concreto lo más representativo posible del problema de la multirresistencia en *P. aeruginosa*. El más recomendado en este sentido es el meropenem (concentración 1-2 mg/L), básicamente por dos motivos: (i) la resistencia a este antibiótico se asocia muy frecuentemente con perfiles de multirresistencia y (ii) las carbapenemas son probablemente los antibióticos de mayor relevancia en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*. Para el seguimiento de cepas MDR/XDR concretas se seleccionará el o los antibióticos más apropiados de acuerdo al fenotipo. Estos pueden contener por ejemplo varias combinaciones de ceftazidima, meropenem, tobramicina o ciprofloxacino. Finalmente, la detección de cepas productoras de carbapenemasas o BLEE puede verse favorecida por la adición al medio selectivo de cloxacilina (500 mg/L). La cloxacilina, como

potente inhibidor de AmpC, inhibe la resistencia mutacional a beta-lactámicos, incluyendo la resistencia a ceftazidima por hiperproducción de AmpC y la resistencia a imipenem por pérdida de OprD + expresión inducible o desreprimida de AmpC. Por ello, el agar MacConkey suplementado con ceftazidima + cloxacilina o imipenem + cloxacilina puede aumentar la especificidad en la detección de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas, respectivamente, aunque ello iría acompañado de la no detección de cepas MDR/XDR por mecanismos de resistencia mutacionales.

### 7.2.2. Pruebas de confirmación y criterios para la interpretación de los resultados

Una vez documentado el crecimiento de *P. aeruginosa* (identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF o pruebas bioquímicas convencionales) en el medio selectivo correspondiente, será necesario realizar un antibiograma para definir los perfiles MDR, XDR o PDR, incluyendo la no sensibilidad (cepas con sensibilidad intermedia + cepas resistentes). Los antimicrobianos a estudiar siguiendo la recomendación de Magiorakos et al. se agrupan en las 8 siguientes clases: cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima y cefepime), penicilinas+ inhibidores de beta-lactamasas (ticarcilina+ clavulánico y piperacilina+ tazobactam), monobactámicos (aztreonam), carbapenemas antipseudomónicas (imipenem, meropenem y doripenem), aminoglicósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina), fluoroquinolonas antipseudomónicas (ciprofloxacino, levofloxacino), ácidos fosfónicos (fosfomicina) y polimixinas (colistina y polimixina B). No obstante, conviene tener en cuenta una serie de consideraciones. En nuestro país, como en el resto de Europa, deben utilizarse los puntos de corte de sensibilidad del EUCAST para definir las categorías clínicas. Debido a las importantes diferencias en los puntos de corte, la aplicación de criterios del CLSI produce importantes discrepancias en la prevalencia de MDR y XDR, generalmente más bajas que cuando se utilizan criterios EUCAST. En la práctica, la aplicación de puntos de corte EUCAST obliga a la no consideración del aztreonam en las definiciones MDR/XDR/PDR, ya que el punto de corte actual para este antibiótico ( $S \leq 1$  mg/L) considera que *P. aeruginosa* es, de forma intrínseca, no sensible a este antibiótico. Por tanto, el aztreonam no debería considerarse ya que las definiciones sólo hacen referencia a la resistencia adquirida. De igual forma, la inexistencia de puntos de corte específicos de fosfomicina para *P. aeruginosa* hacen recomendable la no consideración de este antibiótico en las definiciones. Otra recomendación particular es la no consideración de la gentamicina entre los amino-

glicósidos antipseudomónicos, por su menor actividad intrínseca. Finalmente, la evaluación de la ticarcilina-clavulánico, netilmicina, levofloxacino y polimixina B podría ser prescindible. Por el contrario, la evaluación de ceftazidima-avibactam y/o ceftolozano-tazobactam podría ser de gran utilidad para la inferencia de la presencia de beta-lactamasas adquiridas, además de su posible utilidad clínica en un futuro cercano. De hecho, uno de los mayores retos en el análisis de la resistencia en *P. aeruginosa* es la diferenciación entre resistencia cromosómica (OprD+ AmpC) y la mediada por beta-lactamasas transmisibles. En ocasiones el propio perfil de resistencia puede sugerir la presencia de estas beta-lactamasas; tal sería el caso por ejemplo de la resistencia a ceftazidima y sensibilidad a piperacilina-tazobactam como indicador de BLEE o la resistencia a todos los beta-lactámicos menos el aztreonam como indicador de MBL. No obstante, debido a diversos factores entre los que cabe destacar la frecuente presencia simultánea de múltiples mecanismos de resistencia, los fenotipos de resistencia ligados a beta-lactamasas transferibles no siempre son aparentes. Como se ha comentado anteriormente, la inhibición de la resistencia a beta-lactámicos por cloxacilina es un marcador sensible y específico de resistencia cromosómica (OprD+ AmpC) y por tanto se puede utilizar como ensayo de cribado en la detección de beta-lactamasas adquiridas, incluyendo BLEE y carbapenemasas. Existen varias aproximaciones en este sentido, incluyendo la utilización de discos de  $\beta$ -lactámicos con o sin cloxacilina (4000  $\mu$ g) o la evaluación de la sensibilidad en medio con o sin cloxacilina (500  $\mu$ g/ml). Una vez detectada la presencia de una beta-lactamasa adquirida se podrán realizar de una forma más dirigida los ensayos fenotípicos para BLEE (como por ejemplo la prueba de sinergia de doble disco, mejor en medio con cloxacilina) o carbapenemasas, incluyendo los ensayos de inhibición por EDTA o ácido dipicolínico para las MBL, el test de Hodge modificado (mejor utilizando la cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE ATCC 700603 en el caso de *P. aeruginosa*), o alguno de los métodos colorimétricos (como por ejemplo Carba NP o Rapid Carb screen) o la espectrometría de masas MALDI-TOF para la detección de actividad carbapenemasa.

### 7.2.3. Información de los resultados

Como se ha comentado, existen varios posibles niveles en la definición de los fenotipos de resistencia a múltiples antibióticos en *P. aeruginosa*. Como mínimo, debería informarse si la muestra es positiva o negativa para *P. aeruginosa* MDR. Idealmente, el análisis debe ir más allá y diferenciar, dentro de las MDR, las cepas que presentan perfiles XDR. De igual forma, en fun-

ción de las posibilidades de cada centro se debería informar de forma específica las cepas productoras de BLEE o carbapenemasas (o MBL en su caso).

## 7.3. MÉTODOS MOLECULARES

### 7.3.1. Tipos de métodos moleculares y selección

La principal limitación para la detección de la multi-resistencia en *P. aeruginosa* por técnicas moleculares es que frecuentemente está mediada por mutaciones cromosómicas que bien determinan la hiperproducción de AmpC, la inactivación de OprD, la hiperexpresión de alguna de las múltiples bombas de expulsión, o la modificación de la diana del antibiótico. Dado el extraordinario número de genes potencialmente implicados (muchos todavía desconocidos o poco estudiados), la única aproximación molecular razonable a la detección de los mecanismos de resistencia cromosómica sería la secuenciación del genoma completo del microorganismo. No obstante, si bien hemos avanzado bastante en los últimos años, aún estamos lejos de conseguir una aceptable correlación entre genotipo y fenotipo de resistencia principalmente debido a: i) la dificultad para predecir el resultado fenotípico de la interacción entre los múltiples mecanismos (y mutaciones) de resistencia frecuentemente presentes de forma simultánea, (ii) el conocimiento todavía incompleto de todos los genes potencialmente implicados en la resistencia mutacional y los fenotipos conferidos en cada caso y (iii) la frecuente dificultad para distinguir mutaciones relevantes de simples polimorfismos genéticos. No obstante, la propia detección de *P. aeruginosa* (independientemente del perfil de resistencia) en muestras clínicas mediante alguna de las múltiples técnicas moleculares disponibles, incluyendo PCR o diversos *arrays*, puede ser ya de por sí de utilidad, al menos desde el punto de vista terapéutico.

Por otro lado, las técnicas moleculares sí son de utilidad para la detección de mecanismos de resistencia transferibles como las BLEE o las carbapenemasas, tanto sobre muestra clínica directa como sobre colonias aisladas. Existen múltiples técnicas disponibles, muchas de ellas comerciales, incluyendo técnicas basadas en PCR (PCR convencional, PCR en tiempo real, multiplex, etc) o en microarrays, entre otras. No obstante, la mayoría de las técnicas disponibles para la detección de BLEE o carbapenemasas están optimizadas para enterobacterias pero no frente a *P. aeruginosa*, lo que posiblemente afecta a la eficiencia de la técnica y determina que la selección de las dianas genéticas seleccionadas no sean las más adecuadas

para *P. aeruginosa*. Este hecho afecta especialmente a las BLEE, ya que las más frecuentes en *P. aeruginosa* (OXA, PER, GES, VEB, etc.) no suelen incluirse en los protocolos diseñados para enterobacterias. Esto también ocurre en menor medida para las carbapenemasas, si bien las más frecuentes en *P. aeruginosa* en nuestro medio (VIM) suelen estar incluidas. Como se ha comentado en apartados anteriores, la identificación molecular de BLEE o carbapenemasas sobre colonia, idealmente debe estar precedida por una buena caracterización fenotípica.

Finalmente, otra aproximación molecular a la detección de la multiresistencia en *P. aeruginosa* actualmente en vías de desarrollo es la detección directa de los principales clones MDR de alto riesgo circulantes.

### 7.3.2. Criterios para la interpretación e información de los resultados

La detección de los genes de resistencia directamente sobre las muestras clínicas generalmente no permite distinguir la especie implicada, incluso aunque se acompañen de la detección molecular simultánea de los patógenos correspondientes. Por tanto, cuando se analizan muestras clínicas hablaremos de presencia o ausencia de genes resistencia más que de su asociación con patógenos concretos. La detección de los genes correspondientes sobre colonias aisladas si nos permitirá identificar el microorganismo productor.

Cuando se analizan muestras clínicas directas el resultado a informar será si la muestra es positiva o no para el gen o los genes analizados: “Mediante [método empleado] se detecta la presencia de un gen codificante de [tipo de BLEE o carbapenemasa]”. Cuando la técnica molecular se haya aplicado sobre colonias aisladas se informará el microorganismo correspondiente: “Se aisló *P. aeruginosa* productora de [tipo de BLEE o carbapenemasa]”. El grado de concreción en el mecanismo detectado dependerá de la técnica utilizada. Por ejemplo, existen PCR genéricas para carbapenemasas tipo VIM u otras más específicas para carbapenemasas tipo VIM-1 o tipo VIM-2. En cualquier caso, la identificación inequívoca de las beta-lactamasas concretas requiere la secuenciación completa del gen correspondiente.

La ausencia de detección se informará como: “Mediante [método empleado] no se detecta la presencia de genes codificantes de [tipo de BLEE, AmpC-p o carbapenemasa]”. Por ejemplo, “Mediante PCR simple no se detecta la presencia de genes codificantes de carbapenemasas del tipo VIM”.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta J, Merino M, Viedma E, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011;17: 1064-1067.
2. Barsoumian A, Calvano T, Markelz AE, et al. Variations of CHROMagar *Acinetobacter* to detect imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Scan J Infect Dis*. 2013; 45: 446-452.
3. Bou G, Vila J, Seral C, et al. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32 (Suppl 4): 24-32.
4. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; 19: 419-426.
5. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6349-6357.
6. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:1906-1911.
7. Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, et al. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC*, nº38, 2011. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
8. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 413-431.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fourth Informational Supplement CLSI document M100-S24. 2014.
10. De Angelis G, Cataldo MA, De Ware C, et al. Infection Control and prevention measures to reduce the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1185-1192.
11. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas spp.* *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3773-3776.
12. Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, et al. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC*, nº26, 2007. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
13. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. Available in:



- [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
14. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, et al. [Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 267-271.
  15. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, et al. Actividad de 18 agentes antimicrobianos frente a aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*: segundo estudio nacional multicéntrico (proyecto GEIH-REIPI-Ab 2010). *Enferm Infecc Microb Clin* 2013; 31: 4-9.
  16. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, et al. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3846-3848.
  17. Glick SB, Samson DJ, Huang ES, et al. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparative effectiveness review. *Am J Infect Control* 2014; 42: 148-155.
  18. Guerrero-Gómez C, Sánchez-Carrillo C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. Procedimiento de Microbiología Clínica de la SEIMC, nº1a, 2003. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
  19. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, et al. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34: 1467-1474.
  20. Hsueh PR, Kuo LC, Chang TC, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *J Clin Microb* 2014; 52: 3095-3100.
  21. Juan Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28 (Suppl 1):19-28.
  22. Kishii K, Kikuchi K, Matsuda N, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for species identification of *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures. *Clin Microb Infect* 2013; 20: 424-243.
  23. Köck R, Becker K, Cookson B, et al. Systematic literatura analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill* 2014; 19 (29): pii=20860.
  24. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 582-610.
  25. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan-drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268-281.
  26. Malhotra-Kumar S, Cortinas J, Sabiiti W, et al. Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1040-1046.
  27. Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Michiels M, et al. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1577-1587.
  28. Malhotra-Kumar S, van Heirstraeten L, Lee A, et al. Evaluation of molecular assays for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4598-4601.
  29. McConnell MJ, Pérez-Ordoñez A, Pérez-Romero P, et al. Quantitative real-time PCR for detection of *Acinetobacter baumannii* colonization in the hospital environment. *J Clin Microb* 2012; 50: 1412-1414.
  30. McConnell MJ, Pérez-Romero P, Lepe JA, Pérez-Ordoñez A, Valencia R, Vázquez-Barba I, Pachón J. Positive predictive value of Leeds *Acinetobacter* medium for environmental surveillance of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microb* 2011; 49: 4416.
  31. Merino M, Poza M, Roca I, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist*. 2014; 20: 259-263.
  32. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 5527-5535.
  33. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 432-438.
  34. Oteo J, Alcaraz R, Bou G, et al. Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among patients admitted to ICUs in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2015;70: 2916-2918.
  35. Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32 Suppl 4:17-23.
  36. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain: High in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 3406-3412.
  37. Patel PA, Robicsek A, Grayes A, et al. Evaluation of multiple real-time PCR tests on nasal samples in a large MRSA surveillance program. *Am J Clin Pathol* 2015; 143: 652-658.
  38. Paterson GV, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 2014; 22: 42-47.
  39. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, et al. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de con-

- senso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enferm Inf Microbiol Clin* 2008; 26: 285-298.
40. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, et al. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 827-830.
  41. Smyth RW, Kahlmeter G. Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3797-3799.
  42. Suwantararat N, Roberts A, Prestridge J, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4039-4042.
  43. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 682-707.
  44. Van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLOS ONE*; DOI: 10.1371: 1-13.
  45. Villar M, Cano ME, Gato E, et al. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. *Medicine (Baltimore)* 2014; 93: 202-210.
  46. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 736-755.





Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en muestras de pacientes recogidas para realizar vigilancia microbiológica del estado de portador. Se describen los tipos de muestras y su procesamiento en el laboratorio. El protocolo que se desarrolla a continuación se refiere a *S. aureus* que contiene el gen *mec*. Por otra parte, este documento no se refiere al aislamiento de SARM en muestras clínicas para establecer un diagnóstico etiológico.

## 2. FUNDAMENTO

*S. aureus* es un microorganismo que coloniza habitualmente a los humanos. Sin embargo, puede comportarse como un patógeno y causar una gran variedad de infecciones. El principal mecanismo de resistencia es la producción de una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), codificada por el gen *mecA*, que presenta baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, a excepción de una nueva clase de cefalosporinas como es la ceftarolina. En el año 2011 se describió un gen homólogo de *mecA* denominado *mecC*. Se han aislado cepas de SARM con *mecC* en humanos y en una gran variedad de animales. La colonización por SARM es un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones en los hospitales y, en general, en el ámbito de la asistencia sanitaria. Los pacientes ingresados en el hospital pueden ser la fuente de transmisión a otros pacientes, con frecuencia a través de las manos del personal sanitario. Las infecciones por SARM producen una mayor morbilidad y mortalidad que las producidas por cepas sensibles a meticilina. Por estos motivos, la vigilancia microbiológica de la colonización por SARM es un componente importante en los programas de control de la infección hospitalaria. El cultivo es el método más utilizado para detectar la colonización por SARM.

Existen diferentes aproximaciones para la detección de colonización por SARM i) la utilización de técnicas basadas en el cultivo en medios selectivos y diferenciales, ii) la utilización de técnicas rápidas moleculares capaces de detectar la presencia del gen *mec*. La elección del método de detección dependerá en gran parte de las características epidemiológicas de cada hospital, y deberá ser establecida dentro del programa para el control de este tipo de microorganismos.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Morosini MI (Coordinadora). Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 39. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>.
4. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, December 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
5. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 5.0 válido desde 2015-01-01.
6. Documentos de instrucciones correspondientes a aquellos sistemas comerciales fenotípicos o genotípicos que se utilicen.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

## 4. MUESTRAS

### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia microbiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su “Procedimiento de Microbiología Clínica nº 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología.”

