

TRABAJO FIN DE MÁSTER

ESTUDIO DE LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE EL MEDIO DE CULTIVO CROMOGÉNICO CHROMID® ESBL

Álvaro Romo Ibáñez

Máster en Investigación y Avances en Microbiología

Universidad de Granada

Julio de 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antibióticos β-lactámicos.....	1
1.2. Glucopéptidos	3
1.3. Resistencia a los antibióticos β-lactámicos y glucopéptidos.....	3
1.3.1. Mecanismos independientes de modificaciones del antibiótico	4
1.3.2. Mecanismos dependientes de la modificación de los antibióticos β -lactámicos.....	5
1.4. Principales bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos β-lactámicos y glucopéptidos.....	9
1.5. Detección fenotípica rápida de bacterias resistentes a β-lactámicos y glucopéptidos.....	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1. Estudio retrospectivo.....	15
3.2. Estudio prospectivo	18
4. RESULTADOS	21
4.1. Estudio retrospectivo.....	21
4.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados gramnegativos .	21
4.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de aislados grampositivos.....	26
4.2. Estudio prospectivo	27
5. DISCUSIÓN.....	30
5.1. Estudio retrospectivo.....	30
5.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados gramnegativos .	30
5.1.2. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados grampositivos ..	34
5.2. Estudio prospectivo	35
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en los últimos años en un grave inconveniente a nivel mundial. El tratamiento de las bacterias que poseen dichas resistencias cada vez supone un coste económico mayor a la par que un aumento de las muertes debido a su ineffectividad. Los antibióticos β -lactámicos y los glucopéptidos son dos de los principales grupos de antibióticos más empleados a la hora de tratar infecciones bacterianas, provocando a su vez una aparición de resistencia aún mayor hacia estos antibióticos. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, es de suma importancia desarrollar métodos efectivos y baratos capaces de detectar clínicamente a dichas bacterias, como es el caso del medio estudiado en este trabajo: CRHOMID ESBL. Este medio está diseñado específicamente para detectar bacterias productoras de BLEE, no obstante, el objetivo de este estudio es evaluar su potencial a la hora de detectar otros tipos de resistencias gracias a la adición de discos de antibióticos. Paralelamente, se realizó un estudio epidemiológico de las colonizaciones por agentes multirresistentes de pacientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada. Los resultados mostraron un patrón de las cepas productoras de BLEE de sensibilidad a imipenem y cefoxitina, mientras que las productoras de carbapenemasas resultaron resistentes a cefoxitina en su gran mayoría. A pesar de estos modelos, el empleo de técnicas más sensibles para detectar resistencias no ha de descartarse. Por otro lado, se estudió la capacidad del medio a la hora de detectar bacterias grampositivas resistentes a vancomicina y resultó ser capaz de detectar enterococos resistentes a dicho antibiótico sin la necesidad de adicionar un disco de vancomicina. Por último, el estudio epidemiológico mostró colonizaciones bacterianas incluidos en la lista propuesta por la Organización Mundial de la Salud como los principales patógenos multirresistentes y, además, los frotis nasofaríngeos mostraron una mayor rentabilidad a la hora de detectar *Staphylococcus aureus* metiR y *Stenotrophomonas maltophilia*, en contraposición, los frotis rectales detectaron más eficientemente *Klebsiella pneumoniae* BLEE, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, es necesario evaluar series más amplias.

1. INTRODUCCIÓN

El término antibiótico se refiere, en un amplio sentido, a un agente quimioterapéutico que inhibe o suprime el crecimiento de bacterias. Los primeros eran de origen natural, como por ejemplo penicilinas o estreptomicina, producidas por hongos o bacterias respectivamente. Hoy en día, se emplean tanto antibióticos naturales como sintéticos, que se agrupan según su mecanismo de acción o su estructura química (1). El empleo de antibióticos no es uniforme globalmente, pero existen ciertos grupos que mundialmente destacan más que otros por su consumo, efectos indeseables o espectro restringido, como son los β -lactámicos y los glucopéptidos (2).

1.1. Antibióticos β -lactámicos.

El grupo de antibióticos más utilizado a nivel global es el de los β -lactámicos debido en gran parte a su amplio espectro de actuación bacteriana, ya que son activos tanto contra bacterias grampositivas como gramnegativas, entre las que se incluyen: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Neisseria* spp. o *Pseudomonas aeruginosa* (3,4). El principal mecanismo de acción de este grupo antimicrobiano es la inhibición del entrecruzamiento de peptidoglucano que llevan a cabo las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), provocando en la pérdida de integridad de la pared celular y por consiguiente la lisis celular (3,5–7). La principal característica de los antibióticos pertenecientes a este grupo es la presencia del anillo β -lactámico. Dicho anillo va acompañado de un radical que, dependiendo de su naturaleza, discrimina entre los distintos conjuntos de antibióticos β -lactámicos que se describe a continuación (Figura 1) (8–10).

Penicilinas. Su estructura se basa en la unión del anillo de tiazolidina al β -lactámico y en la presencia de una cadena lateral unida al carbono 6 de este último. Pueden clasificarse, según su espectro de acción en: Penicilinas de primera generación, penicilinas anti-estafilocócicas, aminopenicilinas y penicilinas anti-pseudomonas (8–10).

Cefalosporinas. En el caso de las cefalosporinas, el anillo β -lactámico se encuentra unido a dihidrotiazina, dando lugar a un grupo cefemo. Estas moléculas han sufrido a lo

largo del tiempo diversas modificaciones con el fin de ampliar su espectro de actividad y mejorar sus propiedades frente a la acción de β -lactamasas. Dependiendo de su función general, las cefalosporinas se dividen en: cefalosporinas de primera generación (cefalotina, cefalexima o cefazolina), cefalosporinas de segunda generación (cefaclor, cefuroxima, y el grupo de las cefamicinas), cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftazidima, cefixima o cefpodoxime) y cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y cefpirome) (8,10–13).

Monobactanes. Su estructura se basa en tan sólo un anillo β -lactámico, y el único antibiótico que se aplica clínicamente es el aztreonam (8,10).

Carbapenemes. Este grupo se caracteriza por la unión simultánea de un anillo insaturado de carbonos al anillo β -lactámico y a una molécula de nitrógeno. Poseen el espectro de actividad frente a microorganismos más amplio dentro de esta familia. Los principales miembros de este grupo son: imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem (3,8,10).

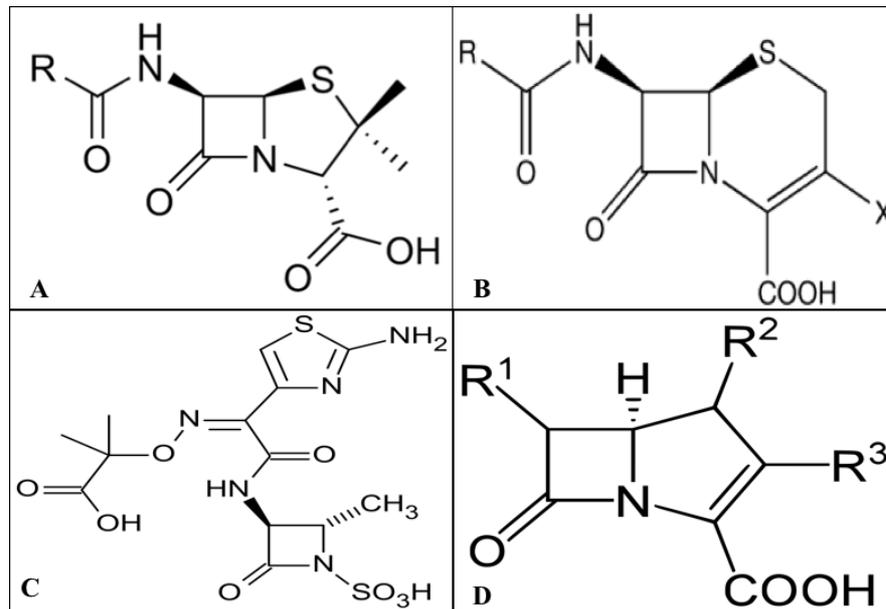


Figura 1. Estructura química de: A, penicilinas; B, cefalosporinas; C, monobetalactámicos y D, carbapenemes (8).

1.2. Antibióticos Glucopéptidos

Esta familia de antibióticos también actúa sobre la pared celular bacteriana, pero, a diferencia de los β -lactámicos, los glucopéptidos inhiben la segunda fase de formación del peptidoglucano, estableciendo un complejo con la D-alanina del mismo. Su espectro de actividad es muy reducido, ya que tan sólo son activos frente a bacterias grampositivas como: *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *Corynebacterium* spp. o *Enterococcus* spp.. El uso de los glucopéptidos es sólo hospitalario, ya que se emplean cuando se localizan infecciones provocadas por microorganismos resistentes a otras familias de antibióticos y su administración no controlada puede llegar a provocar cierto grado de toxicidad. Los principales glucopéptidos son vancomicina y teicoplanina (Figura 2) (10,14).

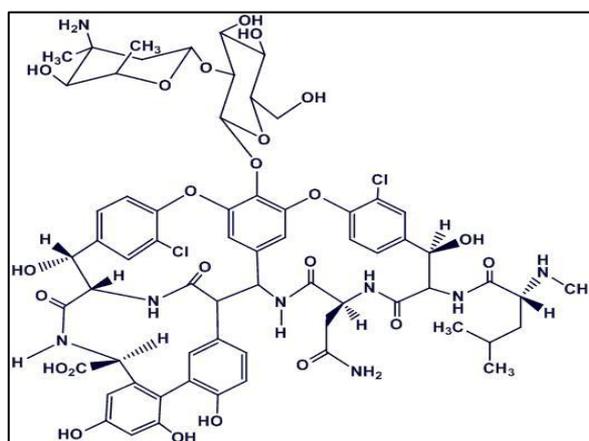


Figura 2. Estructura química de la vancomicina (15).

La época de innovación y progreso que el descubrimiento de los antibióticos supuso en lo que respecta al tratamiento de infecciones bacterianas se ha visto atenuada, desde el principio, por la aparición de microorganismos resistentes (16). La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un grave problema a nivel mundial.

1.3. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos y glucopéptidos

Los principales sucesos que se deben llevar a cabo para que un microorganismo desarrolle resistencia a los antibióticos son fundamentalmente dos. En primer lugar, el organismo ha de entrar en contacto con la molécula antibiótica y, posteriormente, ha de

desarrollar un mecanismo de resistencia frente a ese antibiótico, a la vez que un proceso para transferir dicho mecanismo a la descendencia (17). Generalmente, una bacteria desarrolla resistencia frente a los antibióticos bien modificando la diana de acción del mismo o bien reduciendo la concentración del antibiótico, ya sea por la alteración de éste o por su flujo transmembrana (18).

1.3.1. Mecanismos independientes de modificaciones del antibiótico

La modificación de determinados genes involucrados en la actividad antibiótica puede llegar a causar resistencia a dichos antibióticos. Estos genes pueden codificar, por ejemplo, proteínas de membrana encargadas de introducir la molécula antibiótica en el interior de la célula, por lo que, si la expresión de este gen se ve comprometida, es posible que la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria sea insuficiente para causar ningún daño. El caso contrario es el de las bombas de eflujo, encargadas de expulsar al exterior sustancias nocivas (como antibióticos). Si se produce una sobreexpresión de estas proteínas, la concentración antibiótica resultará insuficiente para poder funcionar con normalidad (18).

