



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos

María Isabel Morosini^{a,*}, Emilia Cercenado^b, Carmen Ardanuy^c y Carmen Torres^d

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, España

^d Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de la Rioja, Logroño, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de septiembre de 2011

Aceptado el 8 de septiembre de 2011

On-line el 29 de noviembre de 2011

Palabras clave:

Staphylococcus

Enterococcus

Streptococcus pneumoniae

Antibiograma

Fenotipos de resistencia

R E S U M E N

La resistencia de los microorganismos de aislamiento clínico frecuente requiere, por parte del laboratorio de microbiología, de la realización de pruebas que permitan la detección fenotípica de los mecanismos subyacentes responsables de los perfiles observados *in vitro*. La comunicación de estos fenotipos, ya sea inferidos o demostrados, permite adecuar el tratamiento antibiótico y reunir información para el seguimiento epidemiológico de las resistencias. En este trabajo se detallan las diferentes pruebas que se realizan para la detección fenotípica de la resistencia a las principales familias de antimicrobianos utilizados frente a los microorganismos grampositivos de mayor incidencia clínica como son *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Streptococcus pneumoniae*. En *Staphylococcus*, se describen las pruebas fenotípicas para evidenciar los mecanismos de resistencia a betalactámicos así como a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B), la resistencia disminuida a glucopéptidos, a aminoglucósidos, a linezolid y a mupirocina. En *Enterococcus* se detallan las pruebas para detectar los fenotipos de resistencia a glucopéptidos y la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos. En *S. pneumoniae*, se destaca la importancia de la detección de resistencia a la penicilina y la sensibilidad disminuida a cefalosporinas de 3.^a generación así como la sensibilidad disminuida o la resistencia a fluoroquinolonas.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Phenotypic detection of resistance mechanisms in gram-positive bacteria

A B S T R A C T

Antimicrobial resistance mechanisms among clinically relevant gram-positive microorganisms can be demonstrated using phenotypic tests that enable the interpretation of underlying mechanisms responsible for the *in vitro* resistance. The reporting of these mechanisms, either inferred or demonstrated, helps in the adjustment of clinical treatments and the epidemiological follow up of resistance traits. In the present work, phenotypic tests for detection of antimicrobial resistance mechanisms involving the most frequent antimicrobial families used against *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. and *Streptococcus pneumoniae* are analysed. In the case of *Staphylococcus*, phenotypic tests to reveal the mechanisms of resistance against beta-lactams, macrolides, lincosamides and streptogramin B (MLS_B), as well as intermediate susceptibility to glycopeptides, resistance to aminoglycosides, mupirocin and linezolid are reviewed. Tests to detect glycopeptide resistance and high-level aminoglycoside resistance among enterococci are analysed. Detection of penicillin resistance, as well as diminished susceptibility to third generation cephalosporins, together with diminished susceptibility or even resistance to fluoroquinolones is also detailed.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Staphylococcus

Enterococcus

Streptococcus pneumoniae

Antibiogram

Resistance phenotypes

Introducción

El impacto clínico de la resistencia antimicrobiana requiere el estudio de los mecanismos implicados con el fin de contribuir a una adecuación rápida y dirigida del tratamiento así como para el seguimiento y el control epidemiológicos.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmorosini.hrc@salud.madrid.org (M.I. Morosini).

En la presente revisión se detallan las pruebas *in vitro* para la detección e inferencia fenotípica de los mecanismos de resistencia subyacentes más frecuentes en los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* y en *Streptococcus pneumoniae* frente a las familias de antimicrobianos de uso habitual. En el caso de los estafilococos se describen las pruebas para la detección de resistencia a los betalactámicos, en particular a la oxacilina en sus distintas formas, homogénea, heterogénea y *borderline*; los mecanismos implicados en la resistencia a MLS_B (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B); los que afectan a los aminoglucósidos; al linezolid y a la mupirocina así como los responsables de la sensibilidad disminuida a los glucopéptidos. En los enterococos se abordan la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (gentamicina y estreptomina) y la resistencia a los glucopéptidos. Finalmente, en el caso de neumococo, se detalla la resistencia a los betalactámicos y las diferentes PBP implicadas en cada caso con referencia explícita a la interpretación de los distintos niveles de sensibilidad según se trate de aislados meníngeos o no meníngeos. Asimismo, en esta especie se analiza la resistencia a las fluoroquinolonas y el fundamento del desarrollo escalonado de la misma así como las pruebas para la detección del primer o bajo nivel de resistencia a estos compuestos. Los puntos de corte considerados para la interpretación de la sensibilidad son los indicados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) si bien en determinados casos se incluyen los correspondientes al *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2011) y al *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (SFM, 2010)¹⁻³.

Resistencia a los antimicrobianos en estafilococos

Resistencia a los betalactámicos

Resistencia a las penicilinas por producción de betalactamasa

El fenotipo de resistencia a la penicilina mediado por betalactamasa(s) en estafilococo implica resistencia a todas las penicilinas excepto a las isoxazolilpenicilinas: oxacilina, meticilina, cloxacilina y nafcilina así como sensibilidad a las combinaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam), a las cefalosporinas y a las carbapenemas.