Las muestras adecuadas para cultivo son las siguientes:

- Exudado nasal (vestíbulo nasal): es la muestra más adecuada si se elige una única muestra para realizar cultivos de vigilancia.
- Si se utilizan varias muestras, la combinación de torunda nasal, faríngea, y rectal/perineal es la que tiene mayor sensibilidad para detectar colonización por SARM.
- En circunstancias clínicas especiales (unidades clínicas de alto riesgo, pacientes con determinados factores de riesgo, etc.), que deberían ser definidas en el programa de control de la infección hospitalaria, puede ser útil añadir el estudio de otras muestras (respiratorias, exudados de úlceras, orinas, etc.) para la detección de colonización por SARM.
- Toma de exudado nasal:
  - Introducir la torunda impregnada en solución salina estéril primero en una coana y después en la contralateral, realizando movimientos rotatorios a lo largo del tabique nasal. Se puede emplear la misma torunda para ambas fosas nasales. Se pueden utilizar torundas con una punta cubierta con fibras de nylon en combinación con un medio líquido de transporte (ESwab).
  - Se recomienda torunda con medio de transporte. Se puede conservar durante un tiempo inferior o igual a 24 horas a temperatura ambiente o en nevera entre 2-8°C.
  - Las muestras para cribado de SARM deben ir acompañadas de un volante/petición electrónica en el que deberá constar que se solicita un estudio de vigilancia microbiológica de SARM, además de incluir los datos de filiación del paciente, tipo de muestra, servicio de procedencia y código del clínico que realiza la petición.

### 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

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

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

- Agar manitol-sal. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente.
- Agar manitol-sal con cefoxitina (4 mg/L) o medio MRSA (*methicillin-resistant screening agar*). Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente.
- Agar cromogénico. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad del fabricante. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- Medio líquido de enriquecimiento (Mueller-Hinton o triptona soja) suplementado con cloruro sódico. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad. Este medio es opcional y se puede utilizar previo a la inoculación en placas.

Los medios preparados en el laboratorio se almacenarán a 2-8°C durante no más de 7-10 días

## 5.2. REACTIVOS COMPLEMENTARIOS PARA CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA

- Colorantes para tinción de Gram.
- Peróxido de hidrógeno.
- Reactivos para la realización de la prueba de la coagulasa y/o aglutinación con látex.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF).
- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos.
- Reactivos para la detección de PBP2a mediante aglutinación con látex.
- Ensayo molecular (PCR) para la detección del gen *mecA*, o en su caso del gen *mecC*.

## 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN *mec*

La necesidad de obtener un resultado rápido en los estudios de vigilancia de SARM ha favorecido el desarrollo de pruebas moleculares para su detección en muestras clínicas. Existen diferentes métodos comerciales que permiten la detección del gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus*. Recientemente, se han desarrollado métodos comerciales que incluyen la detección del gen *mecC*.

Los métodos comerciales que han sido aprobados para uso diagnóstico han sido validados principalmente en muestras nasales. La detección molecular también puede hacerse directamente sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, serviría como confirmación de la detección fenotípica. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

#### Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrómetro de masas (MALDI-TOFF).
- Congelador (-20°C).

#### Nivel molecular:

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

## 6.2. MATERIAL

### Nivel fenotípico:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

### Nivel molecular:

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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

## 7. PROCEDIMIENTO

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso.
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular los medios correspondientes adecuados para la búsqueda de SARM con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias.
6. Incubar las placas inoculadas en estufa, a 35-37°C.

### 7.2. EXAMEN DE LAS PLACAS DE CULTIVO

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

En caso de haber utilizado un medio líquido de enriquecimiento, se realizará un subcultivo en los medios selectivos (agar cromogénico, MRSA agar, etc.) y estos se incubarán 18-24 horas a 35-37°C.

### 7.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *S. aureus*

#### 7.3.1. Agar manitol-sal:

A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos de agar manitol-sal. Cualquier colonia manitol positiva (color amarillo) será sospechosa de *S. aureus*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

### 7.3.2. Agar MRSA o agar manitol-sal con cefoxitina:

Se puede combinar la utilización de este medio selectivo (con antibiótico) con otro medio sin antibiótico como agar sangre o agar manitol-sal. La utilización de agar sangre puede ser útil como control de crecimiento en muestras no estériles (nasales).

A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos. Cualquier colonia amarilla en el agar MRSA o en el agar manitol-sal-cefoxitina será sospechosa de SARM.

### 7.3.3. Agar cromogénico:

Se puede combinar la utilización de un agar cromogénico con otro medio no selectivo como agar sangre. La utilización de agar sangre puede ser útil como control de crecimiento en muestras no estériles (nasales).

A las 24 y 48 horas se realizará la lectura de los cultivos. Dependiendo de la casa comercial que haya suministrado el medio de cultivo, cualquier microorganismo con una coloración compatible con lo especificado por el fabricante se identificará como SARM.

Independientemente del medio de cultivo utilizado, la identificación se confirmará mediante alguno de los métodos rápidos disponibles en el laboratorio. La confirmación de la resistencia a la meticilina se realizará a partir de un medio no selectivo mediante el método de difusión en agar Mueller-Hinton con un disco de cefoxitina (30 µg) (resistencia < 22 mm). La resistencia a la meticilina se puede detectar de forma rápida mediante una prueba de aglutinación con látex que detecta PBP2a o mediante PCR para detección del gen *mec*.

También se pueden realizar pruebas de sensibilidad a otros antimicrobianos (mupirocina, ácido fusídico, etc.), y también conservar las cepas para posteriores estudios de tipificación molecular.

## 7.4 DETECCIÓN DE SARM MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

Aunque existen diferencias importantes de procedimiento entre los métodos comerciales, en general la realización de las técnicas es cada vez más sencilla. Algunos de estos métodos únicamente requieren la dispensación de la muestra, e incluso están totalmente automatizados. En otros casos el procedimiento requiere una primera fase de extracción y purificación del ADN, y a continuación una segunda fase de amplificación y detección de las dianas específicas.

El protocolo se realizará según las instrucciones del fabricante, que siempre incluirá controles de amplificación y controles positivo y negativo.

## 7.5. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como para las genotípicas se deben utilizar controles adecuados como pueden ser:

- S. aureus* ATCC 29213 sensible a meticilina.
- S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina portador de *mecA*.
- S. aureus* NCTC 13552 resistente a meticilina portador de *mecC*.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 DETECCIÓN DE SARM BASADA EN EL CULTIVO

Dependiendo de la estrategia de cultivo utilizada:

- Si a las 48 horas no hay colonias compatibles con SARM, se informará: “No se aísla *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina” (SARM negativo).
- En caso de detectarse un microorganismo compatible con SARM, se informará: “Se aísla *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina” (SARM positivo). En estos casos se podrá complementar esta información con el resultado de la sensibilidad o resistencia a mupirocina.

### 8.2 DETECCIÓN DE SARM EN MUESTRAS NASALES BASADA EN MÉTODOS MOLECULARES

En general, los resultados obtenidos con las pruebas moleculares deberán informarse como:

- “Se detecta ADN de SARM (SARM positivo)”. Se interpreta como colonización nasal por SARM.
- “No se detecta ADN de SARM (SARM negativo)”. Se descarta la colonización nasal por SARM.
- “Resultado indeterminado o no válido”. Esto puede ocurrir por algún fallo en el procedimiento técnico, y habitualmente el programa informático de interpretación de los resultados indica el tipo de error. Se requiere nueva muestra.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los métodos moleculares para la detección de SARM en muestras nasales tienen en general una alta sensibilidad y un alto valor predictivo negativo. En lugares con baja prevalencia de SARM los resultados negativos son útiles para descartar SARM. Los resultados positivos requerirían confirmación mediante cultivo. En lugares con alta prevalencia de colonización por SARM, estos métodos podrían ser utilizados como prueba definitiva para identificar portadores de SARM.

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

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en muestras de vigilancia	PNT-MMV-1	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

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

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

Existen cepas de *S. aureus* manitol-negativo que pueden dar resultados falsos negativos en los medios que contienen manitol. También existen variantes de colonia pequeña de *S. aureus* que eventualmente pueden no detectarse, e incluso cuando se detectan y se realizan pruebas de sensibilidad a la cefoxitina esta puede ser interpretada erróneamente como sensible debido a la dificultad en el crecimiento de estas colonias.

No todas las técnicas moleculares pueden detectar la presencia del gen *mecC*.

No todas las técnicas moleculares pueden diferenciar si el gen *mec* se encuentra en un *S. aureus* o un estafilococo coagulasa negativo.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Glick SB, Samson DJ, Huang ES, et al. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparative effectiveness review. *Am J Infect Control* 2014; 42:148-155.
2. Harbarth S, Hawkey PM, Tenover F, et al. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Intern J Antimicrob Agents* 2011; 37:110-117.
3. Köck R, Becker K, Cookson B, et al. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit health-care-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill* 2014; 19 (29):pii=20860.
4. Marimuthu K, Harbarth S. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*...all doors closed?. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27:356-362.
5. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, et al. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enferm Inf Microbiol Clin* 2008; 26:285-298.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la recogida de muestras clínicas y ambientales y su procesamiento en el laboratorio para la detección de *Enterococcus* spp. resistente a glucopéptidos (ERG), junto con la interpretación de los cultivos y emisión de los resultados. Las especies de *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis* con resistencia a vancomicina (CMI >4 mg/L) son las de mayor interés epidemiológico y requieren vigilancia microbiológica.

## 2. FUNDAMENTO

Los enterococos forman parte de la microbiota de humanos y animales. Aunque se han descrito más de 20 especies, *Enterococcus faecalis* (~80-90%) y *Enterococcus faecium* (~5-10%) son las especies que causan la mayoría de las infecciones en humanos. La emergencia de ERG como problema terapéutico fue inicialmente documentada en la década de 1980 en Inglaterra, Francia y Estados Unidos (EE.UU.). Desde entonces, el aislamiento de ERG ha sido una constante en diversas zonas geográficas del mundo. En nuestro medio, aunque el porcentaje de infecciones por ERG es muy bajo, con cierta frecuencia se describe la aparición de brotes hospitalarios. Debido a su importancia epidemiológica es esencial que el laboratorio de microbiología lleve a cabo una vigilancia continua de la resistencia a glucopéptidos en los enterococos aislados de muestras clínicas. La realización de cultivos de vigilancia microbiológica de ERG ha demostrado su utilidad en el estudio de brotes hospitalarios y se considera una herramienta esencial en los programas de control y prevención de la infección nosocomial por este microorganismo. La utilización de los cultivos de vigilancia en otras situaciones dependerá de las características epidemiológicas de cada hospital (prevalencia de ERG, tipo de pacientes, etc.), y debería ser establecida dentro del programa para el control de este tipo de microorganismos.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Ezpeleta-Baquedano C (Coordinadora). Barrios Andrés J.L, Delgado-Iribarren A, Ezpeleta-Baquedano C. Control microbiológico ambiental. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 42. SEIMC 2012. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia42.pdf>.
4. Morosini MI (Coordinadora). Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 39. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia39.pdf>.
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, Diciembre 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
6. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 5.0 válido desde 2015-01-01.
7. Documentos de instrucciones correspondientes a aquellos sistemas comerciales fenotípicos o genotípicos que se utilicen.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

## 4. MUESTRAS

### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia microbiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su “Procedimiento de Microbiología Clínica n° 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología.”

Las muestras adecuadas para el cultivo incluyen:

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

Estudio de contaminación ambiental: en determinadas circunstancias se analizarán muestras procedentes de las superficies próximas al paciente y del instrumental médico en contacto con él. En este caso el procesamiento de las muestras se realizará según recomendaciones generales de la SEIMC en su “Procedimiento de Microbiología Clínica n° 42: Control microbiológico ambiental.”

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

### 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

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

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

Los medios más frecuentemente utilizados son los selectivos y diferenciales que permiten la detección rápida de ERG a partir de muestras altamente contaminadas.

#### 5.1.1. Medios no selectivos.

- Agar sangre.
- Caldo BHI.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

### 5.1.2. Medios de cultivo selectivos.

- Agar Enterococcosel® suplementado con 8 mg/L de vancomicina (comercializado por BD).
- Agar BHI con 6 mg/L de vancomicina (generalmente se prepara en el laboratorio). Almacenar a 2-8°C durante no más de 7-10 días.
- Agar cromogénico. Existen placas de cultivo ya preparadas comercialmente: ChromID VRE (bioMérieux), CHROMagar VRE (BD Diagnostics), VRESelect (Bio-Rad), y Spectra VRE (Remel).

Almacenar los medios de cultivo a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad del fabricante.

## 5.2. REACTIVOS COMPLEMENTARIOS PARA CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA

- Colorantes para tinción de Gram.
- Peróxido de hidrógeno.
- Reactivos para la realización de las pruebas de PYR y LAP.
- Medios para estudio de movilidad y fermentación de azúcares (xilosa, arabinosa) y piruvato.
- Matriz y calibradores para equipo de espectrometría de masas (MALDI-TOFF).
- Sustancia valorada de vancomicina.
- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos.
- Ensayo molecular (PCR) para la detección de los genes *vanA* y *vanB*.

### 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES *vanA* y *vanB*.

La necesidad de obtener un resultado rápido en los estudios de vigilancia de ERG ha favorecido el desarrollo de pruebas moleculares para su detección en muestras clínicas. Los métodos comerciales que se han desarrollado [BD GeneOhm VanR (BD Diagnostics, aprobado por el FDA), LC *vanA/vanB* detection assay (Roche Diagnostics, uso en investigación), y Xpert *vanA/vanB* (Cepheid, uso en investigación)] tienen como dianas moleculares los genes *vanA* y *vanB*.

La detección molecular puede hacerse directamente sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, serviría como confirmación del mecanismo de resistencia, o directamente en muestras rectales/perianales.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrómetro de masas (MALDI-TOFF).
- Congelador (-20°C).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los gluco péptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

**Nivel molecular:**

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.
- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

**6.2. MATERIAL****Nivel fenotípico:**

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

**Nivel molecular:**

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso.
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular los medios correspondientes adecuados (agar Enterococcosel con vancomicina o en un agar cromogénico) para la búsqueda de ERG con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias.
6. Incubar las placas inoculadas en estufa, a 35-37°C.

Las muestras ambientales recogidas en medio de cultivo líquido (BHI) se incubarán aeróbicamente a 35°C durante 18-24 h. Tras este periodo de incubación serán subcultivadas en el medio selectivo (agar Enterococcosel o agar cromogénico) e incubadas de nuevo en las mismas condiciones.

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los gluco péptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

## 7.2. EXAMEN DE LAS PLACAS DE CULTIVO

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

En el caso de los medios cromogénicos, dependiendo de la casa comercial que haya suministrado el medio de cultivo, cualquier microorganismo con una coloración compatible con lo especificado por el fabricante se identificará como ERG. No obstante, debido a la existencia de resultados falsos positivos se recomienda confirmar la identificación

## 7.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE ERG

La identificación se confirmará mediante alguno de los métodos disponibles en el laboratorio. Se realizará una tinción de Gram y una prueba de catalasa a las colonias que presenten morfología sugerente de enterococos para confirmar la presencia de cocos grampositivos catalasa negativo. A partir del crecimiento en agar sangre se realizarán las pruebas de detección de pirrolidónil beta-naftilamida (PYR) y leucina- aminopeptidasa (LAP) disponibles en forma de discos rápidos. Estas dos pruebas permiten diferenciar a los enterococos de otros cocos grampositivos resistentes a vancomicina. La identificación a nivel de especie se realizará mediante las pruebas de movilidad, pigmentación y fermentación de azúcares

Si el laboratorio dispone de un espectrómetro de masas (MALDI-TOFF), éste se podrá utilizar para confirmar la identificación.

Se recomienda confirmar la resistencia a gluco péptidos (vancomicina y teicoplanina) mediante un método que determine la CMI, un método de difusión disco-placa (aunque este es el menos recomendable), o el uso de una placa de agar BHI suplementada con 6 mg/L de vancomicina (EUCAST). Se recomienda incubar a 35°C en aerobiosis durante 24 h. Los rangos habituales de valores de CMI para los aislamientos de ERG según los fenotipos de mayor relevancia clínica y epidemiológica se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Rangos habituales de valores de CMI para los aislamientos de ERG según los fenotipos de mayor relevancia clínica y epidemiológica.**

Gluco péptido	CMI (mg/L)	
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
Vancomicina	64-1024	4-1024
Teicoplanina	8-512	0,06-1

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

## 7.4 DETECCIÓN DE ERG MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Respecto a los aspectos técnicos, aunque existen diferencias importantes de procedimiento entre los métodos comerciales, en general la realización de las técnicas es cada vez más sencilla. Algunos de estos métodos únicamente requieren la dispensación de la muestra, e incluso están totalmente automatizados. En otros casos el procedimiento requiere una primera fase de extracción y purificación del ADN, y a continuación una segunda fase de amplificación y detección de las dianas específicas.

El protocolo se realizará según las instrucciones del fabricante, que siempre incluirá controles de amplificación y controles positivo y negativo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los glucopéptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

## 7.5. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como genotípicas se deben utilizar controles adecuados como pueden ser:

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, control negativo sensible a vancomicina.

*Enterococcus faecalis* ATCC 51299, control positivo resistente a vancomicina portador del gen *vanB*.

*Enterococcus faecium* NCTC 12202, control positivo resistente a vancomicina portador del gen *vanA*.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 DETECCIÓN DE ERG BASADA EN EL CULTIVO

- Si el cultivo es positivo para ERG se informará como “Se aísla *Enterococcus* [indicar la especie] resistente a los glucopéptidos”
- Si el cultivo es negativo para ERG se informará como “No se aísla *Enterococcus faecalis/faecium* resistente a los glucopéptidos”.