A lo largo de los años, *S. aureus* ha desarrollado resistencia a diversos grupos de antibióticos como los β -lactámicos, mermando su actividad. En un principio, las cepas de *S. aureus* se combatían haciendo uso de la penicilina (1941), aunque poco tiempo después ya comenzaron a aparecer los primeros casos de resistencia a este antibiótico, siendo considerado inútil frente a *S. aureus* tan solo dos décadas después. A finales de los 50 se desarrolló un nuevo tipo de penicilina semisintética denominada meticilina, la cual resultó ser muy efectiva ante estos patógenos. Dos años más tarde, se detectaron los primeros casos de *S. aureus* resistentes a meticilina, siendo clasificados como causa importante de infecciones nosocomiales (19,20).

Al disminuir la tasa de eficiencia de meticilina, el uso de glucopéptidos como agentes antimicrobianos se vio incrementado notablemente. La vancomicina es el principal antibiótico de esta clase y resulta muy eficaz contra bacterias grampositivas, aunque cada vez es más frecuente la aparición de cepas resistentes a los glucopéptidos. A finales de los ochenta los primeros casos de enterococos (*Enterococcus faecium* y

menos veces de *E. faecalis*) resistentes a vancomicina fueron detectados en Inglaterra, desde entonces, esta resistencia se ha propagado rápidamente a nivel mundial (21,22).

Los principales mecanismos de resistencia a glucopéptidos son la modificación de la diana de unión de la vancomicina o supresión de dicha diana. Existen seis tipos de resistencia descritos hasta el momento.

- VanA, que ocasiona niveles altos de desarrollo de resistencia frente a vancomicina y teicoplanina.
- VanB, que produce niveles variables de resistencia tan sólo a vancomicina.
- VanD, que conduce a niveles moderados de resistencia a ambas clases de glucopéptidos.
- VanC, VanE y VanG, con niveles de resistencia bajos a vancomicina, pero susceptibles a teicoplanina.

Los operones codificantes responsables de las resistencias tipo vanA y vanB pueden encontrarse tanto en plásmidos como en el propio cromosoma, mientras que para el resto sólo se encuentra en el cromosoma (23–25).

1.3.2. Mecanismos dependientes de la modificación de los antibióticos β -lactámicos

Al tratarse del grupo antimicrobiano más empleado a nivel global, la resistencia desarrollada hacia este tipo de antibióticos se ha convertido en uno de los problemas más importantes en lo que respecta a la salud pública (26). En general, la producción de β -lactamasas, enzimas capaces de degradar los antibióticos β -lactámicos, es el método de resistencia más común. Existen numerosos tipos de β -lactamasas, hecho que ha dado lugar a diversas clasificaciones de las mismas. Ambler, en 1980 realizó una primera clasificación basada en la estructura molecular de las enzimas (A-D). El grupo B recoge a enzimas metalo- β -lactamasas que necesitan Zn^{+2} para funcionar correctamente, mientras que los grupos A, C y D abarcan enzimas serín- β -lactamsas (27). En la clasificación de Bush propuesta en 1988 descrita a continuación, no sólo se tiene en cuenta la estructura molecular de las enzimas, sino que también cuenta con la clase de sustrato y la capacidad para inhibir de las mismas (8,28–33).

- Grupo 1. Este grupo engloba las enzimas de la clase C de Ambler. Su actividad no se ve inhibida por la acción de inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, además de ser efectivas contra cefamicinas (cefexitina). Las bacterias poseedoras de resistencia tipo AmpC también se incluyen en este primer grupo (Tabla 1) (8,30,33).
- Grupo 2. Se incluyen serín- β -lactamasas entre las que se encuentran enzimas de las clases A y D de Ambler, que, a su vez, se encuentra repartido en seis subgrupos cuyas principales características se recogen en la tabla 1. Dentro de esta clasificación el grupo 2be abarca las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Su actividad se ve mermada por la acción de los inhibidores de β -lactamasas y por lo general dichas enzimas se encuentran codificadas en plásmidos (Tabla 1) (8,30,33).
- Grupo 3. Este tercer grupo está compuesto por metalo- β -lactamasas, las cuales requieren del ión zinc para funcionar y corresponde según la clasificación de Ambler con la clase B. El material genético de la mayoría de las enzimas del grupo se encuentra en el cromosoma. Como en el caso del primer grupo, la acción de estas enzimas no se ve afectada por los inhibidores de β -lactamasas, aunque, debido su dependencia del zinc, su actividad se puede anular mediante agentes quelantes tales como EDTA (Tabla 1) (8,30,33).
- Grupo 4. Las penicilinasas cuya acción no se ve inhibida por ácido clavulánico se incluyen en este grupo. En cuanto a las clases de Ambler, no se ha encontrado por el momento ninguna correspondencia. Su codificación es cromosómica (Tabla 1) (8,30,33).

Tabla 1. Clasificación de las β -lactamasas (30).

Bush y Jacoby (2010)	Ambler (1980)	Substrato	Inhibido por		Características	Enzimas representativas
			Clavulánico o Tazobactam	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que bencilpenicilinas hidrólisis de cefamicinas	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis elevada de ceftazidime y de otros oxiiimino- β -lactámicos	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sí	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilinas que de cefalosporinas	PC1
2b	A	Penicilina, cefalosporinas 1 ^a generación	Sí	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas 1-4 ^a generación, monobactam	Sí	No	Hidrólisis elevada de oxiiimino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	No	No	Resistente a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas 1-4 ^a generación, monobactam	No	No	Hidrólisis elevada de oxiiimino- β -lactámicos y resistencia a clauvulánico, sulbactam y	TEM-50

					tazobactam	
2c	A	Carbenicilina	Sí	No	Hidrólisis elevada de carbenicilina, cefepima y cefpiroma	RTG-4
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Sí	No		
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis elevada de cloxacilina y oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas 1-4 ^a generación	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y oximino- β -lactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina, oxacilina y carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalospor. 1-4 ^a generación	Sí	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemas	Variable	No	Hidrólisis elevada de carbapenemas, oximino- β -lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1)	Carbapenemas	No	No	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenemas pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, Ccr-A, IND-1
	B(B3)	Carbapenemas	No	Sí		L-1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	Carbapenemas	No	Sí	Hidrólisis de carbapenemas	CphA, Sfh-1
No Incluido	-	Penicilinas	No	-	-	Penicilinas

Las carbapenemasas tienen un gran interés clínico. Son capaces de hidrolizar no sólo a los carbapenémicos, sino también a un amplio espectro de β -lactámicos. Su actividad no se ve afectada por la acción de los inhibidores de β -lactamasas. Según la clasificación de Ambler, las carbapenemasas coinciden con tres de sus clases descritas posteriormente: A, B y D (Tabla 1) (8,33,34).

- Clase A. El tipo más importante dentro de este grupo hace referencia a las KPC, codificadas plasmídicamente. IMI también pertenece a esta clase de carbapenemasas, y dichas enzimas son capaces de hidrolizar penicilinas, algunas cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos. A diferencia de las KPC, las IMI se encuentran codificadas cromosómicamente (8,33,34).
- Clase B. Se incluyen carbapenemasas que actúan frente a todos los β -lactámicos exceptuando a los monobactámicos. Al ser inhibidas por agentes quelantes como EDTA, reciben el nombre de enzimas metalo- β -lactamasas. Las enzimas VIM, que suelen estar codificadas en integrones, son las más características dentro de la clase B (8,33,34).
- Clase D. A esta clase pertenecen las enzimas denominadas OXA. Su acción hidrolítica afecta a cloxacilina, oxacilina y carbapenémicos. OXA-48 (comúnmente encontrada en *Klebsiella pneumoniae*) posee una actividad carbapenémica mayor que el resto de esta clase de enzimas (8,33).

1.4. Principales bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos β -lactámicos y glucopéptidos

Son muchos los grupos bacterianos que desarrollan resistencia a los antibióticos por los mecanismos anteriormente expuestos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decretado una lista de los principales patógenos resistentes a antibióticos, entre los que se encuentran los microorganismos de este apartado que se incluyen en este trabajo, y que pueden llegar a ser una amenaza global (35):

Prioridad 1: Crítica.

- Bacterias gramnegativas pertenecientes a la especie *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
- Bacterias gramnegativas pertenecientes a la especie *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos.
- Los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos y/o productoras de BLEE.

Prioridad 2: Elevada.

- Bacterias grampositivas de la especie *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina.
- *S. aureus* resistente a meticilina, con sensibilidad disminuida y resistencia a vancomicina.
- Bacterias gramnegativas de la especie *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina.
- Especies del género *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas.
- Especies del género *Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas.
- Bacterias gramnegativas pertenecientes a la especie *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a cefalosporina de tercera generación y/o a fluoroquinolonas.

Prioridad 3: Media.

- Bacterias grampositivas de la especie *Streptococcus pneumoniae* no sensibles a penicilina.
- Bacterias gramnegativas pertenecientes a la especie *Haemophilus influenzae* resistentes a ampicilina.
- Especies del género *Shigella* resistentes a fluoroquinolonas.

Los cuatro primeros microorganismos tienen una especial importancia clínica y serán objetos de estudio en este trabajo de fin de máster.

A. baumannii es un patógeno oportunista gramnegativo capaz de causar infecciones, tales como neumonía, bacteriemia, meningitis, infecciones del tracto urinario y peritonitis, entre otros. A nivel hospitalario, hace unos años, este patógeno no conllevaba ningún tipo de problema a la hora de tratarlo, aunque, debido al creciente número de cepas resistentes a cada vez más tipos de antibióticos, *A. baumannii*

encabeza la lista propuesta por la OMS de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos (36–38).

P. aeruginosa es una bacteria gramnegativa muy ubicua, crece en tejidos tanto de origen animal como vegetal, a la vez que en suelos, pantanos y hábitats marinos costeros. Se trata de un patógeno oportunista fuente de bacteriemias, enfermedades del tracto urinario, neumonía y es la causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. Como en el caso de *A. baumannii*, cada vez la resistencia presentada por *P. aeruginosa* a los antibióticos es mayor, por lo que dicha bacteria se encuentra dentro de la prioridad 1 (39–41).

La familia *Enterobacteriaceae* son bacterias gramnegativas que forman parte de la microbiota normal del cuerpo humano, y cierran la lista de prioridad crítica propuesta por la OMS. *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter* son tres de los principales géneros de dicha familia, y son capaces de provocar infecciones severas, como neumonía, infección del torrente sanguíneo y del tracto urinario, entre otras. Las enterobacterias productoras de BLEE han forzado el empleo de carbapenémicos para hacerles frente, lo que ha facilitado el desarrollo de bacterias productoras de carbapenemasas y, por lo tanto, resistentes a su efecto antimicrobiano (42–44).