Las penicilinas estafilocócicas son betalactamasas de clase A, por tanto, sensibles a los inhibidores clásicos ya mencionados y de las que se han descrito cuatro tipos: A, B, C y D, si bien la más frecuente es la de tipo C⁴. Algunas de estas penicilinas pueden hidrolizar ciertas cefalosporinas en presencia de inóculos elevados (efecto de inóculo). Así por ejemplo, existe un marcado efecto de inóculo sobre la cefalexina si el estafilococo produce las betalactamasas de tipo A o C y un efecto de inóculo moderado sobre la cefalotina si produce las de tipo B o C. En ningún caso existe efecto de inóculo frente a cefuroxima ni frente a ceftriaxona⁵.

Detección fenotípica de resistencia por producción de betalactamasas.

Para la detección de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina por producción de betalactamasa es más adecuado utilizar un disco de 10 unidades de penicilina que un disco de 10 µg de ampicilina. El resultado obtenido con este disco de penicilina se debe extrapolar a todas las penicilinas lábiles a la acción de la penicilinas, como ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. Para la determinación de la CMI a las penicilinas se debe utilizar el medio de Mueller-Hinton, cuya concentración de cationes (Ca⁺² y Mg⁺²) debe estar ajustada en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo; se requiere un inóculo equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y entre 18-20 horas de incubación a 35-37 °C. Cuando el halo de inhibición con el disco de penicilina de 10 unidades sea de ≥ 29 mm (sensible) o por dilución en caldo o en agar, la CMI de

penicilina sea de ≤ 0,12 mg/L (sensible) se debe confirmar que el microorganismo es realmente sensible a las penicilinas; para ello, se realiza una prueba con la cefalosporina cromogénica nitrocefina utilizando las colonias crecidas en el borde del halo de inhibición de la penicilina ya que en estas, la producción de penicilinas ha sido inducida por la incubación previa en presencia del antimicrobiano. Esta prueba consiste en depositar con el asa parte de esas colonias sobre un disco impregnado con el nitrocefina que al hidrolizarse en presencia de la betalactamasa experimenta un cambio en su estructura dando un producto coloreado (naranja-rojo)⁶.

Resistencia a la meticilina: homogénea y heterogénea

La resistencia a la meticilina, más frecuente entre las diferentes especies de estafilococos coagulasa negativa (ECN, con la excepción de *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*) que en *S. aureus*, se debe a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, supernumeraria, que posee baja afinidad por todos los betalactámicos y por tanto implica resistencia a todos estos compuestos con la excepción, hasta el presente, de la cefalosporina ceftarolina y de la carbapenema razupenem, ninguna de las cuales ha sido aún introducida para uso clínico^{7,8}.

En España, la prevalencia de resistencia a la meticilina en *S. aureus* (SARM) se mantiene en torno al 30%, mientras que entre las diferentes especies de ECN (ECNRM) las cifras oscilan entre el 60-70%⁹.

S. aureus posee cuatro PBP de las cuales la 1, 2 y 3 son esenciales. La PBP de baja afinidad denominada PBP2a o PBP2', de 78 kDa, está codificada por el gen cromosómico *mecA*. La expresión de la resistencia mediada por este gen es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad así como por la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. Esta expresión, tanto en SARM como ECNRM, puede ser homogénea o heterogénea. En las cepas que presentan resistencia homogénea o de alto nivel a la oxacilina, la mayor parte de la población expresa dicha resistencia. Las cepas con expresión heterogénea (CMI de oxacilina 1-16 mg/L) se caracterizan porque solo una pequeña proporción de la población (≤ 0,1%) sobrevive a concentraciones de oxacilina superiores a 10 mg/L, mientras que la mayor parte no es viable a bajas concentraciones del antimicrobiano (1-5 mg/L). La mayoría de los aislamientos clínicos presentan este patrón de heteroresistencia bajo las condiciones rutinarias de cultivo. Sin embargo, las cepas heterogéneas pueden aparecer como homogéneas bajo ciertas condiciones, como el crecimiento en un medio hipertónico (con 2% de NaCl) o con una incubación a 30 °C. Estos cambios en la expresión de la resistencia bajo diferentes condiciones de cultivo son transitorios y solo de expresión fenotípica^{6,10}.

Detección fenotípica de resistencia a la oxacilina. La resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de oxacilina (1 µg) y/o cefoxitina (30 µg) o por dilución en caldo o en agar. Para ello se utiliza el medio de Mueller Hinton con el agregado de 2% de NaCl en el caso de realizar los métodos de dilución y además ajustado con cationes (Ca⁺² y Mg⁺²) en el caso de que se realice mediante el método de dilución en caldo. El inóculo empleado es el equivalente al 0,5 de la escala de McFarland y se requieren 24 horas completas de incubación en atmósfera aerobia a 35 °C. La incubación a temperaturas superiores a 35 °C puede impedir la detección de esta resistencia. Una cepa de *S. aureus* se considera resistente a la oxacilina cuando el halo de inhibición de la oxacilina es ≤ 10 mm o cuando la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L. En el caso de los ECN, una cepa se considera resistente a la oxacilina cuando la CMI es ≥ 0,5 mg/L, excepto en *S. lugdunensis* que se considera resistente si la CMI de oxacilina es ≥ 4 mg/L^{10,6}.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3401761>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3401761>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)