### 8.2 DETECCIÓN DE ERG EN MUESTRAS RECTALES/PERIANALES BASADO EN MÉTODOS MOLECULARES

En caso de realizar alguno de estos ensayos moleculares, la información de resultados es la siguiente:

1. “Se detecta el gen *vanA*, *vanB*, o ambos. Se requiere cultivo para confirmar los resultados.”
2. “No se detectan los genes *vanA* / *vanB*. Se requiere cultivo para confirmar los resultados.”
3. “Resultado indeterminado o no válido.” Esto puede ocurrir por algún fallo en el procedimiento técnico, y habitualmente el programa informático de interpretación de los resultados indica el tipo de error. Se requiere nueva muestra.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Dependiendo de la estrategia de cribado utilizada en el hospital, y de la urgencia o no en detectar el estado de portador de ERG, se puede realizar una prueba rápida molecular (PCR) en la muestra clínica para detectar o descartar el estado de portador. En general, estas técnicas tienen una limitada sensibilidad y especificidad. Las muestras deberían también ser procesadas por los métodos de cultivo habituales utilizados en el laboratorio.

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Enterococcus</i> spp. resistente a los gluco péptidos en muestras de vigilancia	PNT-MMV-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

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

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En los medios de cultivo selectivos pueden crecer otros microorganismos resistentes a vancomicina, incluyendo *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. Entre los microorganismos que dan resultados falsos positivos en los medios cromogénicos se encuentran otras especies de enterococos, *Streptococcus* spp., algunos bacilos gramnegativos, y *Candida* spp.

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

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

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

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

Existen pocos estudios que hayan evaluado la utilidad de las pruebas moleculares en la detección de ERG en muestras de vigilancia, pero en general muestran una limitada sensibilidad y sobre todo una baja especificidad. Esta baja especificidad se debe a la presencia del gen *vanB* en otras especies bacterianas diferentes a enterococo que puede ser detectado por estos métodos, lo cual resulta en una sobreestimación de la tasa de ERG.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. De Angelis G, Cataldo MA, De Ware C, et al. Infection Control and prevention measures to reduce the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1185-1192.
2. Gazin M, Lammens C, Goossens H. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert vanA/vanB molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:273-276.
3. Suwantarat N, Roberts A, Prestridge J, et al. Comparison of five chromogenic media for recovery of vancomycin-resistant enterococci from fecal samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52:4039-4042.
4. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, et al. Low vancomycin MICs and fecal densities reduce the sensitivity of screening methods for vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2829-2833.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias pro- ductoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmí- dicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 12

## PNT-MMV-03

# Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta- lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia

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 Respon-  
sable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC plasmídicas (AmpC-p) en muestras de vigilancia microbiológica.

Mientras que la vigilancia de la colonización por enterobacterias productoras de BLEE debe abarcar cualquier especie de enterobacteria, la vigilancia de la producción de AmpC-p debería restringirse a aquellas enterobacterias que han demostrado un importante potencial epidémico en la diseminación de AmpC-p y que no poseen beta-lactamasas cromosómicas de tipo AmpC. Por tanto, en general se recomienda la vigilancia de AmpC-p en *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, aunque siempre adaptada a la situación epidemiológica de cada centro.

El alcance de este documento tiene dos niveles en función de si la detección de las enterobacterias productoras de estas beta-lactamasas se realiza a nivel fenotípico o a nivel molecular.

## 2. FUNDAMENTO

La aparición y diseminación de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de amplio espectro en la última década, principalmente debida a las BLEE, se ha convertido en una de las principales amenazas para el tratamiento antibiótico de las infecciones producidas por estas bacterias. Los primeros casos de BLEE en enterobacterias descritos en *Klebsiella* spp. o *Enterobacter* spp. productoras de enzimas derivadas de TEM y SHV, se limitaban casi exclusivamente a centros hospitalarios donde ocasionalmente generaban importantes brotes. A finales del siglo XX, importantes cambios epidemiológicos facilitaron la amplia diseminación de las BLEE: 1) *Escherichia coli* se convirtió en la principal especie portadora de BLEE lo que generó el aumento de las infecciones adquiridas en la comunidad, principalmente infecciones del tracto urinario, producidas por estas cepas; y 2) la aparición de una nueva familia de BLEE, las CTX-M, muy diferente a las previas derivadas de TEM o SHV, y cuyo origen se atribuye a genes cromosómicos propios de especies ambientales del género *Kluyvera*.

En España, las BLEE, sobre todo del tipo CTX-M-15 y SHV-12, se han extendido rápidamente en *E. coli* y *K. pneumoniae* alcanzando prevalencias globales de alrededor del 15% en ambas especies. Según datos de la red de Vigilancia Europea de la Resistencia a Antibióticos EARS-Net, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en aislamientos de sangre de *E. coli* aumentó en España del 0,5% en 2001 al 13,9% en 2013. En la actualidad se han detectado brotes de *K. pneumoniae* productora de BLEE en la mayoría de las regiones españolas.

Aunque con una prevalencia inferior a las BLEE, las AmpC-p están emergiendo como una amenaza adicional a la actividad de las cefalosporinas de amplio espectro en muchas regiones. Las principales tipos de AmpC-p son CIT y DHA que afectan a algunas de las familias de enterobacterias más comunes como son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*. Especialmente *K. pneumoniae* productora de AmpC-p se ha asociado a brotes nosocomiales en pacientes con factores de riesgo en los que se ha descrito una alta morbi-mortalidad.

La frecuente asociación de producción de BLEE, y/o AmpC-p, con resistencia a otros antibióticos como fluoroquinolonas y aminoglucósidos ha reducido el abanico terapéutico convirtiendo a los antibióticos carbapenémicos en el tratamiento de primera opción en las infecciones graves por estas bacterias.

La realización de estudios de vigilancia de enterobacterias productoras de BLEE y AmpC-p ha demostrado su utilidad en el estudio de brotes hospitalarios y se considera una herramienta esencial en los programas de control y prevención de la infección nosocomial por estos microorganismos.

Existen diferentes aproximaciones para la detección de colonización por enterobacterias productoras de BLEE y AmpC-p: i) la utilización de técnicas basadas en el cultivo en medios selectivos y diferenciales, y posterior con-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

firmación/caracterización del mecanismo por métodos fenotípicos, moleculares o espectrometría de masas; ii) la utilización de técnicas rápidas moleculares capaces de detectar genes codificadores de carbapenemasas. La elección de unas u otras dependerá en gran parte de las características epidemiológicas de cada hospital (prevalencia del patógeno, tipo de pacientes, etc.), y deberá ser establecida dentro del programa para el control de este tipo de microorganismos.

### 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 38. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. M100-S24, CLSI, Wayne, PA.
5. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
6. Prospectos de instrucciones correspondientes a aquellos sistemas comerciales fenotípicos o genotípicos que se utilicen.

### 4. MUESTRAS

#### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia microbiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su "Procedimiento de Microbiología Clínica n° 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología."

Las muestras más adecuadas para determinar el estado de portador de enterobacterias productoras de BLEE/AmpC-p son el frotis rectal y las heces. Para el frotis rectal la muestra se obtendrá introduciendo una torunda por el esfínter anal. Es de especial importancia que se recoja suficiente materia fecal en la torunda. Se utilizará un medio de transporte que impida su desecación (Amies o Stuart)

Para la recogida de heces, se enviará una pequeña cantidad de éstas en un recipiente estéril de boca ancha sin conservantes.

Se recomienda procesar la muestra con la mayor celeridad posible en un tiempo inferior a 24 horas; si no se va a procesar de manera inmediata es recomendable su conservación a 2-8°C para facilitar la recuperación de la bacteria a vigilar evitando el sobrecrecimiento de la microbiota comensal.

Las muestras para cribado de enterobacterias productoras de BLEE/AmpC-p deben ir acompañadas de un volante de petición perfectamente cumplimentado en el que deberá constar que se solicita un cultivo de vigilancia. Además debe incluir los datos de filiación del paciente, tipo de muestra, servicio de procedencia y código del clínico que realiza la petición.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

## 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

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

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

- Agar MacConkey suplementado con cefotaxima (1 mg/L) y agar MacConkey suplementado con ceftazidima (1 mg/L). Almacenar a 2-8°C durante no más de 7-10 días.
- Medios cromogénicos comerciales que permitan la detección de BLEE. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad.

### 5.2. CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BLEE Y AMPC-P

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos. Muchos de ellos incluyen pocillos con cefotaxima/ácido clavulánico y ceftazidima/ácido clavulánico.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrofotometría de masas (MALDI-TOFF).

Reactivos para caracterización fenotípica de BLEE y AmpC-p:

- Placas de agar Müller-Hinton.
- Agua desionizada estéril.
- Cloxacilina u oxacilina.
- Ácido fenil-borónico.
- Agua desionizada estéril.
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>).
- Tubos con agua destilada esteril.
- Agar Mueller-Hinton en placas.
- Discos de antibióticos: cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (30/10 µg), ceftazidima/ácido clavulánico (30/10 µg), cefotaxima/ácido fenil borónico (30/400 µg), cefotaxima/cloxacilina (30/500 µg), ceftazidima/ácido fenil borónico (30/400 µg), ceftazidima/cloxacilina (30/500 µg), cefotaxima/ácido clavulánico/ácido fenil borónico (30/10/400 µg), imipenem (10 µg), cefoxitina (30 µg).
- Tiras comerciales para el estudio de CMI por la técnica de difusión en gradiente con los siguientes antibióticos: cefotaxima-cefotaxima/ácido clavulánico, ceftazidima-ceftazidima/ácido clavulánico, cefepima-cefepima/ácido clavulánico.

### 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE BLEE Y AMPC-P

La detección molecular de los genes codificadores de BLEE y AmpC-p puede hacerse directamente sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, serviría como confirmación de la detección fenotípica, o sobre muestra (frotis rectal o heces).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 12

Existen diferentes sistemas comerciales basados principalmente, pero no sólo, en PCR a tiempo real. Se usará cualquiera de ellos que permita la detección y caracterización de los principales grupos/familias de BLEEs (grupo de la CTX-M-1, que incluye además la CTX-M-15 entre otras; grupo de la CTX-M-9, que incluye además la CTX-M-14, entre otras; y la SHV, que incluye la SHV-2 y SHV-12, entre otras) o de AmpC-p (CIT, DHA, EBC, MOX, FOX y ACC). Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

## 5.4. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como genotípicas se deben utilizar controles adecuados. Para las pruebas fenotípicas se pueden utilizar:

- K. pneumoniae* ATCC 700703 productora de la BLEE SHV-18.
- E. coli* TG22 productora de CMY-2 (cepa del Control de Calidad SEIMC)
- E. coli* CCUG 62975 productor de una BLEE del grupo de la CTX-M-1 y de una AmpC-p del grupo CMY.
- E. coli* ATCC 25922 como control negativo.

Para las pruebas genotípicas de deberán utilizar controles apropiados en los que se haya demostrado previamente mediante secuenciación la presencia de los genes que codifican las BLEE y/o las AmpC-p probadas.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

#### Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrómetro de masas (MALDI-TOFF).
- Congelador (-20°C).

#### Nivel molecular:

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.
- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

## 6.2. MATERIAL

### Nivel fenotípico:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Discos blancos.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

### Nivel molecular:

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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

## 7. PROCEDIMIENTO

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso. Se utilizarán dos placas de agar MacConkey por muestra, una suplementada con 1 mg/L de cefotaxima y otra con 1 mg/L de ceftazidima.

De forma alternativa, se pueden utilizar medios cromogénicos comerciales para el aislamiento selectivo y la identificación presuntiva de enterobacterias productoras de BLEE. Entre ellos se encuentra el ChromID ESBL (bioMérieux), Brilliance ESBL agar (Oxoid) y el CHROMagar™ ESBL.

2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35-37°C.
6. Realizar lectura a las 24 horas del cultivo de las muestras. Si en las placas no se detecta aislamiento de microorganismos, prolongar la incubación hasta las 48 horas.

### 7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE ENTEROBACTERIAS

Se confirmará la identificación a nivel de especie en cualquier crecimiento en los medios de cultivo utilizados. La mayoría de los medios cromogénicos permiten una identificación presuntiva de la especie (consultar indicaciones del fabricante).

La identificación se confirmará por MALDI-TOFF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

### 7.3 CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE BLEE O AMPC-P

- Se confirmará la reducción de sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación según criterios establecidos por EUCAST: CMI > 1 mg/L para cefotaxima y ceftazidima. Se realizarán estudios para detectar la producción de BLEE y/o AmpC-p en aquellos aislamientos que presenten reducción de sensibilidad al menos a uno de ellos según dichos criterios. En caso de sólo utilizar una cefalosporina de 3ª generación se recomienda el uso de cefotaxima por el predominio de BLEE del tipo CTX-M, muchas de las cuales presentan sensibilidad a ceftazidima.
- La medición de la hidrólisis de las cefalosporinas de 3ª generación mediante espectrometría se considera una técnica rápida y de referencia pero que no es fácilmente asequible para la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica. Permite la caracterización de BLEE y AmpC-p comparando el nivel de hidrólisis de cefalosporinas de 3ª generación en presencia y ausencia de inhibidores de las BLEE (ácido clavulánico) o de las AmpC-p (ácido fenil borónico y cloxacilina u oxacilina).
- Confirmación de producción de BLEE y/o AmpC-p. En todos los aislamientos de enterobacterias que cumplan los criterios de sensibilidad mencionados en el punto 1 se deberá estudiar la producción de BLEE mediante la inhibición de su actividad en presencia de ácido clavulánico. En aquellos aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* que presenten dichos criterios se estudiará la producción de AmpC-p mediante la inhibición de su actividad en presencia de ácido fenil borónico y cloxacilina (u oxacilina). Además, otros datos fenotípicos diferenciadores de la producción de BLEE y de la AmpC-p son la sensibilidad a cefoxitina y amoxicilina/ácido clavulánico (sensibles en el caso de BLEE y resistente en el caso de AmpC-p), aunque la cada vez más frecuente asociación de BLEE con otros mecanismos de resistencia como la pérdida de porinas y la producción de la beta-lactamasa OXA-1 genera resistencia a estos antibióticos.

#### 7.3.1. Para la confirmación de BLEE se utilizarán al menos una de las siguientes técnicas:

- Prueba de discos combinados con inhibidores.
  - Rotular con el número de muestra un tubo de agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.
  - Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de MacFarland. Agitar con un agitador tipo vortex.
  - Impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones.
  - Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías, se colocarán los discos de cefotaxima, ceftazidima, cefotaxima/ácido clavulánico y ceftazidima/ácido clavulánico.
  - Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.
  - En especies bacterianas con una beta-lactamasa AmpC cromosómica (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Hafnia alvei*) se recomienda el uso de los discos de cefepima y cefepima/clavulánico debido a la mayor estabilidad de este antibiótico frente a la hiperproducción de dichas beta-lactamasas cromosómicas.
- Prueba de sinergia de doble disco.
  - Se procederá según el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos (ver apartados a.1.-a.3.)
  - Situar un disco con cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg) y cefepima (30 µg) a una distancia de 20 mm (centro a centro) de un disco con amoxicilina-ácido clavulánico. En esta técnica la separación de los discos

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

es muy importante y deberá ajustarse hasta un mínimo de 15 mm o un máximo de 30 mm en función de que el nivel de resistencia a los antibióticos probados sea mayor o menor, respectivamente.

b.3. Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

b.4. En especies bacterianas con una beta-lactamasa AmpC cromosómica se recomienda evaluar específicamente la interacción de cefepima con el ácido clavulánico. Alternativamente se puede realizar el mismo procedimiento utilizando agar Mueller-Hinton suplementado con cloxacilina u oxacilina (250 mg/L).

C. Pruebas basadas en CMI: tiras con gradiente de antibiótico.

c.1. Se procederá según el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos (ver apartados a.1.-a.3.).

c.2. Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías, se colocarán las tiras con gradiente de antibióticos cefotaxima-cefotaxima/ácido clavulánico, ceftazidima-ceftazidima/ácido clavulánico y cefepima-cefepima/ácido clavulánico.

c.3. Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

D. Pruebas basadas en CMI: microdilución.

d.1. La microdilución se realizará en caldo Mueller-Hinton según recomendaciones EUCAST. Se probará un rango de concentraciones seriadas de al menos 0,5-32 mg/L para cefotaxima, ceftazidima y cefepima, en presencia y ausencia de una concentración fija de 4 mg/L de ácido clavulánico.

d.2. Existen diferentes sistemas comerciales que incluyen pocillos con diferentes concentraciones de cefotaxima y ceftazidima en presencia de ácido clavulánico.

d.3. Incubación a 35-37°C durante 18-24 horas.

7.3.2. Para la confirmación de AmpC-p se utilizarán al menos una de las siguientes técnicas:

A. Prueba de discos combinados con inhibidores.

a.1. Se seguirá el mismo procedimiento que para el estudio de BLEE utilizando los siguientes discos: cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima/ácido fenil borónico (30/400 µg) o cefotaxima/cloxacilina u oxacilina (30/500 µg), ceftazidima/ácido fenil borónico (30/400 µg) o ceftazidima/cloxacilina u oxacilina (30/500 µg).

a.2. Se prepararán las soluciones madre de inhibidores específicos de beta-lactamasas de tipo AmpC: ácido fenil-borónico (disuelto en DMSO y agua estéril) y cloxacilina u oxacilina (disuelta en agua estéril). Posteriormente se añadirá el volumen (no más de 10 µL de volumen total) adecuado de la solución de inhibidor a los discos de cefotaxima y ceftazidima según la cantidad final por disco que se desee: 400 µg en el caso del ácido fenil borónico y 500 µg en el caso de la cloxacilina u oxacilina. Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.

a.3. Para la detección fenotípica de una coproducción de BLEE y AmpC-p en una misma cepa se aconseja comparar los halos de inhibición obtenidos por los siguientes discos: cefotaxima (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (30/10 µg), cefotaxima/ácido fenil-borónico (30/400 µg) y cefotaxima/ácido clavulánico/ácido fenil-borónico (30/10/400 µg).