Finalmente, los enterococos resistentes a vancomicina son bacterias grampositivas. Forman parte de la microbiota normal del cuerpo, aunque determinadas especies, como *Enterococcus faecium* o *E. faecalis*, se encuentran dentro del conjunto de bacterias causantes de infecciones oportunistas. La aparición de cepas resistentes a vancomicina se ha dado en sobre todo en países en vía de desarrollo, sin embargo, la transmisión de dichas cepas se ha visto acelerada gracias a la globalización, convirtiéndose en una importante amenaza a nivel mundial (45,46).

Una vez se diagnostica la infección por estos patógenos, es de vital importancia que sea detectada su presencia por estudios de colonización del tracto digestivo de las personas enfermas y sus contactos.

1.5. Detección fenotípica rápida de bacterias resistentes a β -lactámicos y glucopeptidos

Los inconvenientes tanto económicos como humanos que las bacterias multiresistentes provocan, ha forzado el desarrollo de métodos rápidos y eficaces para detectarlos (47–49). Las enterobacterias productoras de BLEE es uno de los grupos bacterianos que más preocupa como agentes de infección relacionados con la asistencia sanitaria en hospitales, por lo que ha aumentado el número de técnicas disponibles para su detección. Un ejemplo son las placas CHROMID ESBL (bioMérieux, Francia) con número de patente US 2012/0122148 A1, que contienen sustratos cromogénicos capaces no sólo de detectar enterobacterias productoras de BLEE, sino que, además, gracias a esta mezcla de sustratos, son capaces de identificar presuntivamente, gracias al color de las colonias, la bacteria directamente crecida en la placa (50–52).

Este medio contiene una mezcla variada de antibióticos, entre los que se incluye cefpodoxime, cefalosporina de tercera generación elegida como marcador para la identificación de enterobacterias productoras de BLEE. Tres son los principales colores que pueden aparecer en CHROMID ESBL según el sustrato utilizado. El primero de éstos es el rosa/borgoña, característico de *Escherichia coli*, el segundo, puede ser verde, verde marronáceo o azulado, y hace referencia a *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* o *Citrobacter* y, la tercera y última coloración es marrón oscuro/claro, la cual representa a *Proteus*, *Providencia* o *Morganella*. Desde su entrada en el mercado, varias han sido las investigaciones que han probado la eficacia de este medio, la gran mayoría de éstas, coinciden en que CHROMID ESBL es un método rápido y fiable a la hora de detectar eficazmente enterobacterias productoras de BLEE (50–53).

Otro procedimiento para detectar las bacterias productoras de BLEE crecidas sobre medios cromogénicos, como BBL-CHROMagar (BectonDickinson-BD, USA) (54), es la técnica de la doble difusión con discos, que consiste en inocular la placa a la que se le añade posteriormente dos discos, uno de una cefalosporina de segunda generación y otro conteniendo ácido clavulánico. También la prueba se puede realizar aplicando discos de cefalosporinas de tercera generación, con y sin ácido clavulánico. Si en lugar de discos, se utilizan tiras de E-test de cefalosporinas de tercera generación con ácido clavulánico, se puede conocer además la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico. Los procedimientos descritos anteriormente proporcionan información tan

rápidamente como la placa CHROMID ESBL, pero no son tan fiables, son más laboriosos y resultan más costosos económicamente. Por otro lado, existen bioensayos, como la prueba de Masuda, en la que se emplea una cepa indicadora que resulta ser sensible a los productos producidos por las β -lactamasas (55,56).

La resistencia a vancomicina por parte de enterococos, también supone una amenaza para la salud pública, por lo que su rápida y eficaz detección es fundamental. Los métodos más efectivos a la hora de detectar la resistencia a la vancomicina corresponden a los análisis genéticos, ya que pueden proporcionar información tanto de la especie bacteriana presente, como del tipo de resistencia que posee. El principal inconveniente de estos procedimientos es el elevado coste económico que implica su empleo, lo que dificulta su uso en los controles rutinarios de un hospital. Existen métodos fenotípicos rápidos como el uso de placas cromogénicas con las muestras clínicas a las que se les añade discos de antibióticos, o tiras de E-Test, que resultan muy efectivos para detectar el nivel de resistencia a un determinado antibiótico pero que conllevan un proceso más laborioso. Existen también medios cromogénicos diseñados específicamente para la detección de este tipo de bacterias, como es el caso de CHROMID VRE (bioMérieux, Francia), que permite diferenciar mediante colores los *E. faecium* vancoR de los *E. faecalis* vancoR (57,58), o de CHROMagar VRE (BD Diagnostics) (54).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La detección rápida y eficaz de bacterias resistentes es de suma importancia en la práctica clínica. Además, esta debe ser lo más económica, rápida, sencilla y abierta a la posible presencia de bacterias multirresistentes emergentes y reemergentes. Así el empleo de medios cromogénicos transparentes, como el CHROMID ESBL diseñado inicialmente para recuperar sólo enterobacteria productores de BLEE desde frotis rectales, podría ser una alternativa que cumpla los aspectos anteriores de forma eficaz mediante la adición de discos de antibióticos, que permita detectar otros tipos de mecanismos de resistencia.

La hipótesis propuesta en este trabajo es que CHROMID ESBL podría no sólo diferenciar entre bacterias gramnegativas multirresistentes, sino que, además, podría detectar bacterias grampositivas resistentes a vancomicina.

El objetivo general de este trabajo de fin de máster fue comprobar el comportamiento de bacterias gramnegativas, conteniendo los distintos tipos de resistencia descritos, en las placas de cultivo CHROMID ESBL, a la par que observar la selección de las bacterias grampositivas en dichos medios.

Todo ello a través de los siguientes objetivos específicos:

- A. Analizar el comportamiento en las placas de cultivo CHROMID ESBL, tras añadir tres discos de antibióticos (cefepime, cefoxitina e imipenem), de distintas cepas bacterianas gramnegativas conteniendo diferentes tipos de resistencias.
- B. Evaluar la conducta de las bacterias grampositivas resistentes y sensibles a vancomicina, con el fin de analizar el potencial de selección de este medio.
- C. Realizar un estudio prospectivo de la presencia de colonizaciones por bacterias multirresistentes en pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudio retrospectivo

Aislados clínicos. Para el análisis del comportamiento de las bacterias gramnegativas, con distintos mecanismos de resistencia a los antibióticos según los datos del CLSI 2018, en el medio CHROMID ESBL se usó el banco de cepas congeladas del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada constituidos por 182 aislados clínicos de diferentes localizaciones: 85 aislados con BLEE (43 *K. pneumoniae*; 38 *E. coli*; 2 *Proteus mirabilis*), 57 productores de carbapenemasas de tipo KPC (8 *K. pneumoniae*), IMP (16 *P. aeruginosa*; 1 *K. pneumoniae*), VIM (4 *Enterobacter cloacae*; 3 *K. pneumoniae*; 3 *Klebsiella oxytoca*; 1 *P. aeruginosa*; 1 *E. coli*) y OXA (15 *A. baumannii*; 4 *K. pneumoniae*; 1 *K. oxytoca*), 37 con AmpC y resistentes a cefotaxima (16 *E. cloacae*; 7 *E. coli*; 2 *Citrobacter freundii*; 2 *Enterobacter aerogenes*; 2 *P. mirabilis*; 2 *K. pneumoniae*; 1 *K. oxytoca*; 1 *Raoultella ornithinolytica*; 1 *Serratia marcescens*; 1 *Citrobacter amalonaticus*;) y 3 *Stenotrophomonas maltophilia*.

Para el estudio de bacterias grampositivas, se incluyeron 59 aislados clínicos: 37 vancomicina sensible (VancoS) (12 *E. faecalis*; 9 *Staphylococcus haemolyticus*; 9 *S. aureus*; 6 *E. faecium*; 1 *Staphylococcus epidermidis*) y 22 vancomicina resistente (vancoR) (21 *E. faecium*; 1 *Enterococcus gallinarum*), según los datos del CLSI 2018.

Para su identificación se empleó el sistema MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics, Alemania) y espectrometría de masas (Maldi-Tof®, Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para los estudios de sensibilidad se empleó el sistema MicroScan, con posterior determinación, en su caso, de la carbapenemasa mediante prueba colorimétrica Rapidec® Carba NP (Biomérieux, Francia), inmunocromatografía (NG-Test Carba, NG Biotech, Francia; y OXA-23 K-Set, CorisBioConcept, Bélgica), o de la resistencia a vancomicina mediante E-test (MIC Strip, Liofilchem), y confirmación en el Laboratorio de Tipado Molecular de Andalucía del Programa PIRASOA (España).

Investigación del crecimiento en el medio CHROMID ESBL modificado de las bacterias gramnegativas.

El medio de cultivo CHROMID ESBL con número de patente US 2012/0122148 A1 está constituido por una base que contiene diferentes peptonas, además de una mezcla de antibióticos entre los que se encuentra cefpodoxima (cefalosporina de tercera generación) y dos substratos cromogénicos y otro natural.

Para la siembra de los aislados se utilizaron dos bolas, provenientes del vial de congelación, haciéndolas rodar sobre una placa de URISELECT4 (BioRad, Francia), que se incubó 37°C durante 24h, para comprobar su pureza. Se prepararon suspensiones al 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$ u.f.c./ml) desde colonias en agar sangre. Posteriormente se empapó un escobillón esterilizado con la suspensión homogeneizada, se eliminó el exceso de líquido y se sembró en masa sobre media placa CHROMID ESBL. Haciendo uso del asa de siembra de 5µl, la carga bacteriana se sembró en estría en su zona final (Figura 3). Seguidamente, se colocaron equidistantes en la zona de siembra en masa, los tres discos de antibióticos a probar: cefepime (FEP) (30 µg, Becton Dickinson, EE. UU.), cefoxitina (FOX) (30 µg, Becton Dickinson) e imipenem (IMP) (10 µg, Becton Dickinson), para medir la presencia de crecimiento y de halos alrededor de los discos anteriores (Figura 4). Todas las placas fueron incubadas hasta 48h a 37°C, con lecturas a las 24 y 48 horas. Si el halo de inhibición fue \geq a 1,5 cm a las 24 horas de su colocación se interpretó como sensible al mismo, y resistente en caso contrario.

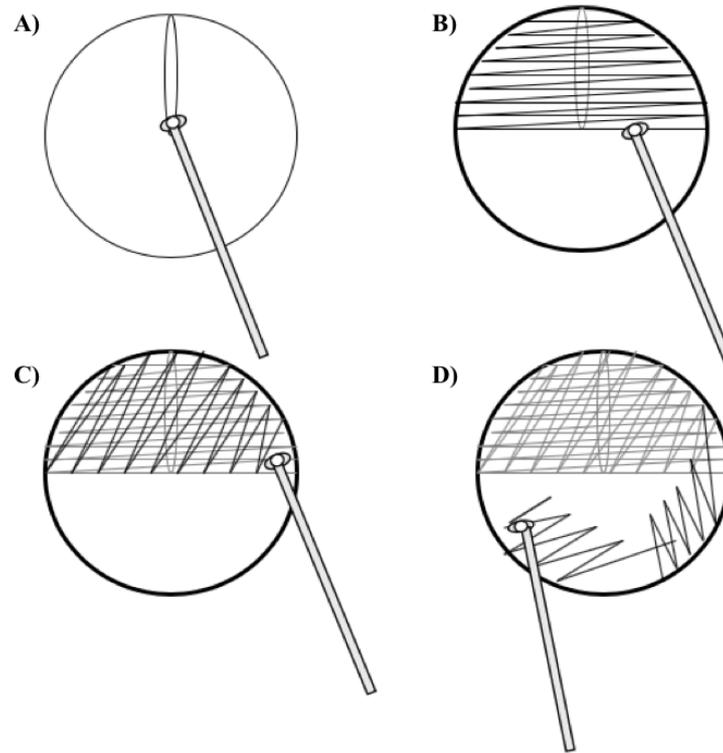


Figura 3. Representación gráfica de la siembra en estría llevada a cabo en el laboratorio. A, B, C y D hacen referencia al orden del procedimiento.



