

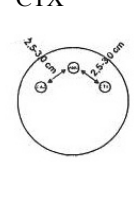
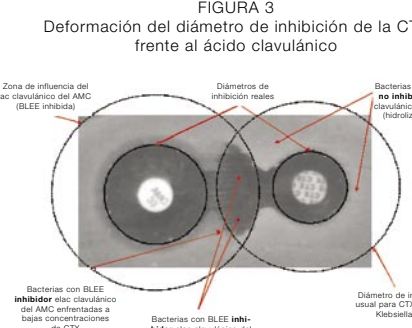
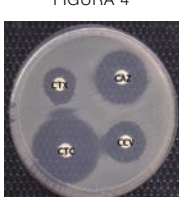


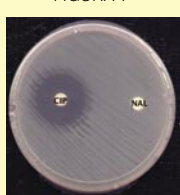
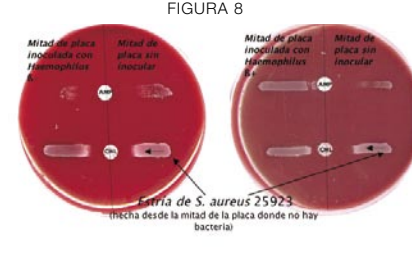
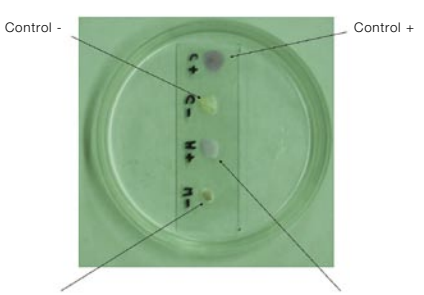



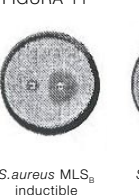
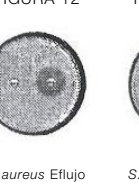

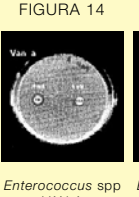
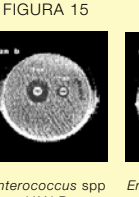
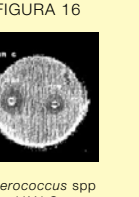
# Detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en el laboratorio