B. Prueba de sinergia de doble disco.

b.1. Se seguirá el mismo procedimiento que para el estudio de BLEE situando un disco con cefotaxima (30 µg) y otro con ceftazidima (30 µg) a una distancia de 20 mm (centro a centro) de un disco con ácido fenil borónico (400 µg) o con cloxacilina u oxacilina (500 µg). La separación de los discos es muy importante en

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

esta técnica y deberá ajustarse hasta un mínimo de 15 mm o un máximo de 30 mm en función de que el nivel de resistencia sea alto o bajo, respectivamente.

b.2. Para la preparación de los discos con cloxacilina y ácido fenil borónico se añadirá el volumen adecuado de las soluciones madre (no más de 10 µL de volumen total) a los discos blancos según la cantidad final por disco que se desee: 400 µg en el caso del ácido fenil borónico y 500 µg en el caso de la cloxacilina u oxacilina.

C. Prueba de aproximación de discos.

d.1. 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.

d.2. Situar discos de beta-lactámicos inductores débiles, tales como cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg), cercanos a discos de beta-lactámicos inductores fuertes tales como cefoxitina (30 µg) e imipenem (10 µg). La distancia de separación entre discos vendrá condicionado por los halos de inhibición de los antibióticos utilizados.

d.3. Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

## 7.4. DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE BLEE Y AMPC-P MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Existen diferentes aproximaciones para la detección molecular rápida de genes codificadores de BLEE y AmpC-p basadas principalmente, pero no sólo, en PCR en tiempo real, *microarray* y pirosecuenciación. En los últimos años se han comercializado numerosos métodos moleculares basados en estas aproximaciones.

Estas técnicas se pueden realizar:

- A partir de colonia, en lugar de las pruebas fenotípicas, en aquellas cepas con pruebas fenotípicas no concluyentes o como confirmación de las pruebas fenotípicas.
- A partir de muestra de vigilancia (y eventualmente clínica), lo que permite agilizar la obtención de resultados en relación a las técnicas de cultivo.

Los procedimientos a realizar varían sustancialmente en función del método elegido, en general se elegirá un método que permita al menos la detección de las principales familias de BLEE (grupo de la CTX-M-1, que incluye además la CTX-M-15, entre otras; grupo de la CTX-M-9, que incluye además la CTX-M-14, entre otras; y la SHV, que incluye la SHV-2 y SHV-12, entre otras) o AmpC-p (CIT, DHA, EBC, MOX, FOX y ACC)

En general, el procedimiento constará:

- Una primera fase de extracción y purificación del ADN bacteriano. En el mercado se encuentran disponibles gran cantidad de sistemas de purificación de ácidos nucleicos. El procedimiento de purificación se realizará siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.
- Realización del protocolo según las instrucciones de cada fabricante con el uso de iniciadores o sondas específicos de los genes buscados.
- Para la detección de BLEE de determinadas familias en las que también se incluyen otras beta-lactamasas sin perfil BLEE, como por ejemplo SHV y TEM, la confirmación genotípica de la producción de BLEE requiere la caracterización de las variantes nucleotídicas específicas de cada tipo de BLEE, a través de técnicas como la secuenciación, *microarray* u otras.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 10 de 12

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### Determinación fenotípica de la producción de BLEE:

- a. La interpretación de los resultados de la prueba de discos combinadas con inhibidores, expresados como diámetros de las zonas de inhibición en milímetros, se realizarán de la siguiente manera:
  - **Producción de BLEE.** Incremento del diámetro de inhibición de ceftazidima, cefotaxima o cefepima en presencia de ácido clavulánico  $\geq 5$  mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin ácido clavulánico.
  - **No producción de BLEE.** 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.
  - Si en presencia de ácido clavulánico sólo se observa incremento del diámetro de cefepima, manteniendo halos de inhibición de cefotaxima y ceftazidima en el rango de la disminución de la sensibilidad (intermedio o resistente) se sospechará la coproducción de una BLEE y de una AmpC. En caso de tratarse de una especie sin AmpC cromosómica se estudiará la presencia de AmpC-p según el procedimiento específico.
- b. La interpretación de los resultados de la prueba de sinergia de doble disco se realizarán de la siguiente manera:
  - **Producción de BLEE.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima, ceftazidima o cefepima en la zona próxima al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor.
  - **No producción de BLEE.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima, ceftazidima ni cefepim ni presencia de una “zona fantasma”.
  - Si sólo se observa ampliación del halo de inhibición o “zona fantasma” con el cefepima (en presencia de sensibilidad intermedia o resistencia a cefotaxima y ceftazidima) se sospechará la coproducción de una BLEE y de una AmpC. En caso de tratarse de una especie sin AmpC cromosómica se estudiará la presencia de AmpC-p según el procedimiento específico
- c. La interpretación de los resultados de las pruebas basadas en CMI se realizarán de la siguiente manera:
  - **Producción de BLEE.** Reducción de la CMI  $\geq 3$  diluciones dobles en presencia de ácido clavulánico para cualquier cefalosporina. En el caso de tiras con gradiente de antibiótico, la presencia de una zona fantasma o la deformación de la elipse de inhibición de las cefalosporinas también se considera un resultado positivo independientemente de las diferencias en la CMI.
  - **No producción de BLEE.** 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 en el caso de tiras con gradiente de antibiótico.

### Determinación fenotípica de la producción de AmpC-p:

- a. La interpretación de los resultados de la prueba de discos combinadas con inhibidores, expresados como diámetros de las zonas de inhibición en milímetros, se realizará de la siguiente manera:
  - **Producción de AmpC.** Incremento del diámetro de inhibición en los halos ceftazidima o cefotaxima en presencia de ácido fenil borónico o cloxacilina u oxacilina  $\geq 5$  mm respecto al de la cefalosporina correspondiente sin los inhibidores.
  - **No producción de AmpC.** No incremento o diferencia  $< 5$  mm en los halos de inhibición de cefotaxima y ceftazidima con ácido fenil borónico o cloxacilina u oxacilina respecto al de la cefalosporina correspondientes sin los inhibidores.
  - **Producción de AmpC y BLEE.** Ante una cepa resistente a cefotaxima y ceftazidima en la que no se observa

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 11 de 12

incremento, o se observa una diferencia  $<5$  mm, en los halos de inhibición de cefotaxima y ceftazidima en presencia de ácido fenil borónico, cloxacilina u oxacilina y ácido clavulánico; el incremento de  $\geq 5$  mm del diámetro de inhibición en los halos de ceftazidima/ácido clavulánico o cefotaxima/ácido clavulánico en presencia de ácido fenil borónico o cloxacilina u oxacilina es indicativo de una coproducción de BLEE y AmpC.

- b. La interpretación de los resultados de la prueba de sinergia de doble disco se realizará de la siguiente manera:
- **Producción de AmpC.** Ampliación del halo de inhibición de cefotaxima o ceftazidima en la zona próxima al disco con ácido fenil-borónico o cloxacilina+clavulánico (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas y el inhibidor.
  - **No producción de AmpC.** No ampliación de los halos de inhibición de cefotaxima y ceftazidima, ni presencia de una “zona fantasma”.
- c. La interpretación de los resultados de la prueba de aproximación de discos se realizará de la siguiente manera.
- **Producción de AmpC inducible.** Achatamiento del halo de inhibición (forma de D) de los beta-lactámicos inductores débiles (cefotaxima, ceftazidima) en la zona próxima al disco con el beta-lactámico inductor fuerte (cefoxitina, imipenem).
  - **No producción de una AmpC inducible.** Ausencia de modificación de los halos de inhibición.

#### Métodos moleculares para la detección de BLEE y AmpC-p:

La interpretación de los resultados de los métodos moleculares para la detección de los genes codificadores de BLEE y AmpC-p se realizará según instrucciones específicas de cada método. La información de los resultados se realizará como:

- Si la prueba se ha realizado sobre muestra clínica: **“Se detecta mediante [método empleado] la presencia de un gen codificante de una [BLEE o AmpC-p] del [tipo de familia o grupo]”**
- Si la prueba se ha realizado sobre colonia bacteriana previamente identificada: **“Se aísla [nombre de la especie] productora de una [BLEE o AmpC-p] del [tipo de familia o grupo]”**

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

1. La detección fenotípica de BLEE puede dar falsos positivos en el caso de enterobacterias que poseen beta-lactamasas cromosómicas que son inhibidas por el ácido clavulánico y cuya hiperproducción puede dar lugar a un patrón fenotípico de resistencia compatible con la presencia de una BLEE. Entre ellas se encuentra la



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-03	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

betalactamasa K1 de *Klebsiella oxytoca*, la SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae* y las cefalosporinas CepA de *Proteus vulgaris* y *Proteus penneri*.

2. La detección fenotípica de AmpC podrá ser positiva en el caso de enterobacterias que poseen beta-lactamasas cromosómicas de clase C como son *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* o *Serratia* spp.
3. La recuperación de la actividad de cefotaxima y ceftazidima en presencia de ácido fenil borónico, pero no de cloxacilina u oxacilina, puede deberse a la presencia de una carbapenemasa de clase A como por ejemplo las de tipo KPC.
4. La caracterización genotípica del tipo concreto de cada enzima, imprescindible en algunas familias de beta-lactamasas para confirmar que se trata de una BLEE (SHV, TEM), necesita de la detección específica de las variables nucleotídicas puntuales que las diferencia.
5. La detección de genes codificadores de carbapenemasas directamente sobre muestra agiliza la emisión de resultados pero no permite conocer la especie bacteriana implicada ni garantizar la presencia de una bacteria viva. En el caso de que se necesite realizar estudios de sensibilidad o de epidemiología molecular es imprescindible el cultivo de la cepa.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado "Anotaciones al procedimiento".

Este procedimiento está dirigido a la detección de las BLEEs y AmpC-p adquiridas más prevalentes en enterobacterias según la epidemiología actual. Cambios evolutivos significativos en esta epidemiología, como podría ser la posible aparición de nuevos tipos de beta-lactamasas, obligarían a un reajuste del procedimiento en consecuencia. La presencia simultánea de varias beta-lactamasas de amplio espectro, BLEE, AmpC-p o carbapenemasas puede conducir a resultados falsos negativos o difíciles de interpretar por métodos fenotípicos, en cuyo caso se requiere la utilización de métodos moleculares.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-976.
2. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 1.0, Diciembre 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
3. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41:99-109.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 11

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en muestras de vigilancia. Aunque *Klebsiella pneumoniae* es la especie que actualmente presenta un mayor impacto clínico, cualquier especie de enterobacteria productora de carbapenemasa requiere vigilancia microbiológica.

El alcance de este documento tiene dos niveles en función de si la detección de las EPC se realiza a nivel fenotípico o a nivel molecular.

## 2. FUNDAMENTO

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar la gran mayoría de los antibióticos beta-lactámicos que se agrupan en tres clases principales según la clasificación molecular de Ambler: 1) Clase A, principalmente enzimas del tipo KPC; 2) Clase B o metalo-beta-lactamasas (MBL) dependientes de zinc, principalmente enzimas del tipo VIM, IMP y NDM; 3) Clase D, principalmente OXA-48.

En los últimos años las EPC se han convertido en un problema clínico y de salud pública emergente, en continua evolución y con una alta velocidad de diseminación intra- e interhospitalaria, de difícil control y tratamiento.

En la actualidad se han detectado brotes de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa en la mayoría de las regiones españolas, algunos de ellos epidemiológicamente relacionados. Este escenario sugiere una situación epidemiológica que ha evolucionado rápidamente hacia un estado de “diseminación interregional” que requiere de medidas globales para su control.

La realización de estudios de vigilancia microbiológica de EPC ha demostrado su utilidad en el estudio de brotes hospitalarios y se considera una herramienta esencial en los programas de control y prevención de la infección nosocomial por estos microorganismos.

Existen diferentes aproximaciones para la detección de colonización por EPC: i) la utilización de técnicas basadas en el cultivo en medios selectivos y diferenciales, y posterior confirmación/caracterización del mecanismo por métodos fenotípicos, colorimétricos, moleculares o espectrometría de masas; ii) la utilización de técnicas rápidas moleculares capaces de detectar genes codificadores de carbapenemasas. La elección de unas u otras dependerá en gran parte de las características epidemiológicas de cada hospital (prevalencia de EPC, tipo de pacientes, etc.), y deberá ser establecida dentro del programa para el control de este tipo de microorganismos.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 38. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 11

4. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. M100-S24, CLSI, Wayne, PA.
5. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
6. Prospectos de instrucciones correspondientes a aquellos sistemas comerciales fenotípicos o genotípicos que se utilicen.

## 4. MUESTRAS

### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia microbiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su "Procedimiento de Microbiología Clínica n° 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología."

Las muestras más adecuadas para determinar el estado de portador de EPC son el frotis rectal y las heces. Para el frotis rectal la muestra se obtendrá introduciendo una torunda por el esfínter anal. Es de especial importancia que se recoja suficiente materia fecal en la torunda para una detección óptima de una EPC. Se utilizará un medio de transporte que impida su desecación (Amies o Stuart)

Para la recogida de heces, se enviará una pequeña cantidad de éstas en un recipiente estéril de boca ancha sin conservantes.

Se recomienda procesar la muestra con la mayor celeridad posible en un tiempo inferior a 24 horas; si no se va a procesar de manera inmediata es recomendable su conservación a 2-8°C para facilitar la recuperación de la bacteria a vigilar evitando el sobrecrecimiento de la microbiota comensal.

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

### 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

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

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

- Agar MacConkey suplementado con meropenem (1 mg/L). Almacenar a 2-8°C durante no más de 7-10 días.
- Medios cromogénicos comerciales que permitan la detección de OXA-48, KPC, VIM, IMP y NDM. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad.
- Discos de meropenem (10 µg).
- Caldo de enriquecimiento BHI. Almacenar a 2-8°C, vigilando la fecha de caducidad. Este medio es opcional y se puede utilizar previo a la inoculación en placas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 11

## 5.2. CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF).

Reactivos necesarios para la detección de hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos por métodos colorimétricos:

- Existen diferentes métodos colorimétricos (CarbaNP, BlueCarba) que permiten la detección de actividad carbapenemasa mediante marcadores colorimétricos que indican cambio de pH. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

Reactivos para la realización del Test de Hodge modificado:

- Placa de agar Mueller-Hinton.
- Disco de meropenem.
- Cloxacilina u oxacilina.
- Cepa *E. coli* ATCC 25922.

Reactivos para caracterización fenotípica de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores.

- Placas de agar Mueller-Hinton.
- Cloxacilina u oxacilina.
- Ácido fenil-borónico.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Agua desionizada estéril.
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>).
- Tubos con agua destilada estéril.
- Agar Mueller-Hinton en placas.
- Discos de antibióticos: meropenem (10 µg), meropenem-ácido fenil-borónico (10/400-600 µg), meropenem-cloxacilina (10/600 µg) y meropenem-EDTA (10/750 µg).
- Tabletas comerciales con meropenem (10 µg), meropenem/ácido dipicolínico, meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenil-borónico, y temocilina (30 µg).

## 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS

La detección molecular de los genes codificadores de carbapenemasas puede hacerse directamente sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, serviría como confirmación de la detección fenotípica, o sobre muestra (frotis rectal o heces).

Existen diferentes sistemas comerciales basados principalmente, pero no sólo, en PCR a tiempo real. Se usará cualquiera de ellos que permita la detección y caracterización de las principales carbapenemasas (OXA-48, KPC, VIM, NDM, IMP). Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

## 5.4. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como genotípicas se deben utilizar controles adecuados como pueden ser:

*K. pneumoniae* NCTC 13442 productora de OXA-48.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 11

*K. pneumoniae* NCTC 13438 o *K. pneumoniae* CCUG 56233 productoras de KPC.

*K. pneumoniae* NCTC 13439 o *K. pneumoniae* CCUG 58547 productoras de VIM.

*K. pneumoniae* ATCC 25955 como control negativo.

*Enterobacter cloacae* CCUG 59627 como control negativo productor de AmpC con pérdida de porinas.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

#### Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrómetro de masas (MALDI-TOFF).
- Congelador (-20°C).

#### Nivel molecular:

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.
- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

### 6.2. MATERIAL

#### Nivel fenotípico:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

#### Nivel molecular:

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 6 de 11

## 7. PROCEDIMIENTO

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso. Se utilizarán al menos uno de los siguientes medios de cultivo: agar MacConkey suplementado con 1 mg/L de meropenem, agar MacConkey sobre el que se dispensará un disco de 10 µg de meropenem, o medios cromogénicos comerciales. Entre estos últimos ellos se encuentran los medios chromID (bioMérieux, France) que incluyen el CARBA medium (detecta cepas productoras de KPC y MBL), el OXA-48 medium (específico para cepas productoras de OXA-48) y el CARBA SMART medium (medio biplaca que permite la detección de carbapenemasas en la mitad de la placa y específicamente de carbapenemasas OXA-48 en la otra mitad); el medio CRE Brilliance (Thermo Fisher Scientific, UK), y el medio SUPERCARBA, que contiene agar Driglasky, ertapenem, cloxacilina y sulfato de zinc.
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35-37°C.
6. En el caso de optar por un enriquecimiento previo, se introducirá la torunda rectal en un caldo BHI en el que se ha introducido un disco de 10 µg de meropenem. Tras incubación de 18-24 h a 35-37°C se realizará un subcultivo en los medios correspondientes.
7. Realizar lectura a las 24 horas del cultivo de las muestras. Si en las placas no se detecta aislamiento de microorganismos, prolongar la incubación hasta las 48 horas.