Figura 4. Representación de la colocación de los tres discos de antibióticos.

Investigación del crecimiento de las bacterias grampositivas resistentes o sensibles a vancomicina.

Los aislados se descongelaron y se extendieron sobre la placa CHROMID ESBL de forma similar al procedimiento anterior. En este caso se adicionó, además de los tres

discos de antibióticos anteriormente nombrados, uno de vancomicina (VA), distante del de IMP. El procedimiento de lectura e interpretación fue el mismo que para las bacterias gramnegativas.

3.2. Estudio prospectivo

Muestras clínicas. Se utilizaron muestras de pacientes de edad superior a los 14 años. Todas las muestras fueron analizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, que atiende a una población aproximada de 440.000 personas. Entre el 1 de noviembre del 2.018 y el 30 de abril del 2.019 se estudiaron microbiológicamente 1.007 muestras de 441 pacientes (algunos con varios episodios) por sospecha de colonización por bacterias multirresistentes, que incluyeron *S. aureus* meticilin resistentes, enterococos resistentes a vancomicina, *Pseudomonas* productoras de carbapenemasas, *Acinetobacter baumannii*, y otros bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa, *Klebsiella* BLEE y enterobacterias productoras de carbapenemasas. Las muestras analizadas fueron: frotis rectales (649), frotis faringoamigdalares (314) y muestras de otras localizaciones (44). Las muestras se sembraron en medio CHROMID ESBL y en medio MRS AII (BIORAD), específico para la detección de *S. aureus* meticilin resistentes.

Procesamiento de muestras y análisis del crecimiento de los microorganismos en el medio CHROMID ESBL.

Tras el registro de la muestra del/la paciente, se inocularon las placas mediante la extensión del contenido del escobillón recibido sobre la primera mitad de la placa CHROMID ESBL. Haciendo uso del asa de siembra de 5µl, la carga bacteriana se sembró en estría en su zona final y finalmente se le añadieron los tres discos de interés (Figura 4). Todas las placas fueron incubadas hasta 48h a 37°C y leídas a las 24 y 48h antes de emitir el resultado.

Tres fueron las posibles situaciones de resultados a evaluar:

- a) Ausencia de crecimiento bacteriano tras 48 horas de incubación.

b) Crecimiento de uno o varios morfotipos a las 24 horas, pero con carga bacteriana insuficiente para valorar la presencia de halos. En estos casos se extendió cada tipo de colonia diferente, de interés clínico, mediante el asa de siembra de 5µl, en el medio con los tres discos de antibióticos, de nuevo, y se reincubaron las placas a 37°C durante 24h.

c) Crecimiento con carga bacteriana suficiente para llevar a cabo el análisis, tras las primeras 24 horas de incubación. En estos casos se anotaron los resultados obtenidos en su morfología, coloración y sensibilidad a los antibióticos. La placa fue reincubada y se actuó como en el punto anterior si fue necesario.

La identificación de aislados se realizó mediante espectrometría de masas (Maldi-Tof®, Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para los estudios de sensibilidad se empleó el sistema MicroScan, con posterior determinación, en su caso, de la carbapenemasa mediante prueba colorimétrica Rapidec® Carba NP (BioMerieux), inmucromatografía (NG-Test Carba, NG Biotech; y OXA-23 K-Set, CorisBioConcept), o de la resistencia a vancomicina mediante E-test (MIC Strip, Liofilchem), y confirmación en el Laboratorio de Tipado Molecular de Andalucía del Programa PIRASOA (España).

Análisis del crecimiento de los microorganismos en el medio MRSaII.

Se inocularon las placas mediante la extensión del contenido del escobillón recibido sobre la primera mitad de la placa MRSaII (BIORAD). Haciendo uso del asa de siembra de 5µl, la carga bacteriana se sembró en estría en su zona final. Todas las placas fueron incubadas hasta 48h a 37°C y leídas a las 24 y 48h antes de emitir el resultado. Las colonias sospechosas de ser *S. aureus* meticilinR se identificaron mediante espectrometría de masas (Maldi-Tof®).

El protocolo del estudio se llevó a cabo conforme con la Declaración de Helsinki y las normas de la Comisión Local de Ética e Investigación Sanitaria. Este fue un estudio no intervencionista, con ninguna investigación adicional a los procedimientos rutinarios. El material biológico se utilizó sólo para el diagnóstico estándar de colonización por bacterias multirresistentes, siguiendo las prescripciones de los médicos. No se realizó muestreo adicional ni modificación del protocolo diagnóstico de rutina. Se realizaron los análisis de datos utilizando una base de datos anónima. Por lo tanto, no se consideró

necesario obtener el consentimiento informado, según lo señalado por las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud en seres humanos de la Organización Mundial de la Salud. La entidad que concedió el permiso para acceder a los datos y utilizarlos fue la Unidad de Gestión Clínica de Microbiología y Parasitología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, España.

Se realizó un análisis descriptivo de los datos, en el que se calcularon las frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas. Los datos se analizaron con el software Microsoft Excell 2.010.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio retrospectivo

4.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados gramnegativos

Las distintas bacterias que crecieron en el medio CHROMID ESBL mostraron una coloración diferente dependiendo de las especies (Figura 5). *K. pneumoniae* creció como colonias de un color verdeazulado, por el contrario *K. oxytoca* exhibió un tono verde-marronáceo, que recordó a *P. mirabilis*, aunque esta última presentaba tonos más oscuros. La coloración de *P. aeruginosa* osciló entre blanca, blanca marronácea y marrón oscuro. Las colonias de *A. baumannii* resultaron ser blancas, opacas y convexas. En lo que respecta a los *Enterobacter*, tanto a *E. cloacae* como *E. aerogenes*, ambas especies mostraron coloración semejante verdemarronácea. Lo mismo sucedió con las dos especies del género *Citrobacter* (*C. freundii* y *C. amalonaticus*), ambas presentaron color marrón claro. En cuanto a *E. coli*, se observó un tono burdeos exclusivo. Por último, *S. maltophilia* presentó colores entre blanco transparente y un color verde que partió del centro de la colonia.

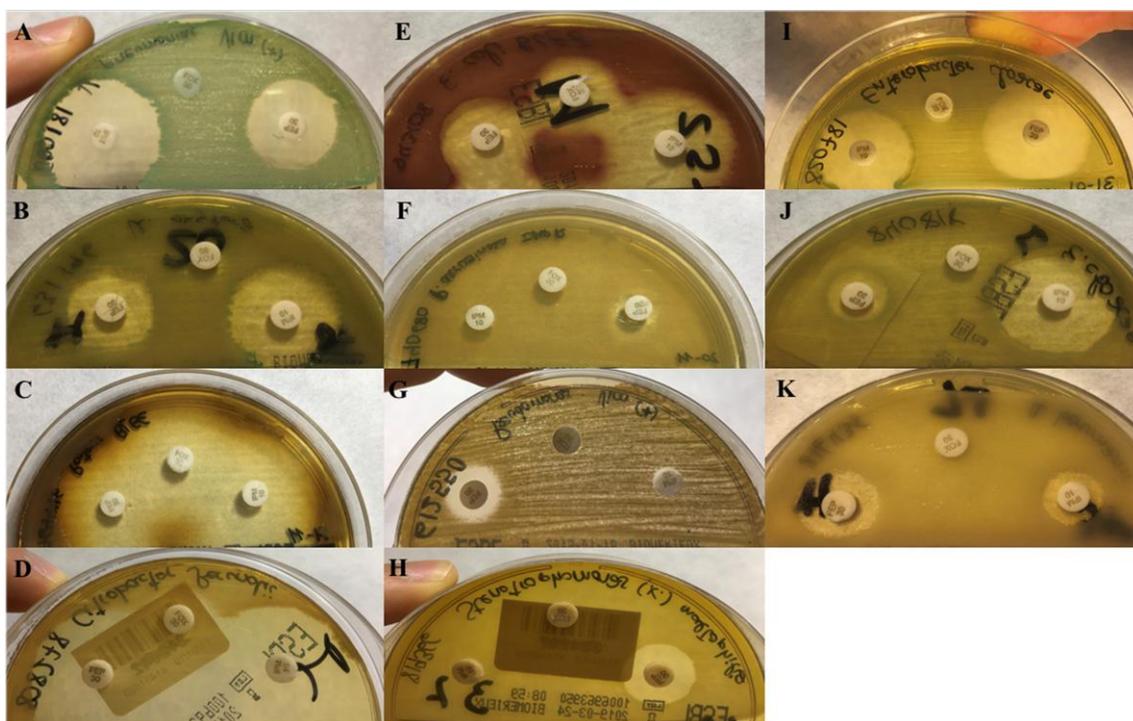


Figura 5. Coloración de las distintas especies estudiadas en la placa CHROMID ESBL. A, *K. pneumoniae*; B, *K. oxytoca*; C, *P. mirabilis*; D, *Citrobacter* spp.; E, *E. coli*; F y G, *P. aeruginosa*; H, *S. maltophilia*; I y J, *E. cloacae*; K, *A. baumannii*.

Las lecturas de placas tanto a las 24h como a las 48h mostraron el mismo resultado en la interpretación de los resultados. Éstos se han estructurado según el mecanismo de resistencia de las bacterias evaluadas (Tabla 2). Todos los aislados de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. mirabilis* productores de BLEE mostraron crecimiento en placa, dando como resultado un rendimiento del 100% para la recuperación de este tipo de microorganismos.

En cuanto a los aislados productores de carbapenemasas, sólo 1 (6,2%) *P. aeruginosa* productora de IMP, de las 16 estudiadas, no creció en el medio evaluado; únicamente 1 (33,3%) *K. pneumoniae* productora de VIM, de las 3 estudiadas, no creció en el medio evaluado; finalmente, ningún aislado de los tres de *K. oxytoca*, productores de OXA, creció en el medio.

En lo que respecta a los aislados con AmpC, que mostraron resistencia a cefotaxima, *R. ornithinolytica* y *S. marcescens* no mostraron crecimiento alguno en la placa, mientras que para *C. freundii* el medio mostró un rendimiento del 50%, para *E. coli* del 57,1%, y para *P. mirabilis* del 50%. Para el resto de los microorganismos la recuperación fue del 100% de los aislados.

Tabla 2. Número de aislados, porcentaje por microorganismos y porcentaje medio por tipo de resistencias que mostraron crecimiento en el medio CHROMID ESBL.