### 7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE ENTEROBACTERIAS

En cualquier crecimiento en los medios de cultivo inoculados debe confirmarse la identificación a nivel de especie. Muchos medios cromogénicos permiten una identificación presuntiva de la especie (consultar indicaciones del fabricante)

En cualquier caso la identificación se confirmará por MALDI-TOFF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana.

### 7.3. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA Y CARACTERIZACIÓN DE LA CLASE DE CARBAPENEMASA

#### 7.3.1. Confirmación de reducción de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos

Se confirmará la reducción de sensibilidad a antibióticos carbapenémicos según criterios y puntos de corte epidemiológicos establecidos por EUCAST: CMI > 0,12 mg/L para ertapenem y meropenem y > 1 mg/L para imipenem; halos de inhibición < 25 mm para meropenem y ertapenem y < 23 para imipenem. Se realizarán estudios de confirmación y caracterización de carbapenemasas en aquellos aislamientos que presenten reducción de sensibilidad al menos a un antibiótico carbapenémico según dichos criterios. En caso de sólo utilizar un antibiótico carbapenémico se recomienda el uso de meropenem por presentar mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad.

#### 7.3.2. Medición de la hidrólisis de antibióticos carbapenémicos

La medición de la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos mediante espectrofotometría se considera una técnica rápida y de referencia pero que no es fácilmente asequible para la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Permite la caracterización de la clase de carbapenemasas comparando el nivel de hidrólisis en presencia y ausencia de inhibidores como EDTA o ácido dipicolínico (clase B) y tazobactam o ácido clavulánico (clase A) ayudan a la caracterización de este tipo de enzimas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 7 de 11

### 7.3.3. Técnicas adicionales

Todos los aislamientos que cumplan los criterios de sensibilidad mencionados en el punto 7.3.1. se deberán estudiar mediante al menos una de las siguientes técnicas:

#### A. Test de Hodge modificado con disco de meropenem según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*:

- a.1. Se inocula una placa de Müeller-Hinton con una suspensión 1:10 del 0,5 de McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922.
- a.2. Se añaden 10 µL de una solución 60 mg/mL de cloxacilina o 100 mg/mL de oxacilina a un disco de meropenem (10 µg); la concentración final de cloxacilina/oxacilina será de 600 o 1000 µg/disco, respectivamente.
- a.3. Se deja secar el disco de meropenem durante 10 minutos y se coloca en el centro de la placa inoculada.
- a.4. Se inocula la cepa problema (3-5 colonias con un asa de 10 µL) formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa.
- a.5. Tras 18-24 horas de incubación a 35°-37°C durante 18-24 horas se examina visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría.

#### B. Detección de la actividad carbapenemasa por métodos colorimétricos basados en el cambio de pH:

- b.1. Diferentes métodos colorimétricos como el CarbaNP (que utiliza rojo fenol como indicador de la acidificación el medio) y el BlueCarba (que utiliza azul de bromotimol como indicador) permiten la detección de la actividad carbapenemasa mediante viraje de color con una muy alta sensibilidad y especificidad.
- b.2. La realización de la técnica se realizará acorde las indicaciones de los protocolos establecidos por los fabricantes/creadores. Básicamente consiste en realizar un extracto bacteriano (con el búfer B-PER II en el caso del CarbaNP o directamente la colonia en el caso del BlueCarba) y ponerlo en contacto con una solución del indicador más un antibiótico carbapenémico.
- b.3. Tras un corto periodo de incubación (habitualmente dos horas) a 35-37°C con o sin agitación dependiendo del método, la interpretación de los resultados se realiza visualmente en comparación con un control negativo sin antibiótico carbapenémico.

### 7.3.4. Caracterización del tipo de carbapenemasa mediante métodos fenotípicos basados en la utilización de inhibidores

1. En todos los aislamientos que hayan sido positivos mediante las pruebas colorimétricas y/o el test de Hodge modificado se realizarán pruebas de inhibición de la actividad carbapenemasa. En aquellos casos en los que sólo se vaya a realizar el test de Hodge se aconseja realizar en paralelo las pruebas de inhibición a todas las cepas sometidas a cribado ya que su lectura conjunta puede facilitar la interpretación de los resultados obtenidos.
2. Estos estudios se pueden realizar mediante difusión disco-placa o mediante dilución en agar, aunque lo más habitual es comparar los halos de inhibición de discos/tabletas de un antibiótico carbapenémico, preferiblemente meropenem (10 µg), con y sin la presencia del inhibidor específico de cada clase de carbapenemasa.
3. Se prepararán las soluciones madre de inhibidores específicos de carbapenemasa de clase A (ácido fenilborónico; disuelto en DMSO y agua estéril), de clase B (EDTA; disuelto en agua estéril), o de beta-lactamasas del tipo AmpC (cloxacilina; disuelta en agua estéril). Posteriormente se añadirá el volumen (no más de 10 µL de volumen total) adecuado de la solución de inhibidor a los discos de meropenem según la cantidad final por disco que se desee: 400-600 µg en el caso del ácido fenilborónico, 600 µg en el caso de la cloxacilina, 750 µg en el caso del EDTA. Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.  
Existen kits comerciales basados en esta misma técnica, con tabletas que contienen 10 µg de meropenem, meropenem más cloxacilina, meropenem más ácido dipicolínico y meropenem más ácido fenilborónico.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 8 de 11

4. Rotular con el número de muestra un tubo de agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.
5. Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de MacFarland. Agitar con un agitador tipo vortex.
6. Impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones.
7. Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías, se colocarán los discos de meropenem, meropenem+ácido fenil borónico, meropenem+EDTA y meropenem+cloxacilina; o bien las tabletas correspondientes de los kits comerciales. Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.
8. Existen diferentes métodos comerciales basados en estos mismos principios que utilizan tiras de gradiente de antibiótico o tabletas de antibióticos. El procedimiento a seguir y la interpretación de los resultados se realizarán según las indicaciones de los fabricantes.

#### 7.4. DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

Existen diferentes aproximaciones para la detección molecular rápida de genes codificadores de carbapenemasas basadas principalmente, pero no sólo, en PCR en tiempo real, *microarray* y pirosecuenciación. En los últimos años se han comercializado numerosos métodos moleculares basados en estas aproximaciones.

Se pueden realizar las siguientes técnicas:

- a. A partir de colonia, en lugar de las pruebas fenotípicas, en aquellas cepas con pruebas fenotípicas no concluyentes o como confirmación de las pruebas fenotípicas.
- b. A partir de muestra de vigilancia (y eventualmente clínica), lo que permite agilizar la obtención de resultados en relación a las técnicas de cultivo.  
Los procedimientos a realizar varían sustancialmente en función del método elegido, en general se elegirá un método que permita la detección de cualquiera de las principales carbapenemasas (OXA-48, VIM, KPC, NDM, IMP) salvo que se utilice como confirmación en una cepa con una alta sospecha de determinada clase de carbapenemasa obtenida por métodos fenotípicos.

En general, el procedimiento constará:

1. Una primera fase de extracción y purificación del ADN bacteriano. En el mercado se encuentran disponibles gran cantidad de sistemas de purificación de ácidos nucleicos. El procedimiento de purificación se realizará siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.
2. Realización del protocolo según las instrucciones de cada fabricante con el uso de iniciadores o sondas específicos de los genes buscados.

En la Figura 1 del documento científico del presente procedimiento así como en el procedimiento SEIMC n° 38 se muestran algoritmos de actuación para la confirmación de mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos en enterobacterias.

#### 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

A. Los resultados del test de Hodge modificado se interpretarán de la siguiente manera:

- **Producción de carbapenemasa.** Presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora.
- **No producción de carbapenemasa.** Ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 9 de 11

- **Ininterpretable.** Inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría.
- B) Los resultados de los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH se interpretarán de la siguiente manera:
- **Producción de carbapenemasa.** Color amarillo/naranja de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color amarillo de la cepa problema *versus* azul/verde del control negativo (BlueCarba); o color verde de la cepa problema *versus* azul del control negativo (BlueCarba).
  - **No producción de carbapenemasa.** Color rojo de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color verde de la cepa problema *versus* color verde del control negativo (BlueCarba); o color azul de la cepa problema *versus* color azul del control negativo (BlueCarba)
- C) La interpretación de los resultados de las pruebas de inhibición, expresados como diámetros de las zonas de inhibición en milímetros, se realizarán de la siguiente manera:
- **Carbapenemasa de clase A.** Halo de meropenem+ácido fenil borónico  $\geq 5$  mm que el halo de meropenem y halo de meropenem/cloxacilina  $< 5$  mm que el halo de meropenem.
  - **Carbapenemasa de clase B.** Halo de meropenem+EDTA o ácido dipicolínico  $\geq 5$  mm que el halo de meropenem.
  - **Hiperproducción de AmpC + pérdida de porinas.** Halo de meropenem+ácido fenil borónico y halo de meropenem+cloxacilina  $\geq 5$  mm que el halo de meropenem.
  - Ante la ausencia de recuperación con inhibidores con prueba fenotípica (colorimétrica o test de Hodge) sugere de producción de carbapenemasa, sospechar posible producción de OXA-48 sobre todo en presencia de: i) sensibilidad a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generación o perfil de BLEE, ii) alto nivel de resistencia a temocilina ( $>64$  mg/L) y resistencia a piperacilina/tazobactam.
- D) La interpretación de los resultados de los métodos moleculares para la detección de los genes codificadores de carbapenemasas se realizará según instrucciones específicas de cada método. La información de los resultados se realizará como:
- Si la prueba se ha realizado sobre muestra clínica: **“Se detecta mediante [método empleado] la presencia de un gen codificante de [tipo de carbapenemasa]”**
  - Si la prueba se ha realizado sobre colonia bacteriana previamente identificada: **“Se aísla [nombre de la especie] productora de [tipo de carbapenemasa]”**

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 10 de 11

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- A. El test de Hodge modificado es una técnica sencilla y ampliamente utilizada para la detección de la actividad carbapenemasa. A pesar de ser un método recomendado por el CLSI, tiene detractores debido a la presencia de falsos negativos (fundamentalmente MBL, que se pueden evitar en gran parte añadiendo sulfato de zinc al medio) y de falsos positivos (fundamentalmente cepas con hiperproducción de AmpC más pérdida de porinas, que se puede solventar en gran parte añadiendo cloxacilina u oxacilina al disco de meropenem). Su lectura conjunta con las técnicas basadas en inhibidores de carbapenemasas aporta una información rápida y fácilmente interpretable.
- B. Los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH son métodos muy sensibles y específicos que necesitan de un cuidadoso cumplimiento de todos sus pasos para obtener un máximo rendimiento. Se desaconseja el uso del CarbaNP en colonias desde agar Drigalski o agar McConkey. En cepas productoras de OXA-48 puede detectarse un viraje de color menor del esperado en el CarbaNP alcanzado un color anaranjado que puede dificultar su interpretación.
- C. Pruebas fenotípicas basadas en el uso de inhibidores:
- En general, la presencia de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos carbapenémicos (carbapenemasas, BLEE y/o AmpC más pérdida de porinas u otros) dificultan en gran medida la técnicas de confirmación fenotípica a nivel de clase. Para estos casos, y en general para acelerar la obtención del resultado confirmatorio a nivel de clase, se aconseja la utilización de técnicas moleculares.
  - El EDTA tiene una actividad intrínseca frente a algunas cepas (también se puede observar con el ácido dipicolínico pero con menos frecuencia), en estos casos se puede detectar una recuperación en el límite (5-6 mm) en ausencia de carbapenemasas de clase B, este hecho se puede evaluar probando el halo de inhibición que tiene un disco que contenga sólo EDTA.
  - Las resistencias a temocilina y piperacilina/tazobactam no son marcadores específicos de OXA-48, por lo que para la confirmación de carbapenemasas de clase D es altamente recomendable la realización de un método genotípico.
- D. La detección de genes codificadores de carbapenemasas directamente sobre muestra agiliza la emisión de resultados pero no permite conocer la especie bacteriana implicada ni garantizar la presencia de una bacteria viva. En el caso de que se necesite realizar estudios de sensibilidad o de epidemiología molecular es imprescindible el cultivo de la cepa.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado "Anotaciones al procedimiento".

Este procedimiento está dirigido a la detección de las carbapenemasas adquiridas más prevalentes en enterobacterias según la epidemiología actual. Cambios evolutivos significativos en esta epidemiología, como podría ser la posible aparición de nuevos tipos de carbapenemasas, obligarían a un reajuste del procedimiento en consecuencia.

La presencia simultánea de carbapenemasas junto con BLEE o con cefamicinas plasmídicas de tipo AmpC, puede conducir a resultados falsos negativos o difíciles de interpretar por métodos fenotípicos, en cuyo caso se requiere aplicar técnicas moleculares.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en muestras de vigilancia	PNT-MMV-04	
		Edición N° 01	Página 11 de 11

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bou G, Vila J, Seral C, Castillo FJ. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in various scenarios and health settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32 (Suppl 4):24-32.
2. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:413-431.
3. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 1.0, Diciembre 2013. Disponible en : [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
4. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25:682-707.





Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de *Acinetobacter baumannii multirresistente* (MDR), que por definición incluyen las cepas productoras de carbapenemasas, en muestras de vigilancia. La resistencia a carbapenémicos no mediada por enzimas carbapenemasas es un fenómeno muy inusual en *Acinetobacter* spp.

El alcance de este documento tiene tres niveles en función de los recursos y posibilidades de cada laboratorio: i-detección fenotípica mediante antibiograma de *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) MDR; ii-detección fenotípica la producción de carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*), y iii-detección molecular de las carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*).

## 2. FUNDAMENTO

*A. baumannii* muestra una extraordinaria capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos. En la década de los 90 las infecciones causadas por *A. baumannii* eran fácilmente tratadas con antibióticos convencionales; sin embargo, en la actualidad los aislamientos de esta especie presentan con frecuencia resistencia a prácticamente todos los antibióticos de uso clínico. Según los datos obtenidos en el último estudio multicéntrico nacional (proyecto GEIH-GEMARA-REIPI-Ab2010) en el que se incluyeron 446 aislados de *A. baumannii* obtenidos de 43 hospitales españoles entre febrero y marzo del 2010, se detectó una alta prevalencia de resistencia (incluida también la sensibilidad intermedia) a la mayoría de los antimicrobianos: >94% (ceftazidima, piperacilina y ciprofloxacino), 82-86% (carbapenemas y tetraciclina), 60-70% (tobramicina, sulbactam, gentamicina y doxiciclina), 49% (amikacina), 30% (minociclina, rifampicina), 24% (tigeciclina) y 3% (colistina). En comparación con los datos obtenidos en el primer estudio GEIH-Ab2000 realizado una década antes, estos aislados fueron más resistentes a ceftazidima (99% vs 83%), carbapenemas (82-86% vs 43%-48%), doxiciclina (70% vs 68%), sulbactam (65% vs 53%) y colistina (3% vs 0%), pero más sensibles a los aminoglucosidos (particularmente gentamicina: 70% vs 96%), tetraciclina (83% vs 91%) y rifampicina (30% vs 51%), respectivamente.

Atendiendo a estos datos es por tanto importante considerar que la mayoría de los aislados clínicos de *A. baumannii* que se obtienen en la práctica clínica diaria muestran un perfil de MDR o de resistencia extensa (XDR).

Respecto a los mecanismos que confieren resistencia a los antimicrobianos en *A. baumannii*, se han descrito beta-lactamasas de la clase A (tipo TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, CARB, GES, KPC, SCO-1...), clase B o metaloenzimas (IMP, VIM, SIM, NDM...) y clase D con actividad sobre los carbapenémicos (OXA-23,-24,-58,-143, y -235) siendo este grupo de carbapenemasas de clase D las más importantes tanto clínica como epidemiológicamente. De igual manera, reducción en la permeabilidad, hiperexpresión de distintos sistemas de expulsión activa, enzimas modificantes de aminoglucósidos y cloranfenicol, metilasas, y modificaciones del sitio de interacción de la diana están implicados en la resistencia a distintas familias de antibióticos en *A. baumannii*.

En relación a la epidemiología clínica de este microorganismo, es notorio el cambio epidemiológico observado en el estudio multicéntrico antes mencionado, así en los últimos años *A. baumannii* ha ido afectando cada vez con más frecuencia a pacientes ingresados en servicios convencionales (no críticos) y a pacientes de instituciones de cuidados sanitarios no hospitalarios.

Los pacientes colonizados por *Acinetobacter* spp. tienen a menudo un historial de hospitalización prolongada o terapia antimicrobiana previa. La estancia en UCI, sobre todo ante la presencia de otros pacientes que están colonizados con *Acinetobacter* spp., predispone a los pacientes a la colonización. Ello se ve favorecido sobre todo en pacientes que están intubados y en aquellos que tienen catéteres intravenosos, dispositivos invasivos, drenajes quirúrgicos, o sondas urinarias permanentes. *Acinetobacter* spp. suele cultivarse del paciente hospitalizado a partir de muestras de esputo o secreciones respiratorias, heridas, y la orina y puede aislarse habitualmente en soluciones de irrigación y fluidos intravenosos. Su capacidad de sobrevivir en desecación unido a su facilidad para

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

contaminar el ambiente hospitalario y su capacidad de transmitirse de paciente a paciente a través de las manos del personal favorece su implicación como causa de brotes hospitalarios. Sin embargo, debido a la complejidad de mecanismos de resistencia a antimicrobianos que pueden coexistir de manera concomitante en este microorganismo, desde un punto de vista práctico el carácter MDR en *Acinetobacter* spp. se va a definir por la presencia de resistencia a antibióticos carbapenémicos.

### 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 38. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>.
4. Documento técnico PNT-MMV-04 de este procedimiento.
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 1.0, Diciembre 2013. Disponible en:
6. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
7. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. M100-S24, CLSI, Wayne, PA.
8. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
9. Bou G (Coordinador). Bou G, Fernández A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 37. SEIMC 2010. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

### 4. MUESTRAS

#### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia microbiológica se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su "Procedimiento de Microbiología Clínica n° 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología."

Las muestras más adecuadas para determinar el estado de portador de *A. baumannii* MDR son los frotis faríngeo y rectal/perineal. Se utilizará un medio de transporte que impida su desecación (Amies o Stuart).

Se recomienda procesar la muestra con la mayor celeridad posible en un tiempo inferior a 24 horas; si no se va a procesar de manera inmediata es recomendable su conservación a 2-8°C para facilitar la recuperación de la bacteria a vigilar evitando el sobrecrecimiento de la microbiota comensal.

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

## 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

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

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

- Como medio general para la detección de *A. baumannii* MDR se utilizará Agar MacConkey suplementado con gentamicina a una concentración de 8 mg/L o incluso cefotaxima a una concentración de 2 mg/L. Almacenar a 2-8°C durante no más de 7-10 días.
- Alternativamente, para el seguimiento de cepas MDR concretas en situaciones de epidemia o endemia se podrá utilizar Agar MacConkey suplementado con antibióticos seleccionados de acuerdo al fenotipo de la cepa epidémica. Estos medios pueden contener por ejemplo varias combinaciones de cefotaxima o ceftazidima, meropenem, gentamicina/amicacina o ciprofloxacino. Dado que la resistencia a carbapenémicos en *A. baumannii* se debe principalmente a la presencia de carbapenemasas de clase D no se requiere posiblemente el uso de cloxacilina asociado a imipenem y/o meropenem. Otros medios de cultivo específicos, como el medio LAM o CHROMagar *Acinetobacter* quedarían como opciones posibles siempre que incorporasen suplementos antibióticos específicos.
- Paneles de microdilución o difusión disco-placa para la determinación del perfil de resistencia. Independiente de la recomendación de Magiorakos et al. (Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268-281), en la cual los antibióticos a estudiar se agrupan en varias familias, en el presente documento se va a considerar la resistencia a antibióticos carbapenémicos (imipenem y meropenem) como marcador de la MDR en *A. baumannii*. Los puntos de corte para el imipenem y el meropenem vienen definidos según criterios CLSI y EUCAST que definen una concentración inferior o igual a 2 mg/L como criterio de sensibilidad. Respecto al punto de corte de resistencia, hay una cierta discrepancia, ya que mientras que CLSI define resistencia como mayor o igual a 8 mg/L para ambos antibióticos, EUCAST lo define como mayor de 8 mg/L.

### 5.2. CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOFF).

Reactivos para la realización del Test de Hodge modificado:

- Placa de agar Müller-Hinton.
- Disco de meropenem (10 µg).
- Cepa *E. coli* ATCC 25922 o *K. pneumoniae* ATCC 700603

Reactivos necesarios para la detección de hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos por métodos colorimétricos:

Existen diferentes métodos colorimétricos (CarbaNP, BlueCarba) que permiten la detección de actividad carbapenemasa mediante marcadores colorimétricos que indican cambio de pH. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 5 de 12

#### Reactivos para caracterización fenotípica de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores:

- Placas de agar Mueller-Hinton.
- Cloxacilina u oxacilina.
- Ácido fenil-borónico.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Agua desionizada estéril.
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>).
- Tubos con agua destilada esteril.
- Agar Mueller-Hinton en placas.
- Discos de antibióticos: meropenem (10 µg), meropenem-ácido fenil-borónico (10/400-600 µg), meropenem-cloxacilina (10/600-3000 µg) y meropenem-EDTA (10/750 µg).
- Tabletas comerciales con meropenem (10 µg), meropenem/ácido dipicolínico, meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenil-borónico.

### 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS

La detección molecular de los genes codificadores de carbapenemasas puede hacerse sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, sirviendo como confirmación de la detección fenotípica, o directamente sobre la muestra clínica (frotis faríngeo o rectal).

Existen diferentes sistemas comerciales basados principalmente, pero no sólo, en PCR a tiempo real. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante. No obstante, es necesario tener en cuenta que la gran mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias y existen ciertas diferencias con las esperables en *A. baumannii*. Típicamente, estos sistemas son capaces de detectar carbapenemasas OXA-48, KPC, VIM, IMP y NDM. Si bien la OXA-48 no se ha detectado en *A. baumannii*, el resto de enzimas, particularmente VIM y IMP, y también NDM, sí que se han encontrado y por tanto los sistemas comerciales diseñados para enterobacterias pueden resultar de utilidad. Las carbapenemasas más importantes tanto clínica como epidemiológicamente en este patógeno son las carbapenemasas de clase D OXA-23,-24 -58,-143, y -235. Se incluiría también dentro de estas carbapenemasas la hiperexpresión del enzima endógeno OXA-51 por inserción en 5' de la secuencia de inserción ISAba-1. En caso de sospecha fenotípica o epidemiológica de este tipo de carbapenemasas deberán utilizarse pruebas de PCR específicas. Asimismo, dada la epidemiología actual de la producción de carbapenemasas en *A. baumannii* en nuestro país, la detección de carbapenemasas de tipo OXA mediante PCR genérica para estos grupos o mediante PCR específicas para los grupos OXA-23, OXA-24, y OXA-58 sería suficiente para detectar la inmensa mayoría de los casos y se podría utilizar como aproximación diagnóstica de primera línea.

### 5.4. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como genotípicas se deben utilizar controles adecuados. De forma genérica, atendiendo a la epidemiología de *A. baumannii* en nuestro medio se recomienda utilizar cepas productoras de OXA-23/-24/-58 como controles positivos de producción de carbapenemasas.

Cepas de colección que podrían usarse como controles incluirían las AbH12O-A2, Ab1, y ROC-OXA-58 productoras de OXA-24, -23, y -58, respectivamente descritas en las referencias 1, 6 y 9 de este PNT.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

#### Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrómetro de masas (MALDI-TOF).
- Congelador (-20°C).

#### Nivel molecular:

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.
- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

### 6.2. MATERIAL

#### Nivel fenotípico:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

#### Nivel molecular

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

## 7. PROCEDIMIENTO

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso. Como medio general para la detección de *A. baumannii* MDR se utilizará Agar MacConkey suplementado con los antibióticos antes mencionados, gentamicina (8 mg/L), o cefotaxima (2 mg/L).
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35-37°C.
6. Realizar lectura a las 24 horas del cultivo de las muestras. Si en las placas no se detecta aislamiento de microorganismos, prolongar la incubación hasta las 48 horas.

### 7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *A. baumannii*

La inspección visual acompañada de la prueba de la oxidasa es presuntivo para la identificación de *A. baumannii*. En cualquier caso, la identificación se confirmará por MALDI-TOF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana. También los métodos moleculares, aunque más laboriosos y caros, son útiles.

### 7.3. CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO MDR

Se realizará un antibiograma (por ejemplo por microdilución o por difusión disco-placa) para determinar el perfil de resistencia. Como se ha comentado, para facilitar el manejo epidemiológico y de control de la infección en la práctica rutinaria diaria, en este procedimiento se va a utilizar la resistencia a carbapenemas como marcador del fenotipo MDR en *A. baumannii*. El propio fenotipo de resistencia, que incluye resistencia neta a imipenem y/o meropenem puede sugerir de entrada la presencia de carbapenemasas. La gran mayoría de los aislamientos clínicos de *A. baumannii* en nuestro medio con fenotipo MDR (producción de carbapenemasas) se asocian con un amplio patrón de resistencia múltiple a todos los beta-lactámicos incluyendo carbapenemas. Fenotipo que, como se ha detallado, se asocia principalmente a la producción de carbapenemasas del tipo OXA. De manera excepcional, en nuestro medio podría aparecer *A. baumannii* MDR productor de otras carbapenemasas, de tipo MBL o de clase A, de tipo KPC. Los estudios de prevalencia a nivel nacional no han detectado hasta la fecha estos genes codificantes para estas carbapenemasas en cepas autóctonas.

### 7.4. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA Y CARACTERIZACIÓN DE LA CLASE DE CARBAPENEMASA

Se podrán utilizar una o múltiples de las siguientes aproximaciones:

#### 7.4.1 Test de Hodge modificado con disco de meropenem según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Este procedimiento está optimizado para enterobacterias, aunque se puede utilizar también para *A. baumannii* pero con menor sensibilidad y especificidad. El rendimiento del ensayo puede mejorar utilizando la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como indicador.

1. Se inocula una placa de Mueller-Hinton con una suspensión 1:10 del 0,5 de McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (o *K. pneumoniae* ATCC 700603).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

2. Se coloca el disco de meropenem en el centro de la placa inoculada.
3. Se inocula la cepa problema (3-5 colonias con un asa de 10 µL) formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa.
4. Después de 18-24 horas de incubación a 35°-37°C se examina visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría.

#### 7.4.2. Medición de la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos mediante espectrofotometría.

Se considera una técnica rápida y de referencia pero que no es fácilmente asequible para la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Permite la caracterización de la clase de carbapenemasas comparando el nivel de hidrólisis en presencia y ausencia de inhibidores como EDTA o ácido dipicolínico (clase B) y tazobactam o ácido clavulánico (clase A). Considerando que la práctica totalidad de las carbapenemasas en *A. baumannii* en nuestro país son del tipo OXA, y que estas enzimas no se inhiben con los clásicos inhibidores de clase A, y B, la ausencia de inhibición en presencia de inhibidores clase A o B orientaría hacia la presencia de una carbapenemasa del tipo OXA.

#### 7.4.3 Detección de la actividad carbapenemasa por métodos colorimétricos basados en el cambio de pH.

Diferentes métodos colorimétricos como el CarbaNP (que utiliza rojo fenol como indicador de la acidificación el medio) y el BlueCarba (que utiliza azul de bromotimol como indicador) permiten la detección de la actividad carbapenemasa mediante viraje de color con una muy alta sensibilidad y especificidad.

1. La realización de la técnica se realizará acorde las indicaciones de los protocolos establecidos por los fabricantes/creadores. Básicamente consiste en realizar un extracto bacteriano (con el búfer B-PER II en el caso del CarbaNP o directamente la colonia en el caso del BlueCarba) y ponerlo en contacto con una solución del indicador más un antibiótico carbapenémico.
2. Tras un corto periodo de incubación (habitualmente dos horas) a 35-37°C, con o sin agitación dependiendo del método, se interpretan visualmente los resultados en comparación con un control negativo sin antibiótico carbapenémico.
3. En el caso de *Acinetobacter* spp. Se han introducido algunas modificaciones que mejoran la detección de carbapenemasas en este género y de manera concreta las de tipo OXA. En este sentido se ha modificado el protocolo inicial del CarbaNP a otro procedimiento denominado CarbAcineto NP test que incorpora una solución 5M de NaCl como paso de lisis paralelo a un incremento casi al doble en el inóculo bacteriano. En el caso del BlueCarba se han constatado mejoras en la detección del cambio de color con un mayor inóculo bacteriano.

#### 7.4.4. Caracterización del tipo de carbapenemasa mediante métodos fenotípicos basados en la utilización de inhibidores.

Se podrá aplicar a todos los aislamientos que hayan resultado positivos mediante alguna de las pruebas anteriores de cribado de carbapenemasas. Estos estudios se pueden realizar mediante difusión disco-placa o mediante dilución en agar, aunque lo más habitual es comparar los halos de inhibición de discos/tabletas de un antibiótico carbapenémico, preferiblemente meropenem (10 µg), con y sin la presencia del inhibidor específico de cada clase de carbapenemasa. También se puede realizar el test de sinergia de doble disco enfrentando, a diferentes distancias, el disco de meropenem y el del inhibidor correspondiente. Considerando que la mayoría de las carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. pertenecen al tipo OXA, y que este grupo de enzimas no se inhibe con los inhibidores de clase A, o B este ensayo sería secundario en el caso de este género. Solo ante la sospecha epidemiológica o de otra índole de la presencia de una carbapenemasa tipo no-OXA se procedería al uso de inhibidores, tal y como se ha detallado en el PNT-MMV-04 de este procedimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

## 7.5. DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

Existen diferentes aproximaciones para la detección molecular rápida de genes codificadores de carbapenemasas basadas principalmente, pero no sólo, en PCR en tiempo real, *microarray* y secuenciación. En los últimos años se han comercializado numerosos métodos moleculares basados en estas aproximaciones.

Estas técnicas se pueden realizar:

- A partir de colonia, en lugar de las pruebas fenotípicas, en aquellas cepas con pruebas fenotípicas no concluyentes o como confirmación de las pruebas fenotípicas.
- A partir de muestra de vigilancia (y eventualmente clínica), lo que permite agilizar la obtención de resultados en relación a las técnicas de cultivo.

Los procedimientos a realizar varían sustancialmente en función del método elegido y el fabricante. No obstante, es necesario tener en cuenta que la inmensa mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias y existen ciertas diferencias con las esperables en *A. baumannii* (ver punto 5.3).

En general, el procedimiento constará:

- Una primera fase de extracción y purificación del ADN bacteriano. En el mercado se encuentran disponibles gran cantidad de sistemas de purificación de ácidos nucleicos. El procedimiento de purificación se realizará siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.
- Realización del protocolo según las instrucciones de cada fabricante con el uso de iniciadores o sondas específicos de los genes buscados (ver punto 5.3).

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La expresión de los resultados variará en función del alcance, de manera que se considerarán tres situaciones distintas: a) Realización de un antibiograma para definir una cepa como MDR; b) Estudio fenotípico de la producción de carbapenemasas; y c) Detección a nivel molecular de los genes codificantes de carbapenemasas.

### 8.1 INTERPRETACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD

- Los resultados del antibiograma (halos de inhibición o CMI) muestran la no sensibilidad a al menos uno de los antibióticos carbapenémicos: **Los resultados indican la presencia de un *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) MDR.**
- Los resultados del antibiograma (halos de inhibición o CMI) muestran sensibilidad a los antibióticos carbapenémicos. **Los resultados indican la presencia de un *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) no MDR.**

### 8.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LA DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

#### 8.2.1 Interpretación de los resultados del test de Hodge modificado

- Presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora sugiere (sospecha) que la cepa **produce carbapenemasa**.
- La ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría sugiere que la cepa **NO produce carbapenemasa**.
- Inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría, resultado ininterpretable.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 10 de 12

### 8.2.2 Interpretación de los resultados de los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH

- Color amarillo/naranja de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color amarillo de la cepa problema *versus* azul/verde del control negativo (BlueCarba); o color verde de la cepa problema *versus* azul del control negativo (BlueCarba). Sugiere (sospecha) que la cepa **produce carbapenemasa**.
- Color rojo de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color verde de la cepa problema *versus* color verde del control negativo (BlueCarba); o color azul de la cepa problema *versus* color azul del control negativo (BlueCarba). Sugiere que la cepa **NO produce carbapenemasa**.

### 8.2.3. Interpretación de los resultados de las pruebas de inhibición, expresados como diámetros de las zonas de inhibición en milímetros.

Se realizarán de la siguiente manera:

No se considera este ensayo de manera rutinaria en *Acinetobacter* spp. debido a que en nuestro medio la mayoría de las carbapenemasas en *Acinetobacter* spp. son del tipo OXA sobre las cuales no está comercializado el ensayo con un inhibidor específico. Sólo ante la sospecha epidemiológica o de otra índole de la presencia de una carbapenemasa tipo no-OXA se procedería al uso de inhibidores, tal y como se ha detallado en el documento técnico PNT-MMV-04 de este procedimiento.

## 8.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LA DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES DE CARBAPENEMASAS

La interpretación de los resultados de los métodos moleculares para la detección de los genes codificadores de carbapenemasas se realizará según instrucciones específicas de cada método. La información de los resultados se realizará como:

- Si la prueba se ha realizado sobre muestra clínica: **“Se detecta mediante [método empleado] la presencia de un gen codificante de [tipo de carbapenemasa]”**
- Si la prueba se ha realizado sobre colonia bacteriana previamente identificada: **“Se aísla *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) productor de [tipo de carbapenemasa]” “Se aísla *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) MDR”**

Cabe mencionar de nuevo la muy escasa prevalencia de cepas de *Acinetobacter* spp. (o *A. baumannii*) que muestran resistencia a carbapenémicos no mediada por enzimas carbapenemasas (debido en este caso a permeabilidad reducida y/o hiperexpresión de bombas de extrusión de antibióticos). Este es un concepto que al menos, hay que tener en consideración.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 11 de 12

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

1. El test de Hodge modificado es una técnica sencilla y ampliamente utilizada en enterobacterias para la detección de la actividad carbapenemasa. Si bien también se puede utilizar en *A. baumannii*, la sensibilidad y especificidad es menor, siendo frecuentes los falsos negativos (fundamentalmente MBL, que se pueden evitar en gran parte añadiendo sulfato de zinc al medio) y de falsos positivos (fundamentalmente cepas con hiperproducción de AmpC más pérdida de CarO y/o Omp33-36 aunque este fenómeno no se ha demostrado fehacientemente). La utilización de la cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE ATCC 700603 como indicador puede mejorar el rendimiento. En cualquier caso, su lectura conjunta con las técnicas basadas en inhibidores de carbapenemasas aporta no obstante información relevante.
2. Los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH son métodos muy sensibles y específicos que necesitan de un cuidadoso cumplimiento de todos sus pasos para obtener un máximo rendimiento. Se desaconseja el uso del CarbaNP en colonias desde agar Drigalski o agar McConkey. Se recomienda también utilizar siempre cultivos frescos.
3. Pruebas fenotípicas basadas en el uso de inhibidores.