Mecanismo de resistencia		Microorganismo		Nº de aislados	Crecimiento positivo (%)	% Medio de Crecimiento	
BLEE		<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	43	43 (100)	100	
		<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	2	2 (100)		
		<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	38	38 (100)		
Carbapenemasas	KPC	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	8	8 (100)	100	94,7
	IMP	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	16	15 (93,7)	94,1	
		<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	1	1 (100)		
	VIM	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	4	4 (100)	91,7	
		<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	3	2 (66,7)		
			<i>oxytoca</i>	3	3 (100)		
		<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	1	1 (100)		
	OXA	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	15	15 (100)	95	
		<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	4	4 (100)		
			<i>oxytoca</i>	1	0 (0)		
	AmpC	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	2	1 (50)	80	
<i>amalonaticus</i>			1	1 (100)			
<i>Escherichia</i>		<i>coli</i>	7	4 (57,1)			
<i>Enterobacter</i>		<i>cloacae</i>	16	16 (100)			
		<i>aerogenes</i>	2	2 (100)			
<i>Proteus</i>		<i>mirabilis</i>	2	1 (50)			
<i>Klebsiella</i>		<i>pneumoniae</i>	2	2 (100)			
		<i>oxytoca</i>	1	1 (100)			
<i>Raoutella</i>		<i>ornithinolytica</i>	1	0 (0)			
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	1	0 (0)				
Otros mecanismos	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	3	3 (100)	100		

En la tabla 3 se reflejan los resultados de la presencia de halos $\geq 1,5$ cm alrededor de los discos de IMP, FEP y FOX. Todos los aislados con BLEE fueron sensibles a IMP y FOX; la sensibilidad a FEP fue variable (Figura 6).

De los productores de carbapenemasas, la totalidad de *P. aeruginosa* (tanto productoras de VIM como IMP) resultaron ser resistentes a IMP y a FOX, con sensibilidad variable a FEP. En lo que respecta a *K. pneumoniae* productores de KPC, 3 aislados presentaron resistencia a IMP, siendo los otros 5 casos sensibles a IMP y FEP, con resistencia variable a FOX, mientras que el único aislado de *K. pneumoniae* productor de IMP mostró resistencia a FOX, al igual que los dos casos de *K. pneumoniae* productores de VIM estudiados. *K. oxytoca* productor de VIM presentó sensibilidad a FEP e IMP, con resistencia variable a FOX, del mismo modo que *E.*

cloacae (VIM). *E. coli* (VIM) y *K. pneumoniae* (OXA) no mostraron resistencia a ningún disco de antibiótico ensayado. Por último, de los 15 aislados de *A. baumannii*, 1 aislado resultó ser resistente a los tres antibióticos, mientras que la gran mayoría (14) fueron resistentes a FOX.

En cuanto al tipo de resistencia AmpC, *E. aerogenes* mostró resistencia a FOX, y sensibilidad a FEP e IMP, en cambio, *E. cloacae* 12 de los 16 aislados estudiados presentaron el mismo tipo de fenotipo que *E. aerogenes*. 1 además de ser resistente a FOX, también lo fue a FEP, los 3 aislados restantes fueron sensibles a FOX e IMP, con sensibilidad variable a FEP. La totalidad de los géneros *Citrobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* resultaron ser sensibles a los tres antibióticos. Por último, *P. mirabilis* obtuvo el fenotipo contrario, resistente a FOX, FEP e IMP.

Por último, los tres aislados de *S. maltophilia* mostraron resistencia tanto a FOX como a IMP, pero sensibilidad frente a FEP.

Tabla 3. Número de aislados que mostraron halos $\geq 1,5$ cm (sensibilidad -S-) o no (resistencia -R-) a los discos de cefoxitina (FOX), cefepime (FEP) e imipenem (IMP) según el tipo de resistencia.

		IMP	S	S	R	S	R	S	Total
		FEP	S	R	R	S	S	R	
		FOX	S	S	R	R	R	R	
*O.M.	<i>S. maltophilia</i>	****-	-	-	-	-	3	-	3
AmpC	<i>K. oxytoca</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
	<i>K. pneumoniae</i>	2	-	-	-	-	-	-	2
	<i>P. mirabilis</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
	<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	2	-	-	-	2
	<i>E. cloacae</i>	2	1	-	12	-	1	-	16
	<i>E. coli</i>	4	-	-	-	-	-	-	4
	<i>C. amalonaticus</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
**CBP	OXA	<i>K. pneumoniae</i>	4	-	-	-	-	-	4
		<i>A. baumannii</i>	-	-	1	14	-	-	15
	VIM	<i>E. coli</i>	1	-	-	-	-	-	1
		<i>P. aeruginosa</i>	-	-	1	-	-	-	1
		<i>K. oxytoca</i>	2	-	-	1	-	-	3
		<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	2	-	-	2
		<i>E. cloacae</i>	1	-	-	3	-	-	4
	IMP	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	1	-	-	1
		<i>P. aeruginosa</i>	-	-	5	-	10	-	15
	KPC	<i>K. pneumoniae</i>	4	-	3	1	-	-	8
***BLEE	<i>P. mirabilis</i>	2	-	-	-	-	-	2	
	<i>E. coli</i>	38	-	-	-	-	-	38	
	<i>K. pneumoniae</i>	36	7	-	-	-	-	43	

* Otros Mecanismos; ** Carbapenemasas; *** β -lactamasas de espectro extendido; ****ningún aislado de este tipo fue analizado.

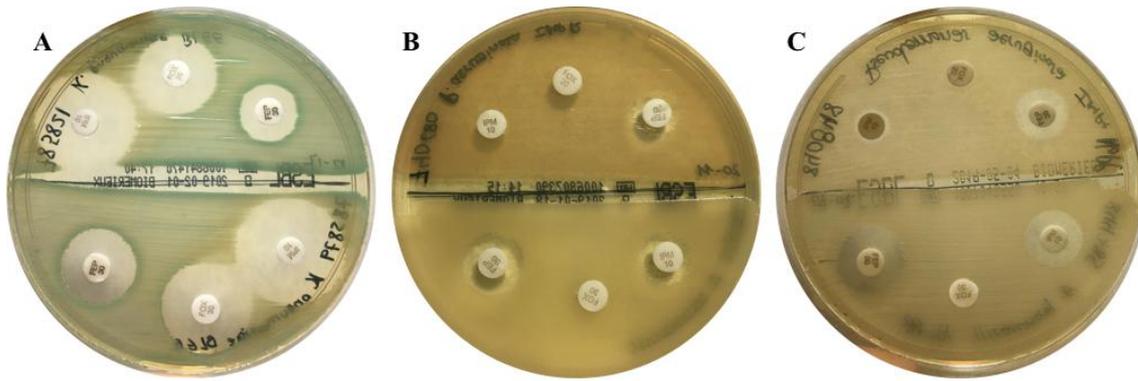


Figura 6. Ejemplos del comportamiento de algunos aislados: A, *K. pneumoniae* BLEE; B, *P. aeruginosa* con IMP y C, *A. baumannii* con OXA, en la placa CHROMID BLEE con los discos de FOX, FEP e IMP.

4.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de aislados grampositivos

Los enterococos crecidos en la placa CHROMID ESBL presentaron colonias puntiformes de una coloración verde azulado (Figura 7).

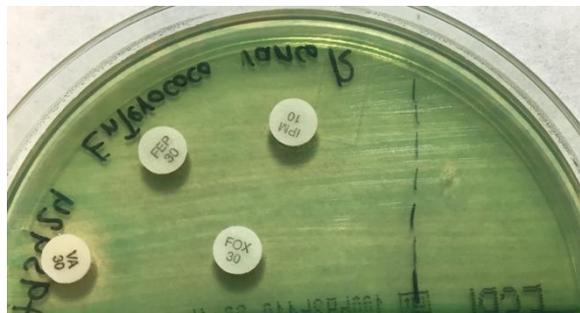


Figura 7. Coloración de un aislado de enterococo vancoR.

Ninguno de los aislados de estafilococos creció en el medio de cultivo. En el caso de los *Enterococcus*, sólo crecieron en el medio los 18 aislados vancoR de *E. faecium* bajo la actividad del disco de vancomicina; 5 de los 12 aislados de *E. faecalis* vancoS no fueron capaces de crecer en la placa en presencia del disco de vancomicina, pero, por el contrario, mostraron crecimiento fuera del alcance del antibiótico (Figura 8).



Figura 8. Ejemplo del crecimiento de un *Enterococcus vancoR* en la parte superior. La parte inferior corresponde a la falta de crecimiento de los estafilococos vancoS.

4.2. Estudio prospectivo

De los 1.007 muestras para detectar microorganismos multirresistentes, 761 (75,57%) no mostraron crecimiento bacteriano en los medios de cultivo CHROMID y MRSA (Tabla 4).

Tabla 4. Recuento total de episodios positivos y negativos de: frotis rectales, frotis faringoamigdalar y de otras localizaciones.

Episodios	N° de muestras (%)		
	Frotis rectal	Frotis faringoamigdalar	Otras muestras
Negativos	469 (72,26)	255 (81,21)	37 (84)
Positivos	180 (27,74)	59 (18,79)	7 (16)
Total	649	314	44

De las 246 muestras con resultado positivo se llevó a cabo el estudio de los aislados clínicos y estos correspondieron a *A. baumannii*, *Enterococcus* spp. vancoR, *K. oxytoca* BLEE, *K. pneumoniae* BLEE, *P. aeruginosa* y *Pseudomonas putida* productoras de

carbapenemasas, *S. aureus* metiR, *S. maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Burkholderia cenocepacia* (Tabla 5).

La totalidad de los casos de Enterococos vancoR (20), *K. oxytoca* BLEE (5) y *P. putida* (2) fueron recogidos de frotis rectales. El 81.8% de los 55 casos de *A. baumannii*, el 92.6% de los 68 casos de *K. pneumoniae* BLEE y el 91.3% de los 23 casos de *P. aeruginosa* fueron detectados igualmente en frotis rectales, dejando un porcentaje mucho menor para frotis faringoamigdalar y otras localizaciones. Por el contrario, las bacterias detectadas mayoritariamente en los frotis faringoamigdalar correspondieron a *A. xylosoxidans* (100%), *B. cenocepacia* (100%) y *S. aureus* metiR (75% frente el 25% de frotis rectales). La única bacteria que se detectó casi igualitariamente en ambas muestras fue *S. maltophilia*, el 52,2% de los frotis rectales y el 47,8% restante de frotis faringoamigdalar (Tabla 5).

Tabla 5. Número de casos detectados por tipo de muestra de cada bacteria. En la parte de bajo se señalan las características de la resistencia encontrada en alguno de los casos*.