Como se ha comentado, su utilidad se reduciría en casos de sospecha de la presencia de una carbapenemasa que no sea de tipo OXA.

4. Detección de genes codificadores de carbapenemasas por técnicas moleculares.

La inmensa mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias y existen ciertas diferencias con las esperables en *A. baumannii*. Entre las carbapenemasas documentadas en *A. baumannii* que quedarían excluidas con esta aproximación destacan las tipo OXA (OXA-23,-24 -58, fundamentalmente pero también OXA-143,-235, e hiperproducción OXA-51). En caso de sospecha fenotípica o epidemiológica de este tipo de carbapenemasas deberán utilizarse pruebas de PCR específicas.

5. La detección de genes codificadores de carbapenemasas directamente sobre muestra agiliza la emisión de resultados pero no permite conocer la especie bacteriana implicada ni garantizar la presencia de una bacteria viva. En el caso de que se necesite realizar estudios de sensibilidad o de epidemiología molecular es imprescindible el cultivo de la cepa.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado "Anotaciones al procedimiento".

Este procedimiento está dirigido a la detección de las carbapenemasas adquiridas más prevalentes en *A. baumannii* según la epidemiología actual. Cambios evolutivos significativos en esta epidemiología, como podría ser la posible aparición de nuevos tipos de carbapenemasas, obligarían a un reajuste del procedimiento en consecuencia. De igual manera, tecnologías muy prometedoras para detectar la presencia de carbapenemasas en *A. baumannii*, tal como espectrometría de masas mediante MALDI-TOF, pero que se encuentran en un estadio inicial de validación, no se han incluido en el presente documento.

La presencia simultánea de carbapenemasas y mecanismos de resistencia cromosómicos puede dificultar la interpretación de las pruebas fenotípicas, en cuyo caso se requerirá la aplicación de técnicas moleculares.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-05	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta J, Merino M, Viedma E, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1064-1067.
2. Bakour S, Garcia V, Loucif L, et al. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect.* 2015 10; 7:89-93.
3. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *J Clin Microb* 2014; 52:2359-2364.
4. Girlich D, Nordmann P. CHROMagar *Acinetobacter* medium for detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. strains from spiked stools. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; pii: S0732-8893(15)00285-0.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:268-281.
6. Merino M, Poza M, Roca I, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microbial Drug Resistance* 2014; 20:259-263.
7. Pasanen T, Koskela S, Mero S, et al. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. *PLoS One* 2014; 9(1): e85854. doi: 10.1371/journal.pone.0085854. eCollection 2014.
8. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microb* 2013; 51:4281-4283.
9. Rumbo C, Gato E, López M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and  $\beta$ -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5247-5257.
10. Zander E, Fernández-González A, Schleicher X, et al. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43:375-377.





Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento para la detección del estado de portador de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR), incluyendo las cepas productoras de carbapenemasa, en muestras de vigilancia.

El alcance de este documento tiene tres niveles en función de las posibilidades de cada laboratorio: detección fenotípica de *P. aeruginosa* MDR, detección fenotípica de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasa y detección molecular de las carbapenemasas.

## 2. FUNDAMENTO

La creciente prevalencia de infecciones nosocomiales por cepas de *P. aeruginosa* MDR compromete enormemente la selección de tratamientos eficaces y, por tanto, se asocia con una elevada morbilidad y mortalidad. La prevalencia de cepas MDR se sitúa ya en cifras superiores al 30% a nivel mundial, incluyendo los hospitales españoles; aproximadamente la mitad de las cepas MDR serían además XDR (resistencia extensa). Además, estos perfiles MDR/XDR se asocian a determinados clones epidémicos (clones de alto riesgo), principalmente ST175, ST111 y ST235. Actualmente, a nivel global y en nuestro medio en particular, los fenotipos MDR/XDR están principalmente causados por la acumulación de varias mutaciones cromosómicas. Concretamente, la resistencia a beta-lactámicos está mayoritariamente causada por mutaciones que inactivan la porina OprD (resistencia a carbapenemas) y/o mutaciones que determinan la desrepresión de la beta-lactamasa cromosómica AmpC (resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos). Asimismo, las mutaciones que conducen a la hiperexpresión de bombas de expulsión juegan también frecuentemente un papel coadyuvante en los perfiles MDR/XDR. Aunque proporcionalmente es todavía mucho menos común que la resistencia mutacional, cada vez es más frecuente a nivel mundial la detección de elementos genéticos transferibles portadores de genes de carbapenemasas o beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) junto con determinantes de resistencia a aminoglucósidos. Particularmente relevantes, a nivel mundial y en España, son las metallo-beta-lactamasas (MBL). La prevalencia de MBL en aislados de *P. aeruginosa* en España ha aumentado más de 10 veces (del 0,08% al 1%) en cinco años (2003-2008) y han sido responsables de importantes brotes epidémicos. Al contrario de lo que ocurre en las enterobacterias, la MBL detectada con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* en España es con gran diferencia la VIM-2. No obstante, también se han descrito casos de VIM-1, VIM-13, VIM-20 y variantes de IMP. Entre las carbapenemasas de clase A detectadas en *P. aeruginosa* cabe destacar las de tipo GES. Entre las BLEE detectadas en *P. aeruginosa* cabe destacar las de tipo OXA, con varios derivados descritos por primera vez en España, así como las de tipo PER, VEB o BEL. En principio el hallazgo de este tipo de beta-lactamasas en nuestro país se limita todavía a casos esporádicos, si bien la dificultad de su detección podría llevarnos a infraestimar su incidencia.

De todo lo expuesto se deduce que el escenario epidemiológico de la resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*, además de ser extraordinariamente complejo, se caracteriza por presentar múltiples niveles que debemos considerar para optimizar las estrategias de vigilancia y control. Estos niveles incluyen la resistencia MDR y XDR, la resistencia mutacional y la transferible y la resistencia mediada por clones esporádicos o epidémicos (de alto riesgo). Idealmente, la vigilancia debería hacerse de todas las cepas MDR, ya que constituyen la base del problema, pero quizás las medidas de control, como el aislamiento de los pacientes o la búsqueda activa de casos de colonización, podría limitarse a las cepas XDR, mucho más preocupantes desde el punto de vista terapéutico y con unos números de incidencia más asequibles para este objetivo. Sin duda, aunque solo fuera por la transmisibilidad del mecanismo, las cepas productoras de carbapenemasas y BLEE deberían vigilarse y controlarse de forma específica. El interés de esta vigilancia específica cobra aún más fuerza con la reciente introducción de nuevas alternativas terapéuticas, como ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam, que son muy activas frente a las cepas MDR/XDR por mecanismos mutacionales (como por ejemplo la hiperproducción de AmpC) pero inactivos frente a las cepas productoras de muchas de las beta-lactamasas adquiridas, particularmente las MBL.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

### 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
2. Martínez-Martínez L (Coordinador). Eliecer-Cano M, Domínguez MA, Ezpeleta-Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla-Ortega B, Ramírez-de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 26. SEIMC 2007. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia26.pdf>.
3. Navarro F (Coordinador). Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica n° 38. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>.
4. Documento técnico PNT-MMV-04 de este procedimiento.
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versión 1.0, Diciembre 2013. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf).
6. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement. M100-S24, CLSI, Wayne, PA.
7. Normativa EUCAST vigente del año en curso, disponible en [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
8. Prospectos de instrucciones correspondientes a aquellos sistemas comerciales fenotípicos o genotípicos que se utilicen.

### 4. MUESTRAS

#### 4.1. RECOGIDA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

La toma de la muestra, su transporte y su conservación para cultivos de vigilancia se realizarán siguiendo las recomendaciones generales de la SEIMC en su “Procedimiento de Microbiología Clínica n° 1a: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología.”

Las muestras más adecuadas para determinar el estado de portador de *P. aeruginosa* MDR son los frotis faríngeo y rectal. Es recomendable que haya materia fecal en la torunda. Se utilizará un medio de transporte que impida su desecación (Amies o Stuart).

Se recomienda procesar la muestra con la mayor celeridad posible en un tiempo inferior a 24 horas; si no se va a procesar de manera inmediata es recomendable su conservación a 2-8°C para facilitar la recuperación de la bacteria a vigilar evitando el sobrecrecimiento de la microbiota comensal.

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

#### 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

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

- Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o petición mal cumplimentada.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

- Mal estado de conservación de la muestra, recogida en recipiente no adecuado: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación, recipiente no estéril.
- Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.

## 5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1. CULTIVO DE LA MUESTRA

- Como medio general para la detección de *P. aeruginosa* MDR se utilizará Agar MacConkey suplementado con meropenem (1 mg/L). Almacenar a 2-8°C durante no más de 7-10 días.
- Alternativamente, para el seguimiento de cepas MDR/XDR concretas en situaciones de epidemia o endemia se podrá utilizar Agar MacConkey suplementado con antibióticos seleccionados de acuerdo al fenotipo. Estos medios pueden contener por ejemplo varias combinaciones de ceftazidima, meropenem, tobramicina o ciprofloxacino. Finalmente, la detección de cepas productoras de carbapenemasas o BLEE puede verse favorecida por la adición al medio selectivo de cloxacilina (500 mg/L). La cloxacilina, como potente inhibidor de AmpC, inhibe la resistencia mutacional a beta-lactámicos. Por ello, el agar MacConkey suplentado con ceftazidima + cloxacilina o imipenem + cloxacilina puede aumentar la especificidad en la detección de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas, respectivamente, aunque ello iría acompañado de la no detección de cepas MDR/XDR por mecanismos de resistencia mutacionales.
- Paneles de microdilución o difusión con discos para la determinación del perfil de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa*. Los antimicrobianos a estudiar siguiendo la recomendación de Magiorakos et al. (ver referencia nº 5 de la bibliografía en este PNT) se agrupan en las 8 siguientes clases: cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima y cefepima), penicilinas+ inhibidores de beta-lactamasas (ticarcilina+ clavulánico y piperacilina+ tazobactam), monobactámicos (aztreonam), carbapenemas antipseudomónicas (imipenem, meropenem y doripenem), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina), fluoroquinolonas antipseudomónicas (ciprofloxacino, levofloxacino), ácidos fosfónicos (fosfomicina) y polimixinas (colistina y polimixina B). No obstante, conviene tener en cuenta una serie de consideraciones. En nuestro país, como en el resto de Europa, deben utilizarse los puntos de corte de sensibilidad del EUCAST para definir las categorías clínicas. Debido a las importantes diferencias en los puntos de corte, la aplicación de criterios del CLSI produce importantes discrepancias en la prevalencia de MDR y XDR, generalmente más bajas que cuando se utilizan criterios EUCAST. En la práctica, la aplicación de puntos de corte EUCAST obliga a la no consideración del aztreonam en las definiciones MDR/XDR, ya que el punto de corte actual para este antibiótico ( $S \leq 1$  mg/L) considera que *P. aeruginosa* es, de forma intrínseca, no sensible a este antibiótico. Por tanto, el aztreonam no debería considerarse ya que las definiciones sólo hacen referencia a la resistencia adquirida. De igual forma, la inexistencia de puntos de corte específicos de fosfomicina para *P. aeruginosa* hacen recomendable la no consideración de este antibiótico en las definiciones. Otra recomendación particular es la no consideración de la gentamicina entre los aminoglucósidos antipseudomónicos, por su menor actividad intrínseca. Finalmente, la evaluación de la ticarcilina-clavulánico, netilmicina, levofloxacino y polimixina B podría ser prescindible. Por el contrario, la evaluación de ceftazidima-avibactam y/o ceftolozano-tazobactam podría ser de gran utilidad para la inferencia de la presencia de beta-lactamasas adquiridas, además de su posible utilidad clínica en un futuro cercano. De hecho, uno de los mayores retos en el análisis de la resistencia en *P. aeruginosa* es la diferenciación entre resistencia cromosómica (OprD+ AmpC) y la mediada por beta-lactamasas transmisibles.

### 5.2. CONFIRMACIÓN DE IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA

Reactivos para confirmar identificación:

- Sistemas comerciales de identificación y de determinación de sensibilidad a antimicrobianos.
- Reactivos (matriz y calibradores) para la identificación mediante espectrofotometría de masas (MALDI-TOFF).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 5 de 12

#### Reactivos para la realización del Test de inhibición por cloxacilina:

- Placa de agar Mueller-Hinton.
- Disco de imipenem (10 µg).
- Disco de ceftazidima (30 µg) (opcional)
- Cloxacilina u oxacilina.

#### Reactivos para la realización del Test de Hodge modificado:

- Placa de agar Mueller-Hinton.
- Disco de meropenem (10 µg).
- Cloxacilina u oxacilina.
- Cepa *E. coli* ATCC 25922 o *K. pneumoniae* ATCC 700603.

#### Reactivos necesarios para la detección de hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos por métodos colorimétricos:

Existen diferentes métodos colorimétricos (CarbaNP, BlueCarba) que permiten la detección de actividad carbapenemasa mediante marcadores colorimétricos que indican cambio de pH. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante.

#### Reactivos para caracterización fenotípica de carbapenemasas mediante el uso de inhibidores:

- Placas de agar Müller-Hinton.
- Cloxacilina u oxacilina.
- Ácido fenil-borónico.
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA).
- Agua desionizada estéril.
- Dimetilsulfóxido (DMSO, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>).
- Tubos con agua destilada estéril.
- Agar Mueller-Hinton en placas.
- Discos de antibióticos: meropenem (10 µg), meropenem-ácido fenil-borónico (10/400-600 µg), meropenem-cloxacilina (10/600-3000 µg) y meropenem-EDTA (10/750 µg).
- Tabletas comerciales con meropenem (10 µg), meropenem/ácido dipicolínico, meropenem/cloxacilina, meropenem/ácido fenil-borónico.

### 5.3. DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS

La detección molecular de los genes codificadores de carbapenemasas puede hacerse sobre el crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo, sirviendo como confirmación de la detección fenotípica, o directamente sobre la muestra clínica (frotis faríngeo o rectal).

Existen diferentes sistemas comerciales basados principalmente, pero no sólo, en PCR a tiempo real. Se utilizarán los reactivos necesarios según especificaciones de cada fabricante. No obstante, es necesario tener en cuenta que la inmensa mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias y existen ciertas diferencias con las esperables en *P. aeruginosa*. Típicamente, estos sistemas son capaces de detectar carbapenemasas OXA-48, KPC, VIM, IMP y NDM. Si bien la OXA-48 no se ha detectado en *P. aeruginosa*, el resto de enzimas, particularmente VIM y IMP, sí que se han encontrado y por tanto los sistemas comerciales diseñados para enterobacterias pueden resultar de utilidad. Entre las carbapenemasas documentadas en *P. aeruginosa* que que-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

darían excluidas con esta aproximación destacan únicamente las del tipo GES. En caso de sospecha fenotípica o epidemiológica de este tipo de carbapenemasas deberán utilizarse pruebas de PCR específicas. Asimismo, dada la epidemiología actual de la producción de carbapenemasas en *P. aeruginosa* en nuestro país, la detección de carbapenemasas de tipo VIM mediante PCR genérica para este grupo o mediante PCR específicas para los grupos VIM-1 y VIM-2 sería suficiente para detectar la inmensa mayoría de los casos y se podría utilizar como aproximación diagnóstica de primera línea.

## 5.4. CONTROLES

Tanto para las pruebas fenotípicas como genotípicas se deben utilizar controles adecuados. De forma genérica, atendiendo a la epidemiología de *P. aeruginosa* en nuestro medio se recomienda utilizar una cepa productora de VIM-2 como control positivo de producción de carbapenemasa y una cepa deficiente en OprD e hiperproductora de AmpC como control negativo de producción de carbapenemasa y control positivo de multirresistencia mutacional. Entre las diversas cepas descritas que se podrían utilizar como control de cepa productora de VIM-2 estaría la cepa Pamb238, perteneciente al clon ST111, y como control de multirresistencia mutacional la cepa Pamb93, perteneciente al clon ST175. Ambas cepas han sido obtenidas de un estudio multicéntrico de bacteriemia por *P. aeruginosa* en hospitales españoles (ver referencia n° 1 de la bibliografía de este PNT).

## 6. APARATOS Y MATERIAL

En función del nivel del alcance, fenotípico o molecular, los aparatos y materiales necesarios serán diferentes.

### 6.1. APARATOS

#### Nivel fenotípico:

- Cabina de seguridad biológica.
- Estufa de 35°C.
- Agitador tipo vortex.
- Nevera de 4°C.
- Sistemas de identificación automático o semiautomático.
- Espectrofotómetro de masas (MALDI-TOFF).
- Congelador (-20°C).