Muestras positivas	<i>A. baumannii</i> (%)	Enterococo Vanco R (100%)	<i>K.</i>		
			<i>oxytoca</i> BLEE (%)	<i>K. pneumoniae</i> BLEE (%)	<i>P. putida</i> (%)
Total	55	20	5	68	2
Frotis rectal	45 (81,8)	20 (100)	5 (100)	63 (92,6)	2 (100)
Frotis faringoamigdalar	6 (10,9)	0 (0)	0 (0)	3 (4,4)	0 (0)
Otros	4 (7,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,9)	0 (0)
	6 OXA-23*	15 <i>E. faecium</i> * 4 <i>E. faecalis</i> * 1 <i>E. cassevisflavus</i> *			2 VIM*

Muestras positivas	<i>P. aeruginosa</i> (%)	<i>S. aureus</i> Meti R (%)	<i>S. maltophilia</i> (%)	<i>A. xylosoxidans</i> (%)	<i>B.</i>
					<i>cenocepacia</i> (%)
Total	23	48	23	1	1
Frotis rectal	21 (91,3)	12 (25)	12 (52,2)	0 (0)	0 (0)
Frotis faringoamigdalar	1 (4,3)	36 (75)	11 (47,8)	1 (100)	1 (100)
Otros	1 (4,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	20 IMP* 1 VIM*				
	1 IMP*				
	1 IMP*				

5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio retrospectivo

5.1.1. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados gramnegativos

Según el fabricante del medio CHROMID ESBL, las cepas de *E. coli* crecidas en la placa presentan una coloración rosa/burdeos, los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*, muestran una coloración verde, pardoverdosa o azul, mientras que *Proteus*, *Providencia* y *Morganella*, tienen un color pardo/marrónáceo. Las muestras estudiadas en este trabajo coinciden con las indicaciones del fabricante. En lo referente a *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas*, no se recogen en la lista de posibles bacterias capaces de crecer en la placa presentando un color particular en el medio de estudio. Las dos primeras exhibieron coloración blanquecina, transparente el primer caso y opaca el segundo. *Stenotrophomonas*, por otro lado, creció mostrando matices pardoverdosos parecidos a los presentados por *K. oxytoca*, aunque menos intensos y tonos pardo amarillentos.

El sistema de coloración resulta ser un método cómodo para determinar que crecen microorganismos diferentes, y presuntivamente, la especie o género de la bacteria o bacterias crecidas sobre la placa, aunque se presentan determinados casos en los que los colores no son tan fácilmente distinguibles y pueden llegar a crear confusión a la hora de discriminar entre una especie u otra. Por ello, a pesar de ser capaces de prácticamente identificar presuntivamente a las bacterias presentes, no ha de descartarse llevar a cabo un análisis más detallado de identificación, como puede ser un estudio de espectrometría de masas (59). Lo que si queda claro es la diferencia en la morfología de las colonias de enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores.

La totalidad de los aislados que poseían una resistencia tipo BLEE (*K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. mirabilis*, tres especies reconocidas como posibles poseedoras de BLEE (60)) crecieron en el medio. Fenotípicamente, teniendo en cuenta los tres discos de antibióticos empleados, se observó que todos los aislados resultaron ser sensibles tanto a IMP como a FOX. Dicho resultado concuerda con lo que se conoce de la producción

de BLEE, la cual dota de resistencia a la cepa frente a las cefalosporinas de amplio espectro, pero no resultan efectivas ante cefamicinas (como cefoxitina) ni ante carbapenémicos (como imipenem). En lo que respecta a FEP, 7 aislados de *K. pneumoniae* consiguieron crecer sin verse afectados por su actividad. El desarrollo de BLEE puede llegar a dotar a la cepa de resistencia frente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, aunque este acontecimiento, como se puede ver reflejado en el número de cepas resistentes a FEP comparado con las que no lo son, se da en una cifra considerablemente menor. A pesar del menor número de casos de resistencia a FEP, en la literatura no se recomienda su empleo aislado a la hora de combatir las infecciones por bacterias productoras de BLEE debido a la posibilidad de desarrollo de resistencia a este antibiótico. En el caso de que se emplease, debe ser acompañada de aminoglucósidos o fluorquinolonas (61–63).

Tres de los aislados productores de carbapenemasas (5,3% sobre el total de aislados de carbapenemasas) no crecieron en el medio CHROMID ESBL, a pesar de haber mostrado previamente resistencia a los carbapenémicos, hecho que puede deberse al efecto de combinación de varios antibióticos en la placa de crecimiento, como el IMP en conjunto con cefpodoxime (presente en el medio) o cefepime, entre otros. Esta combinación terapéutica de antibióticos ha demostrado ser mucho más efectiva frente a bacterias resistentes (64–67). Otra posible razón que explique la ausencia de crecimiento en el medio estudiado está relacionada con la teoría de la evolución por medio de la pérdida de genes innecesarios, es decir, la pérdida de genes dispensables para poder desarrollarse en un medio determinado. Los aislados, tras haber sido descongelados, se sembraron en placas URISELECT4 y de agar sangre antes de ser estudiados. En este tipo de medio no son necesarios los genes de resistencia, ya que no se trata de un medio selectivo para este tipo de características, por lo que cabe la posibilidad de que los genes de resistencia por los que seleccionaron los aislados en cuestión, se perdieron al ser sembrados en agar sangre (68). Por último, también puede haber sido un error de manipulación al sembrar en el medio CHROMID ESBL. Como propuesta para futuros estudios, el análisis genéticos de los aislados que no crecieron en el medio se podría haber llevado a cabo con el fin de conocer con exactitud el motivo por el que dichas bacterias no se desarrollaron.

En cuanto a las cepas que si mostraron crecimiento, *P. aeruginosa* con IMP y VIM resultaron ser resistentes, como era de esperar ya que IMP y VIM se encuentran dentro

del grupo de las metalo- β -lactamasas, las cuales dotan de resistencia frente a casi todos los β -lactámicos, a IMP y FOX, con sensibilidad variable a FEP (34,69). Por otro lado, 3 aislados productores de KPC revelaron un fenotipo resistente a los tres antibióticos, hecho esperado debido a la conocida resistencia de las KPC a carbapenémicos y cefalosporinas (siendo sensibles en ciertas ocasiones a algunas cefalosporinas de 3^a y 4^a generación) (34,70), mientras que los 5 aislados restantes mostraron sensibilidad a FEP e IMP, con resistencia variable a FOX. La ausencia de resistencia a IMP se puede deber, como se ha mencionado anteriormente, a la pérdida de genes de resistencia, como los que producen KPC. Asimismo, en ciertos estudios se ha visto que *in vitro*, cepas productoras de KPC mostraban un fenotipo sensible a IMP (71,72). El resto de aislados productores de IMP y VIM, exhibieron fenotipos de sensibilidad a FEP e IMP, con resistencia variable a FOX. Dichos resultados no se corresponden con el papel estudiado de las enzimas metalo- β -lactamasas, aunque no debe extrañar este hecho por el efecto sinérgico entre disco y antibiótico en el medio (73). Por otra parte, se ha visto que el grado de resistencia de los aislados con VIM e IMP puede variar entre distintas cepas, y que, dichos genes, se encuentran por lo general en integrones plasmídicos, factor que facilita la pérdida de los mismos (73,74). Por último, tan sólo una de los aislados de *A. baumannii* productores de OXA demostró ser fenotípicamente resistente a IMP (y a FEP y FOX), resultado esperado. Contrariamente, los 14 casos restantes de *A. baumannii* mostraron resistencia a FOX y sensibilidad a FEP e IMP. Diversos artículos postulan que OXA exhibe una actividad hidrolítica baja hacia los carbapenémicos, pudiendo ser este el motivo por el que presentan sensibilidad a IMP (75,76), causa que también puede justificar la sensibilidad de los aislados de *K. pneumoniae* productores de OXA.

Finalmente, los aislados productores de AmpC obtuvieron el rendimiento de crecimiento más bajo (80%). Los motivos de por el que éstos no fueron capaces de crecer en el medio chomID ESBL ya expuestos en los párrafos anteriores pueden servir para explicar estos casos, aunque, los genes que dotan de resistencia AmpC a la bacteria suelen estar integrados en el cromosoma bacteriano, haciendo que su pérdida sea más costosa, no obstante, se han descrito *ampC* plasmídicos (77) que son más fáciles de gestionar por la bacteria. Otra razón es que AmpC no resulta tan efectiva frente a cefalosporinas de 3^a y 4^a generación, pudiendo cefpodoxime haber inhibido su crecimiento. En cualquier caso, esto resulta ser beneficioso para su diagnóstico. Las dos

especies estudiadas del género *Enterobacter* mostraron un fenotipo resistente a FOX y sensible tanto a FEP como a IMP, resultado esperado por estudios realizados anteriormente (34,78–81). Algunos aislados presentan sensibilidad a FOX e IMP con resistencia variable a FEP, fenotipo que se asemeja a un tipo de resistencia BLEE. El último caso aislado resultó ser resistente a FOX y FEP, con sensibilidad a IMP, exhibiendo presuntivamente una mezcla de resistencia tipo AmpC combinada con otra tipo BLEE (por la resistencia a FEP en determinados casos), las cuales no son excluyentes. El género *Citrobater* obtuvo un tipo de fenotipo similar al que presentan los aislados productores de BLEE. Este hecho se puede dar debido a que los genes que codifican para una resistencia AmpC no hayan podido expresarse. Por otro lado, *Escherichia* presentó el mismo tipo de fenotipo, aunque puede deberse a que la expresión de *ampC* es a niveles muy bajos, sin mostrar resistencia (82). La explicación de por qué los aislados de *Klebsiella* no mostraron la resistencia característica de producción de AmpC, puede corresponderse a que dicha resistencia en este género se encuentra en plásmidos, siendo de esta manera más fácil su pérdida (77). El último aislado, *P. mirabilis*, resultó ser resistente a los tres antibióticos estudiados (FOX, IMP e IMP). Este fenotipo no es característico de una resistencia tipo AmpC, más bien se asemeja a una combinación de producción tanto de carbapenemasas, como de BLEE como de AmpC.

Para acabar, *S. maltophilia* mostró resistencia a FOX e IMP, llevando a la conclusión de que esta especie poseía un mecanismo de resistencia diferente, como puede serlo el hecho de disponer de un número reducido de porinas (33,34,77).

Teniendo en cuenta lo mencionado en los párrafos anteriores, sí que se puede observar, por lo general, un patrón sobre el medio CHROMID ESBL para cada tipo de resistencia (BLEE, carbapenemasas y AmpC), donde las cepas con BLEE y carbapenemasas crecieron la mayor parte de ellas, y que al adicionarse los tres discos de antibióticos estudiados las cepas con BLEE mostraron sensibilidad a IMP y FOX; mientras que las cepas con carbapenemasas no lo fueron a FOX. La falta de resistencia a IMP se puede deber a la manipulación de la cepa o a la necesidad de poner un punto de corte del halo superior a 1,5 cm. Las cepas con AmpC son las que mostraron una menor frecuencia de crecimiento y las tres cepas de *Klebsiella* que crecieron con sensibilidad a los tres discos hace pensar, también, en la necesidad de poner un punto de corte del halo superior a 1,5 cm.

5.1.2. Comportamiento en el medio de cultivo con discos de los aislados grampositivos

Las colonias de enterococos resistentes a vancomicina crecidas en el medio CHROMID ESBL desarrollaron una coloración verde azulada, semejante en algunos casos al color producido por *K. pneumoniae* o *E. aerogenes*, aunque gracias a la morfología de las colonias sí que se pueden distinguir ambos géneros a pesar del color, ya que son pequeñas y puntiformes. Debido a que el fabricante de CHROMID ESBL tan sólo menciona coloraciones características para bacterias gramnegativas, las bacterias grampositivas obtenidas en este trabajo no pueden ser comparadas con ninguna referencia.

Ninguno de los aislados del género *Staphylococcus* fue capaz de crecer en el medio CHROMID ESBL en presencia de vancomicina, puesto que todos mostraban un fenotipo sensible a dicho antibiótico. Tampoco fueron capaces de crecer fuera del alcance de los discos de vancomicina, a pesar de que intrínsecamente *Staphylococcus* posee un alto grado de resistencia a los antibióticos β -lactámicos mediante β -lactamasas, factor que favorecería el desarrollo de dichos aislados en el medio (83). Teniendo en cuenta la ausencia de crecimiento en el medio, fuera del alcance de la actividad de los discos de vancomicina, se infiere que en el medio se encuentra integrado otro tipo de substrato el cual no permite que las cepas con sensibilidad a vancomicina se desarrollen en él. Por otro lado, del género *Enterococcus* se estudiaron tanto cepas resistentes a vancomicina como sensibles. La resistencia a vancomicina de este género se ha visto incrementada con creces durante los últimos años, sobre todo en *E. faecium*, característica que hizo posible el crecimiento de todos los aislados estudiados vancoR en el medio (84–86). Estas bacterias fueron capaces de crecer tanto bajo el efecto de los discos de vancomicina como sin estarlo. Contrariamente, los aislados de *E. faecium* vancoS analizados no fueron capaces de mostrar ningún tipo de crecimiento, al igual que el género *Staphylococcus*. En cuanto a *E. faecalis* 7 aislados mostraron el fenotipo de no crecimiento en el medio al tratarse de aislados vancoS, no obstante, 5 aislados vancoS lograron desarrollarse en la zona de ausencia de actividad de los discos de vancomicina. Este resultado puede deberse a que dichas cepas

presentan resistencia al posible factor presente en el medio que incapacita normalmente a los aislados vancoS de crecer. En último lugar, *E. gallinarum* vancoR no fue capaz de crecer en el medio CHROMID ESBL a pesar de mostrar resistencia a vancomicina. Este hecho se puede atribuir a que no se trata de una cepa altamente resistente a dicho antibiótico, sino que se corresponde con una resistencia intermedia, permitiendo que el antibiótico lleve a cabo su actividad, impidiendo su crecimiento.

Los datos obtenidos en este trabajo tienden a indicar que el medio CHROMID ESBL no sólo es capaz de detectar bacterias gramnegativas, sino que, además, podría poner de manifiesto Enterococos vancoR incluso sin la necesidad del empleo de discos de vancomicina.

5.2. Estudio prospectivo

La totalidad de los aislados de Enterococos vancoR fueron obtenidos de frotis rectales, resultado esperado debido a que este tipo de bacterias colonizan el tracto gastrointestinal (87–89). Los aislados del género *Klebsiella* se obtuvieron en su gran mayoría de frotis rectales, puesto que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, caracterizadas por colonizar el tracto digestivo (90,91), aunque incluso se hallaron casos de *K. pneumoniae* provenientes de muestras faringoamigdalares. Recientemente se han estudiado casos de colonizaciones de esta especie en zonas del tracto respiratorio (92). *A. baumannii* se encuentra en la misma situación, se hallaron aislados provenientes de frotis rectales en una cifra muy superior al de los faringoamigdalares, debido a que esta especie coloniza normalmente el tracto gastrointestinal, aunque en algunas ocasiones también se hallaron aislados del tracto respiratorio (93,94). El género *Pseudomonas* se encuentra en una situación similar, con la diferencia de que, por lo general, *Pseudomonas* coloniza el tracto respiratorio, implicando infecciones respiratorias (95–97). Este hecho no se corresponde con los datos obtenidos en el estudio prospectivo, no obstante, se ha de tener en consideración el número de muestras obtenidas de cada zona, 649 para los frotis rectales frente a los 314 de muestras de frotis faringoamigdalares, por lo que la probabilidad de obtención de aislados de frotis rectales aumenta considerablemente. Por el contrario, todos los aislados de *A. xylosoxidans* y *B. cenocepacia* provinieron de frotis faringoamigdalares, zonas normalmente colonizadas por estas especies (98,99). En cuanto a *S. aureus* metiR, la gran mayoría creció de frotis

faringoamigdalares, zona que, al igual que *A. xylosoxidans* y *B. cenocepacia*, es generalmente colonizada por *S. aureus* (100–102). Un bajo porcentaje de los aislados se encontraron, también, de frotis rectales, lugar que puede llegar a ser colonizado por esta especie (103). En último lugar, *S. maltophilia* es capaz de colonizar tanto la microbiota intestinal como el tracto respiratorio, aunque resulta más común las colonizaciones de esta última zona. En los resultados obtenidos el número de aislados en ambos frotis se reparte casi equitativamente, a pesar del hecho de que *S. maltophilia* coloniza más frecuentemente el tracto respiratorio (104,105). De nuevo, ha de tenerse en consideración el número de muestras de cada frotis, siendo más probable que se hay obtenido un elevado número de aislados de frotis rectales.

En cuanto a la rentabilidad de cada muestra, se observó que *S. aureus* metiR y *S. maltophilia* eran detectados por frotis faringoamigdalares mucho más eficientemente que los rectales, suceso lógico si se tiene en cuenta las zonas que normalmente colonizan ambas especies. En lo que respecta a los frotis rectales, se obtuvieron con más eficiencia *K. pneumoniae* BLEE, *A. baumannii*, Enterococos vancoR y *P. aeruginosa*. Los tres primeros casos se corresponden con el lugar de colonización de dichas especies, sin embargo, *P. aeruginosa* es un patógeno característico de infecciones respiratorias. El resultado obtenido en este trabajo puede deberse a que los pacientes a los que se le tomaron las muestras, tanto de frotis rectales como faringoamigdalares, tenían tratamiento con antibióticos de amplio espectro durante mucho tiempo.

6. CONCLUSIONES

1. El medio CHROMID ESBL permitió el crecimiento diferencial de bacterias gramnegativas conteniendo diferentes tipos de resistencias, y sí que se pudo observar, por lo general, un patrón de los halos de discos de cefoxitina, imipenem y cefepime, donde las cepas con BLEE y carbapenemasas crecieron la mayor parte de ellas en el medio, las cepas con BLEE mostraron sensibilidad a imipenem y cefoxitina; mientras que las cepas con carbapenemasas no lo fueron a cefoxitina. A pesar de dicha ventaja, no ha de descartarse el empleo de otras técnicas que permitan conocer con exactitud las resistencias.
2. En cuanto a las bacterias grampositivas, se concluye que CHROMID ESBL, sin la ayuda adicional de discos de vancomicina, fue capaz de aislar enterococos resistentes a dicho antibiótico.
3. El estudio epidemiológico mostró colonizaciones bacterianas incluidos en la lista propuesta por la Organización Mundial de la Salud como los principales patógenos multirresistentes y, además, los frotis nasofaríngeos mostraron una mayor rentabilidad a la hora de detectar *Staphylococcus aureus* metiR y *Stenotrophomonas maltophilia*, en contraposición, los frotis rectales detectaron más eficientemente *Klebsiella pneumoniae* BLEE, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, es necesario evaluar series más amplias.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*. 2009 Apr; 75(4):417–34.
2. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*. 2014 Aug; 14(8):742–50.
3. Coulthurst SJ, Barnard AML, Salmond GPC. Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria . Vol. 3, *Nature Reviews Microbiology*. 2005. p. 295–306.
4. Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. 2003; 21(1):42–54.
5. Frère J-M, Page MG. Penicillin-binding proteins: evergreen drug targets. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Oct 1; 18:112–9.
6. Fresnadillo Martínez MJ, García García MI, García Sánchez E, García Sánchez JE. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Sep 1; 28(2):53–64.
7. Yocum RR, Waxman DJ, Rasmussen JR, Strominger JL. Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci*. 1979 Jun; 76(6):2730–4.
8. Bueno Sancho J, Seral García CP, Castillo García FJ. Epidemiología molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas. 2015.
9. Kadurina M, Bocheva G, Tonev S. Penicillin and semisynthetic penicillins in dermatology. Vol. 50, *Disease-a-Month*. Elsevier. 2004. p. 291–314.
10. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. 2008.
11. Andraca Perera JR, Rodríguez Gil E, Fundora Santana A. Cefalosporinas. Vol. 35, *Revista Cubana de Farmacia*. 2001. p. 219–222.
12. El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. Vol. 45, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. p. 1–19.
13. Marshall WF, Blair JE. The cephalosporins. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier.

1999. p. 187–95.
14. Pigrau C. Oxazolidinonas y glucopéptidos. Vol. 21, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003. p. 157–65.
 15. info-farmacia.com
 16. Dcosta VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. Vol. 477, Nature. 2011. p. 457–61.
 17. Khachatourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. CMAJ. 1998 Nov 3; 159(9):1129–36.
 18. Martínez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: Setting a parameter space. Vol. 119, Upsala Journal of Medical Sciences. Taylor & Francis. 2014. p. 68–77.
 19. Gil D de M. M. Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chil infectología. 2009; 17(2).
 20. Quiceno J, Natalia J, Ochoa C, María M. Staphylococcus aureus resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación (Methycillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular bases of resistance; epidemiology, and typification). Iatreia. 2009; 22(2):147–58.
 21. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. Vol. 13. 2000.
 22. Johnson AP, Uttley AHC, Woodford N, George RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: An emerging clinical problem. Vol. 3, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM). 1990. p. 280–91.
 23. Courvalin P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. Clin Infect Dis. 2006 Jan 1; 42(1):S25–34.
 24. Evers S, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanSB-VanRBtwo-component regulatory system in Enterococcus faecalis V583. J Bacteriol. 1996 Mar; 178(5):1302–9.
 25. Leclerc R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to Enterococcus gallinarum. Antimicrob Agents Chemother. 1992 Sep; 36(9):2005–8.

26. Ogawara H. Penicillin-binding proteins in Actinobacteria. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014 Apr; 68(4):223–45.
27. van den Akker F, Bonomo RA. Exploring additional dimensions of complexity in inhibitor design for serine β -lactamases: Mechanistic and intra- and inter-molecular chemistry approaches. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers. 2018. p. 622.
28. Bush K. Classification of β -lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. Vol. 33, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM). 1989. p. 264–70.
29. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. Vol. 19, *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013. p. 549–59.
30. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Vol. 54, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology Journals. 2010. p. 969–76.
31. Echeverri M, Atehortúa S, Robledo J. K. pneumoniae y betalactamasas. Un problema creciente. *Rev Acad y científicas Univ Pontif Boliv*. 2009; 28(2):135–41.
32. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct; 17(10):1791–8.
33. Pena Viña I. Enterobacterias productoras de carbapenemasas: tipos, epidemiología molecular y alternativas terapéuticas. 2016.
34. Moreno Monge KM. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. 2013.
35. (OMS) Organización mundial de la salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Nota de prensa. 2017.
36. Casares MH, Rivera FE, Posada M del CH, Batista MLM, Méndez ZM de O. Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el hospital clínicoquirúrgico “hermanos ameijeiras.” *Rev Cubana Med* . 2010; 49(3):218–27.
37. Diomedi P A. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev Chil infectología*. 2005 Dec; 22(4):298–320.