#### Nivel molecular:

- Termobloques.
- Centrífugas.
- Termocicladores.
- Equipo de PCR a tiempo real.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

### 6.2. MATERIAL

#### Nivel fenotípico:

- Asas de siembra.
- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Pipetas Pasteur estériles.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

- Escala del 0,5 de MacFarland o cualquier otro sistema de medida de turbidez.
- Contenedores para desechar material infeccioso.

#### Nivel molecular:

- Pipetas calibradas.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Sistemas de purificación de ADN.

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

## 7. PROCEDIMIENTO

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

1. Atemperar los medios de cultivo previamente a su uso. Como medio general para la detección de *P. aeruginosa* MDR se utilizará Agar MacConkey suplementado con meropenem (1 mg/L)
2. Registrar y numerar la muestra.
3. Rotular las placas con medio con el número de la muestra, la fecha y el tipo de muestra.
4. Con la torunda descargar la muestra en un tercio aproximadamente de cada placa, rotando la torunda sobre sí misma.
5. Extender la muestra con asa estéril de manera cualitativa para aislar colonias. Incubar las placas inoculadas en estufa a 35-37°C.
6. Realizar lectura a las 24 horas del cultivo de las muestras. Si en las placas no se detecta aislamiento de microorganismos, prolongar la incubación hasta las 48 horas.

### 7.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *P. aeruginosa*

La inspección visual acompañada de la prueba de la oxidasa suele ser suficiente para la identificación de *P. aeruginosa*. En cualquier caso, la identificación se confirmará por MALDI-TOFF o por algún sistema comercial de identificación bacteriana.

### 7.3. CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO MDR/XDR

Se realizará un antibiograma (por ejemplo por microdilución o difusión disco-placa) para determinar el perfil de resistencia. De acuerdo con las recomendaciones actuales se considerará MDR si la cepa es no sensible (I+R) al menos a un antibiótico de al menos 3 clases diferentes y XDR si es no sensible a al menos un antibiótico en todas las clases menos una o dos. El propio fenotipo de resistencia puede sugerir en ocasiones la presencia de carbapenemasas. Tal es el caso de perfiles de resistencia que incluyen las penicilinas, cefalosporinas y las carbapenemasas pero no los monobactámicos (aztreonam), sugestivos de producción de MBL. No obstante, es necesario tener en cuenta que la resistencia a aztreonam, independientemente de la producción de MBL, es frecuente en *P. aeruginosa*. De igual forma, debe tenerse en cuenta que atendiendo a los puntos de corte actuales de EUCAST la inmensa mayoría de las cepas sin mecanismos adquiridos de resistencia a aztreonam quedan incluidas en la categoría intermedia. En caso de estar disponible, la evaluación de la resistencia a ceftazidima-avibactam y/o ceftolozano-tazobactam puede resultar de gran utilidad para la inferencia de la presencia de beta-lactamasas adquiridas (carbapenemasas y BLEE).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

## 7.4. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASA Y CARACTERIZACIÓN DE LA CLASE DE CARBAPENEMASA

Se podrán utilizar una o múltiples de las siguientes aproximaciones:

### 7.4.1 Ensayo de inhibición por cloxacilina (u oxacilina).

La inhibición de la resistencia a beta-lactámicos por cloxacilina es un marcador sensible y específico de resistencia cromosómica (OprD+ AmpC) en *P. aeruginosa* y por tanto se puede utilizar como ensayo de cribado en la detección de beta-lactamasas adquiridas, incluyendo BLEE y carbapenemasas. Existen básicamente dos aproximaciones para la detección de carbapenemasas: (i) utilización de discos de imipenem (10 µg) suplementados o no con cloxacilina (4.000 µg) o (ii) utilización de discos de imipenem en agar Mueller-Hinton suplementado o no con cloxacilina (500 mg/L). En esta segunda alternativa se puede añadir también un disco de ceftazidima (30 µg), sirviendo de utilidad para el cribado de BLEE en *P. aeruginosa*.

### 7.4.2 Test de Hodge modificado con disco de meropenem según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Este procedimiento está optimizado para enterobacterias, aunque se puede utilizar también para *P. aeruginosa* pero con menor sensibilidad y especificidad. El rendimiento del ensayo puede mejorar utilizando la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como indicador.

1. Se inocula una placa de Mueller-Hinton con una suspensión 1:10 del 0,5 de McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (o *K. pneumoniae* ATCC 700603).
2. Se añaden 10 µL de una solución 60 mg/mL de cloxacilina o 100 mg/mL de oxacilina a un disco de meropenem (10 µg); la concentración final de cloxacilina/oxacilina será de 600 o 1000 µg/disco, respectivamente.
3. Se deja seca el disco de meropenem durante 10 minutos y se coloca en el centro de la placa inoculada.
4. Se inocula la cepa problema (3-5 colonias con un asa de 10 µL) formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa.
5. Después de 18-24 horas de incubación a 35°-37°C se examina visualmente el margen del halo de inhibición en la zona adyacente a la estría.

### 7.4.3. Medición de la hidrólisis de los antibióticos carbapenémicos mediante espectrofotometría.

Se considera una técnica rápida y de referencia pero que no es fácilmente asequible para la mayoría de los laboratorios de Microbiología Clínica. Permite la caracterización de la clase de carbapenemasas comparando el nivel de hidrólisis en presencia y ausencia de inhibidores como EDTA o ácido dipicolínico (clase B) y tazobactam o ácido clavulánico (clase A) ayudan a la caracterización de este tipo de enzimas.

### 7.4.4 Detección de la actividad carbapenemasa por métodos colorimétricos basados en el cambio de pH.

Diferentes métodos colorimétricos como el CarbaNP (que utiliza rojo fenol como indicador de la acidificación el medio) y el BlueCarba (que utiliza azul de bromotimol como indicador) permiten la detección de la actividad carbapenemasa mediante viraje de color con una muy alta sensibilidad y especificidad.

1. La realización de la técnica se realizará acorde las indicaciones de los protocolos establecidos por los fabricantes/creadores. Básicamente consiste en realizar un extracto bacteriano (con el búfer B-PER II en el caso del CarbaNP o directamente la colonia en el caso del BlueCarba) y ponerlo en contacto con una solución del indicador más un antibiótico carbapenémico.
2. Tras un corto periodo de incubación (habitualmente dos horas) a 35-37°C, con o sin agitación dependiendo del método, se interpretan visualmente los resultados en comparación con un control negativo sin antibiótico carbapenémico.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

#### 7.4.5. Caracterización del tipo de carbapenemasa mediante métodos fenotípicos basados en la utilización de inhibidores.

Se podrá aplicar a todos los aislamientos que hayan resultado positivos mediante alguna de las pruebas anteriores de cribado de carbapenemasas. Estos estudios se pueden realizar mediante difusión disco-placa o mediante dilución en agar, aunque lo más habitual es comparar los halos de inhibición de discos/tabletas de un antibiótico carbapenémico, preferiblemente meropenem (10 µg), con y sin la presencia del inhibidor específico de cada clase de carbapenemasa. También se puede realizar el test de sinergia de doble disco enfrentando, a diferentes distancias, el disco de meropenem y el del inhibidor correspondiente.

1. Se prepararán las soluciones madre de inhibidores específicos de carbapenemasa de clase A (ácido fenilborónico; disuelto en DMSO y agua estéril), de clase B (EDTA; disuelto en agua estéril), o de β-lactamasas del tipo AmpC (cloxacilina; disuelta en agua estéril).
2. Posteriormente se añadirá el volumen (no más de 10 µL de volumen total) adecuado de la solución de inhibidor a los discos de meropenem según la cantidad final por disco que se desee: 400-600 µg de ácido fenilborónico, 600 µg de cloxacilina (según algunos estudios mejor 3.000 µg para *P. aeruginosa*) o 750 µg de EDTA.
3. Dejar absorber la solución al menos 30 minutos y asegurarse que los discos están suficientemente secos antes de su aplicación.  
Existen kits comerciales, validados para enterobacterias, basados en esta misma técnica, con tabletas que contienen 10 µg de meropenem, meropenem más cloxacilina, meropenem más ácido dipicolínico y meropenem más ácido fenilborónico.
4. Rotular con el número de muestra un tubo de agua destilada estéril por cada cepa en cultivo puro al que se le vaya a realizar la determinación.
5. Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de MacFarland. Agitar con un agitador Vórtex.
6. Impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie las placas de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones.
7. Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías, se colocarán los discos de meropenem, meropenem+ácido fenilborónico, meropenem+EDTA y meropenem+cloxacilina; o bien las tabletas correspondientes de los kits comerciales. En el caso de utilizar el test de sinergia de doble disco se colocará el disco que contiene el inhibidor a ensayar (por ejemplo EDTA) en el centro de la palca y se añadirán discos de meropenem (y/o imipenem) a varias distancias (por ejemplo 10 y 20 mm). Se incubará a 35-37°C durante 18-24 horas.

Existen diferentes métodos comerciales basados en estos mismos principios que utilizan tiras de gradiente de antibiótico o tabletas de antibióticos. El procedimiento a seguir y la interpretación de los resultados se realizarán según las indicaciones de los fabricantes.

### 7.5. DETECCIÓN DE GENES CODIFICADORES DE CARBAPENEMASAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

Existen diferentes aproximaciones para la detección molecular rápida de genes codificadores de carbapenemasas basadas principalmente, pero no sólo, en PCR en tiempo real, *microarray* y secuenciación. En los últimos años se han comercializado numerosos métodos moleculares basados en estas aproximaciones.

Estas técnicas se pueden realizar:

- a. A partir de colonia, en lugar de las pruebas fenotípicas, en aquellas cepas con pruebas fenotípicas no concluyentes o como confirmación de las pruebas fenotípicas.
- b. A partir de muestra de vigilancia (y eventualmente clínica), lo que permite agilizar la obtención de resultados en relación a las técnicas de cultivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 10 de 12

Los procedimientos a realizar varían sustancialmente en función del método elegido y el fabricante. No obstante, es necesario tener en cuenta que la inmensa mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias (ver el documento técnico de este procedimiento dedicado a enterobacterias, PNT-MMV-04) y existen ciertas diferencias con las esperables en *P. aeruginosa* (ver punto 5.3).

En general, el procedimiento constará de:

1. Una primera fase de extracción y purificación del ADN bacteriano. En el mercado se encuentran disponibles gran cantidad de sistemas de purificación de ácidos nucleicos. El procedimiento de purificación se realizará siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.
2. Realización del protocolo según las instrucciones de cada fabricante con el uso de iniciadores o sondas específicos de los genes buscados.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 8.1. INTERPRETACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD

- a. Perfil MDR. Si la cepa es no sensible (I+R) al menos a un antibiótico de al menos 3 clases diferentes, informar que se aísla *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR).
- b. Perfil XDR (opcional). Si la cepa es no sensible (I+R) a al menos un antibiótico en todas las clases menos una o dos, informar que se aísla *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia extensa (XDR).

### 8.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL TEST DE INHIBICIÓN POR CLOXACILINA:

- a. Diferencia  $\leq 5$  mm entre los halos de inhibición de imipenem en presencia y ausencia de cloxacilina sugiere que la cepa **produce carbapenemasa**.
- b. Diferencia  $> 5$  mm entre los halos de inhibición de imipenem en presencia y ausencia de cloxacilina sugiere la que la resistencia se debe a mecanismos cromosómicos (OprD+ AmpC) y la cepa **NO produce carbapenemasa**.

### 8.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL TEST DE HODGE MODIFICADO

- a. Presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora sugiere que la cepa **produce carbapenemasa**.
- b. La ausencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría sugiere que la cepa **NO produce carbapenemasa**.
- c. Inhibición del crecimiento de la cepa indicadora a los lados de la estría, resultado ininterpretable.

### 8.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS BASADOS EN EL CAMBIO DE pH

- a. Color amarillo/naranja de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color amarillo de la cepa problema *versus* azul/verde del control negativo (BlueCarba); o color verde de la cepa problema *versus* azul del control negativo (BlueCarba). Sugiere que la cepa **produce carbapenemasa**.
- b. Color rojo de la cepa problema *versus* color rojo del control negativo (CarbaNP); color verde de la cepa problema *versus* color verde del control negativo (BlueCarba); o color azul de la cepa problema *versus* color azul del control negativo (BlueCarba). Sugiere que la cepa **NO produce carbapenemasa**.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 11 de 12

## 8.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN, EXPRESADOS COMO DIÁMETROS DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS

Se realizarán de la siguiente manera:

- a. **Carbapenemasa de clase A.** Halo de meropenem+ácido fenil borónico  $\geq 5$  mm que el halo de meropenem y halo de meropenem/cloxacilina  $< 5$  mm que el halo de meropenem.
- b. **Carbapenemasa de clase B.** Halo de meropenem+EDTA o ácido dipicolínico  $\geq 5$  mm que el halo de meropenem.

## 8.6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS MÉTODOS MOLECULARES

La interpretación de los resultados de los métodos moleculares para la detección de los genes codificadores de carbapenemasas se realizará según instrucciones específicas de cada método. La información de los resultados se realizará como:

- a. Si la prueba se ha realizado sobre muestra clínica: **“Se detecta mediante [método empleado] la presencia de un gen codificante de [tipo de carbapenemasa]”**
- b. Si la prueba se ha realizado sobre colonia bacteriana previamente identificada: **“Se aisla [nombre de la especie] productora de [tipo de carbapenemasa]”**

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico.

La supervisión de las técnicas y la interpretación y emisión de los resultados deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

1. El test de inhibición por cloxacilina es una prueba sencilla que tiene utilidad como técnica de cribado de producción de beta-lactamasas adquiridas (carbapenemasas y BLEE) en *P. aeruginosa*. No obstante, la experiencia es todavía limitada y son necesarios más estudios para determinar de forma más precisa su especificidad y sensibilidad.
2. El test de Hodge modificado es una técnica sencilla y ampliamente utilizada en enterobacterias para la detección de la actividad carbapenemasa. Si bien también se puede utilizar en *P. aeruginosa*, la sensibilidad y especificidad es menor, siendo frecuentes los falsos negativos (fundamentalmente MBL, que se pueden evitar en gran parte añadiendo sulfato de zinc al medio) y de falsos positivos (fundamentalmente cepas con hiperproducción de AmpC más pérdida de OprD). La utilización de la cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE ATCC 700603 como indicador puede mejorar el rendimiento. En cualquier caso, su lectura conjunta con las técnicas basadas en inhibidores de carbapenemasas aporta no obstante información relevante.
3. Los métodos colorimétricos basados en el cambio de pH son métodos muy sensibles y específicos que necesitan de un cuidadoso cumplimiento de todos sus pasos para obtener un máximo rendimiento. Se desaconseja el uso del CarbaNP en colonias desde agar Drigalski o agar McConkey. Se recomienda también utilizar siempre cultivos frescos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Métodos microbiológicos para la detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> multirresistente en muestras de vigilancia	PNT-MMV-06	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

4. Pruebas fenotípicas basadas en el uso de inhibidores.  
La presencia simultánea de carbapenemasas y mecanismos de resistencia cromosómicos (pérdida de OprD + hiperproducción de AmpC) puede dificultar la interpretación de las pruebas fenotípicas. Para estos casos, y en general para acelerar la obtención del resultado confirmatorio a nivel de clase, se aconseja la utilización de técnicas moleculares. Además, el EDTA tiene una actividad intrínseca frente a algunas cepas (también se puede observar con el ácido dipicolínico pero con menos frecuencia), en estos casos se puede detectar una recuperación en el límite (5-6 mm) en ausencia de carbapenemasas de clase B, este hecho se puede evaluar probando el halo de inhibición que tiene un disco que contenga sólo EDTA.
5. Detección de genes codificadores de carbapenemasas por técnicas moleculares.  
La inmensa mayoría de los sistemas comerciales de PCR disponibles en los laboratorios de Microbiología están diseñados para detectar las principales carbapenemasas documentadas en enterobacterias y existen ciertas diferencias con las esperables en *P. aeruginosa*. Entre las carbapenemasas documentadas en *P. aeruginosa* que quedarían excluidas con esta aproximación destacan las de tipo GES. En caso de sospecha fenotípica o epidemiológica de este tipo de carbapenemasas deberán utilizarse pruebas de PCR específicas.
6. La detección de genes codificadores de carbapenemasas directamente sobre muestra agiliza la emisión de resultados pero no permite conocer la especie bacteriana implicada ni garantizar la presencia de una bacteria viva. En el caso de que se necesite realizar estudios de sensibilidad o de epidemiología molecular es imprescindible el cultivo de la cepa.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones de este procedimiento están en gran parte condicionadas por las características particulares de cada técnica, según se refleja en el apartado "Anotaciones al procedimiento".

Este procedimiento está dirigido a la detección de las carbapenemasas adquiridas más prevalentes en *P. aeruginosa* según la epidemiología actual. Cambios evolutivos significativos en esta epidemiología, como podría ser la posible aparición de nuevos tipos de carbapenemasas, obligarían a un reajuste del procedimiento en consecuencia.

La presencia simultánea de carbapenemasas y mecanismos de resistencia cromosómicos (pérdida de OprD + hiperproducción de AmpC) puede dificultar la interpretación de las pruebas fenotípicas, en cuyo caso se requerirá la aplicación de técnicas moleculares.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 59:6349-6357.
2. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, et al. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2013; 51:3846-3848.
3. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, et al. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34:1467-1474.
4. Juan Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en *Pseudomonas* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28 Suppl 1:19-28.
5. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:268-281.
6. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 2015; 21-22:41-59.
7. Pasteran F, Veliz O, Faccone D, et al. A simple test for the detection of KPC and metallo- $\beta$ -lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17:1438-1441.