38. Pinzon JO, Mantilla JR, Valenzuela E, Fernández F, Arturo Álvarez C, Osorio EDJ. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio*. 2006 Oct 6; 10(2):71–78.
39. Cafora M, Deflorian G, Forti F, Ferrari L, Binelli G, Briani F, et al. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. 2018.
40. Stover CK, Pham² XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Vol. 406, *NATURE*. 2000.
41. Wang T, Hou Y, Wang R. A case report of community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia complicated with MODS in a previously healthy patient and related literature review. 2019.
42. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control*. 2006 Jun 1; 34(5):S20–8.
43. Sheu C-C, Chang Y-T, Lin S-Y, Chen Y-H, Hsueh P-R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol*. 2019 Jan 30; 10:80.
44. Watkins RR, Duin D Van. Current trends in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria. 2019.
45. Thu WP, Sinwat N, Bitrus AA, Angkittitrakul S, Prathan R, Chuanchuen R. Prevalence, Antimicrobial resistance, virulence genes and class 1 integrons of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from pigs, pork and humans in Thai-Laos border provinces. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Jun 8.
46. O’Dea M, Sahibzada S, Jordan D, Laird T, Lee T, Hewson K, et al. Genomic, antimicrobial resistance and public health insights into *Enterococcus* spp. from Australian chickens. *J Clin Microbiol*. 2019 May 22.
47. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. Vol. 9, *Nature Reviews Microbiology*. NIH Public Access. 2011. p. 894–6.
48. Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas

- multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(6):402–9.
49. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. Vol. 35, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017. p. 667–75.
 50. Glupczynski Y, Berhin C, Bauraing C, Bogaerts P. Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2007 Feb 1; 45(2):501–5.
 51. Paniagua R, Valverde A, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Aug; 67(4):376–9.
 52. Réglie-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. *J Med Microbiol*. 2008 Mar 1; 57(3):310–5.
 53. Del Castillo MC, López-Cerezo L, Casal M, Pascual Á. Evaluación del medio chromID ESBL para la detección de portadores de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. Vol. 29, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011. p. 471–2.
 54. Tormo N, Albert E, Borrajo E, Bosque M, Camarena JJ, Domínguez V, et al. A survey on practices for active surveillance of carriage of multidrug-resistant bacteria in hospitals in the Autonomous Community of Valencia, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Nov 13; 37(11):2069–74.
 55. Delfín M, Almanza Á. Identification of extended spectrum beta-lactamases in enterobacterias. *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2017; 2010(4):516–24.
 56. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Aug 1; 29(7):524–34.
 57. Matheussen V, Loens K, Scott C, Di Lorenzo C, McCulloch E, Donoso Mantke O, et al. Quality of molecular detection of vancomycin resistance in enterococci: results of 6

- consecutive years of Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) external quality assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 May 28.
58. Jahansepas A, Ahangarzadeh Rezaee M, Hasani A, Sharifi Y, Rahnamaye Farzami M, Dolatyar A, et al. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. *Microb Drug Resist*. 2018 Oct; 24(8):1165–73.
 59. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Oct 1; 29(8):601–8.
 60. García CS, Pardos De La Gándara M, Castillo García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Vol. 28, *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2010.
 61. Cantón A, Oliver R. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. 1990.
 62. Guillén R, Velázquez G, Lird G, Espínola C, Laconich M, Carpinelli L, et al. Detección molecular de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas en Asunción. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2016 May 10; 14(1):8–16.
 63. Morejón García M. Betalactamasas de espectro extendido. 2013.
 64. Baddour LM, Yu VL, Klugman KP, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, et al. Combination antibiotic therapy lowers mortality among Severely Ill Patients with Pneumococcal Bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Aug 15; 170(4):440–4.
 65. Band VI, Hufnagel DA, Jaggavarapu S, Sherman EX, Wozniak JE, Satola SW, et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nat Microbiol*. 2019 Jun 17.
 66. Chow JW, Yu VL. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 Jan 1; 11(1):7–12.
 67. Gupta V, Datta P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *Indian J Med Res*. 2019 Feb; 149(2):97–106.
 68. Albalat R, Cañestro C. Evolution by gene loss. *Nat Rev Genet*. 2016 Jul 18; 17(7):379–91.

69. Gómez Álvarez CA, Leal Castro AL, Pérez de González M de J, Navarrete Jiménez ML. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. Vol. 24, Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 2007. p. 94–112.
70. Malathi K, Anbarasu A, Ramaiah S. Identification of potential inhibitors for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-3: a molecular docking and dynamics study. J Biomol Struct Dyn. 2019 Jan 11. p. 1–13.
71. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. South Med J. 2011 Jan; 104(1):40–5.
72. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Jun; 64(2):233–5.
73. Suárez CJ, Kattan JN, Guzman AM, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. Vol. 10, Infectio. La Asociación Colombiana de Infectología. 2006. p. 85–93.
74. Rodríguez M-C, Ruiz del Castillo B, Rodríguez-Mirones C, Romo M, Monteagudo I, Martínez-Martínez L. Caracterización molecular de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de la metalobetalactamasa VIM-2 en Cantabria, España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Feb 1; 28(2):99–103.
75. Shu L, Dong N, Lu J, Zheng Z, Hu J, Zeng W, et al. Emergence of OXA-232 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* That Carries a pLVPK-Like Virulence Plasmid among Elderly Patients in China. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Dec 17; 63(3).
76. Eliecer Cano M, Ángeles Domínguez M., Ezpeleta C, Padilla B, Ramírez de Arellano E, Martínez-Martínez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008 Apr 1; 26(4):220–9.
77. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. 2008.

78. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des.* 1999 Nov; 5(11):881–94.
79. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan 1; 22(1):161–82.
80. Palmieri M, Schicklin S, Pelegrin AC, Chatellier S, Franceschi C, Mirande C, et al. Phenotypic and Genomic Characterization of AmpC-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Korea. *Ann Lab Med.* 2018 Jul; 38(4):367.
81. Lan NPH, Hien NH, Le Thi Phuong T, Thanh DP, Thieu NTV, Ngoc DTT, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of ESBL and AmpC producing organisms associated with bacteraemia in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017 Dec 16; 6(1):105.
82. Martínez Rojas DDV. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. 2009.
83. Lacueva Arnedo M, Lacueva Arnedo M. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. 2017.
84. Ahumada SE, Otero RM, Noriega ER. Resistencia de los enterococos a los antimicrobianos: implicaciones clínicas. *Enfermedades Infecc y Microbiol.* 1999; 19(5):227–35.
85. Casal MDM, Causse M, Solís F, Rodríguez-López F, Casal M. Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecium*. Vol. 25, *Rev Esp Quimioter.* 2012.
86. Cercenado E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Dec 1; 29:59–65.
87. Nguyen AH, Miller WR, Arias CA. Shape Follows Function: Gastrointestinal Signals for Enterococcal Colonization. *Trends Mol Med.* 2019 Jun 17; 25(6):464–6.
88. Ponessa A, Gambandé T, All L, Fernández de Arroyabe G, Ferrari M, Dlugovitzky D, et al. Enterococos vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina. Vol. 40, *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 2006. p. 499–502.
89. Bayjanov JR, Baan J, Rogers MRC, Troelstra A, Willems RJL, van Schaik W. *Enterococcus faecium* genome dynamics during long-term asymptomatic patient gut colonization. *Microb Genomics.* 2019 Jun 5.

90. Chi C, Xue Y, Lv N, Hao Y, Liu R, Wang Y, et al. Longitudinal Gut Bacterial Colonization and Its Influencing Factors of Low Birth Weight Infants During the First 3 Months of Life. *Front Microbiol.* 2019; 10:1105.
91. Márquez-Herrera K, Rojas-Vega A, Camacho-Moreno G. Caracterización de pacientes con aislamiento de *Klebsiella* productora de carbapenemasa en un hospital pediátrico de tercer nivel de Bogotá, Colombia. *Infectio.* 2016 Oct 1; 20(4):231–7.
92. Dimitriou V, Biehl LM, Hamprecht A, Vogel W, Dörfel D, Peter S, et al. Controlling intestinal colonization of high-risk haematology patients with ESBL-producing Enterobacteriaceae: a randomized, placebo-controlled, multicentre, Phase II trial (CLEAR). *J Antimicrob Chemother.* 2019 Jul 1; 74(7):2065–74.
93. Thom KA, Hsiao WWL, Harris AD, Stine OC, Rasko DA, Johnson JK. Patients with *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections are colonized in the gastrointestinal tract with identical strains. *Am J Infect Control.* 2010 Nov 1; 38(9):751–3.
94. Salas Coronas J, Cabezas Fernández T, Álvarez-Ossorio García de Soria R, Rogado González MC, Delgado Fernández M, Díez García F. Infección/colonización nosocomial de las vías respiratorias por *Acinetobacter baumannii* en una planta de Medicina Interna. Vol. 19, *Anales de Medicina Interna.* Arán Ediciones, S.A. 2002. p. 21–24.
95. Vander H, Prabha V. Colonization of mouse vagina with *Pseudomonas aeruginosa*: A plausible explanation for infertility. *Microb Pathog.* 2019 Sep 1; 134:103602.
96. Milagro Montero M. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. 2012.
97. Garrós Garay J, Ruiz de Gordejuela E, García Cebrián F, Martín Saco G, Gallego L, Pérez Escajadillo J. Colonización-infección por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con bronquiectasias y EPOC. Aspectos clínicos microbiológicos y evolutivos. *Gac Médica Bilbao.* 2002 Jan 1; 99(3):63–8.
98. Lambiase A, Catania MR, del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, et al. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Aug 31; 30(8):973–80.
99. Máiz L, Baranda F, Coll R, Prados C, Vendrell M, Escribano A, et al. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol.* 2001 Jan 1; 37(8):316–24.

100. Villasusa Páez I, Martínez Motas I, Álvarez García N, Mirabal Sosa M, Sierra González G, Rodríguez Delgado P. Prevalencia de bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe de niños sanos de un círculo infantil de Ciudad de La Habana. Vol. 58, Revista Cubana de Medicina Tropical. Editorial Ciencias Médicas. 2006.
101. Fortaleza CR, Melo EC de, Fortaleza CMCB. Nasopharyngeal colonization with methicillin-resistant staphylococcus aureus and mortality among patients in an intensive care unit. Rev Lat Am Enfermagem. 2009 Oct; 17(5):677–82.
102. Fuentes Páez Y, Martínez Motas I, Sierra González G, Izquierdo Pérez L, López Piñera O, Valdés Hernández MJ. Colonización faríngea por bacterias potencialmente patógenas en niños sanos de una escuela primaria. Rev Cubana Med Trop. 2009; 61(1):0–0.
103. Cervantes-García E, García-González R, María Salazar-Schettino P. Características generales del Staphylococcus aureus. Vol. 61, Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2014.
104. Apisarnthanarak A, Fraser VJ, Dunne WM, Little JR, Hoppe-Bauer J, Mayfield JL, et al. Stenotrophomonas maltophilia Intestinal Colonization in Hospitalized Oncology Patients with Diarrhea. Clin Infect Dis. 2003 Oct 15; 37(8):1131–5.
105. Juliet L C, Fernández V A. Stenotrophomonas maltophilia. Rev Chil infectología. 2006 Sep; 23(3):247–8.