## Bacilos Gramnegativos

MECANISMO	PRUEBA DE TAMIZAJE	PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN	INTERPRETACIÓN	INFORME CLÍNICO
<b>BLEA en enterobacterias</b>	Discos de AMP, AMC, CEP, FOX y C3G (CTX, CAZ) o C2G (CXM)	Caracterización de la enzima (PCR, hibridación con sondas específicas de familia, punto isoeléctrico, secuenciación de ADN).  FIGURA 1  FIGURA 2 	Presencia de BLEA (válido sólo para <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Shigella</i> spp, <i>Salmonella</i> spp y <i>Klebsiella</i> spp (que presenta siempre este mecanismo):  Fenotipo: AMP R AMC* S, I o R (Casi siempre $\Theta$ AMC > AMP) CEP* S, I o R (casi siempre $\Theta$ > 6) FOX, C2G y C3G S (sin deformación del halo de inhibición en las cercanías de AMC). *Depende del nivel de producción enzimática (fig. 1 y fig. 2)	Es dependiente del cuadro clínico:  - Infección urinaria baja no complicada: los antibióticos $\beta$ -lactámicos se informan según la interpretación de sus halos de inhibición, aclarando que, las drogas para las cuales se observe sensibilidad intermedia, podrían ser útiles clínicamente por la concentración que éstas alcanzan en orina. - Infección severa: se informa cada antibiótico $\beta$ -lactámico según la interpretación de su halo de inhibición.
<b>BLEE en enterobacterias</b>	1) Discos de CAZ, AMC y CTX 	2) Método automatizados 3) Discos de CTX-CTC y CAZ-CCV. 4) Tiras de E-test para detección de BLEE: CTX-CTC y CAZ-CCV. 5) CIM en medio sólido o líquido para CTX, CTC, CAZ y CCV. Caracterización de la enzima (PCR, hibridación con sondas específicas de familia, punto isoeléctrico, secuenciación de ADN).  FIGURA 3 Deformación del diámetro de inhibición de la CTX frente al ácido clavulánico  FIGURA 4  FIGURA 5 	<b>Tamizaje:</b>  1) Resistencia o sensibilidad intermedia a CTX o CAZ con la deformación del halo de inhibición de cualquiera de las cefalosporinas de tercera generación en las cercanías de AMC se considera prueba confirmatoria de BLEE por recomendación Regional OPS. (ver puntos de corte comunes y especiales en la Tabla 2C del documento M100-S18 para la interpretación de las pruebas de difusión) (fig. 3).  Excepción 1: aislamientos productores de BLEE con alto nivel de resistencia donde la deformación puede no observarse.  Excepción 2: sensibilidad a CTX y CAZ con deformación del halo de inhibición.  Ambas excepciones requieren confirmación.  <b>Confirmación:</b> 2) Resultado positivo para la presencia de BLEE por el método automatizado utilizado. Los métodos automatizados que utilizan CLAV para detección no requieren confirmación (Ej. VITEK), otros como el Microscan si la requieren.  3) Diferencia superior a 5mm entre los $\Theta$ para CTX y CTC o entre los de CAZ y CCV (fig. 4).  4) Relación mayor o igual a 8 entre las CIMs (por E-test) de CTX y CTC o las de CAZ y CCV (fig. 5).  5) Disminución de tres o más diluciones en la CIM de CTX y/o CAZ en presencia de ac. clavulánico.	Informar resistente a: todas las penicilinas, CIG, C2G, C3G, C4G y el ATM independientemente de su eventual sensibilidad <i>in vitro</i> .  La FOX, las combinaciones de antibióticos $\beta$ -lactámicos con inhibidores de $\beta$ -lactamasas (AMC, SAM, CFS, TIM y TZP) y los carbapenems (IPM y MEM) se informan según la interpretación de los halos de inhibición obtenidos.  Excepción: En una infección urinaria baja no complicada causada por una enterobacteria productora de BLEE con sensibilidad a alguna de las C3G (según los puntos de corte del CSLI), podría haber éxito terapéutico con dicha droga.
<b>Resistencia a quinolonas en enterobacterias</b>	Discos de NAL y CIP o NOR	CIMs para NAL y CIP o NOR. Secuenciación de los sitios calientes de mutación de la ADN girasa y la Topoisomerasa IV (QRDR).  Análisis de proteínas de membrana externa (porinas).  CIMs para NAL y CIP en presencia y ausencia de inhibidores de las bombas de eflujo (CCCp o reserpina).  FIGURA 6  FIGURA 7 	Fenotipos observables:  1) NAL y CIP S (fig. 6). 2) NAL R y CIP S ( $\Theta$ reducido) (fig. 7). 3) NAL y CIP R (Fenotipo muy inusual para <i>Salmonella</i> spp o <i>Shigella</i> spp.) 4) Tamaño de halo de inhibición de CIP < NAL o CIP=NAL.	1) Sensibilidad a NAL y CIP. 2) Resistencia a NAL y sensibilidad CIP para <i>Salmonella</i> spp informar sensibilidad disminuida a CIP. Probable falla de tratamiento en caso de <i>Salmonella</i> extraintestinal. 3) Resistencia a NAL y CIP. 4) Posible presencia de nuevos mecanismos plasmídicos de resistencia a fluoroquinolonas. El impacto clínico de estos mecanismos de resistencia aún no está definido. Informar las fluoroquinolonas según puntos de corte.
<b>Resistencia enzimática a AMP y CHL en <i>Haemophilus</i> spp</b>	1) Detección de $\beta$ -lactamasa por el método de nitrocefin. 2) Método microbiológico para detección de $\beta$ -lactamasa y cloranfenicol acetil transferasa.	3) Antibiograma por difusión con discos o determinación de la CIM en medio HTM.  FIGURA 8 	1) Presencia de $\beta$ -lactamasas: cambio de color en el reactivo de nitrocefin (amarillo al rojo) (fig. 8).  2) Método microbiológico (fig. 9) A-presencia de $\beta$ -lactamasa: diferencia superior a 3mm entre la distancia del crecimiento del <i>S. aureus</i> ATCC 25923 de un lado (con <i>Haemophilus</i> ) y el otro (sin <i>Haemophilus</i> ) del disco de AMP. B-presencia de cloranfenicol acetil transferasa: Idem punto 2A pero con el disco de CHL. C-en caso de prueba negativa para ampicilina, no se puede descartar la resistencia por mecanismos no enzimáticos.  3) Interpretación de los halos de inhibición y/o la CIM según las tablas 2e de las recomendaciones del CLSI para la prueba de difusión y dilución.	1) Informar resistencia a AMP. 2) Informar resistencia a AMP o CHL según corresponda. 3) Informar según interpretación de los halos de inhibición.  FIGURA 9 

## Cocos Grampositivos

MECANISMO	PRUEBA DE TAMIZAJE	PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN	INTERPRETACIÓN	INFORME CLÍNICO
<b>Detección de resistencia a oxacilina en <i>Staphylococcus</i> spp.</b>	1) Disco de OXA (Válido para <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> )	2) Prueba de tamizaje con placa de agar MH-OXA 6 $\mu$ g/ml-CIN 4% (sólo para <i>S. aureus</i> ) (Ver CLSI Tabla 2C Documento de CIM para <i>S. aureus</i> ). 3) Prueba de latex para la detección de PBP 2a. Válido para <i>Staphylococcus</i> spp. (Método comercial). 4) CIM de OXA (Válido para <i>Staphylococcus</i> spp). 5) PCR para gen mecA.	1) Interpretar según normativas CLSI documento de pruebas de difusión por discos, Tabla 2C (Importante ver comentarios 7-11). 2) Desarrollo de más de una colonia debe interpretarse como resistencia a OXA. 3) Aglutinación positiva para PBP2a debe interpretarse como resistencia a OXA. 4) Interpretar según normativas CLSI documento de pruebas de dilución, Tabla 2C (Importante ver comentarios 7-10). 5) Resultado positivo para la PCR del gen mecA indica en todos los casos resistencia a OXA.	Informar resistencia a todos los antibióticos $\beta$ -lactámicos aunque hayan presentado halos de sensibilidad en el antibiograma o no se hayan ensayado. Importante ver comentarios 2,3 y 7-11 de la Tabla 2C del documento M100-S18 para la interpretación de las pruebas de difusión.
<b>Resistencia a macrolidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS<sub>B</sub>) inducible, constitutiva y por eflujo en cocos positivos</b>	Discos de ERI y CLI  FIGURA 10  FIGURA 11  FIGURA 12  FIGURA 13 		Fenotipos observables:  1) <b>ERI y CLI sensibles:</b> Sin Mecanismo de resistencia (fig. 11). 2) <b>ERI resistente y CLI sensible:</b> a) Con achatamiento del halo de CLI sugiere MLS <sub>B</sub> inducible (fig. 12). b) Sin achatamiento del halo del CLI sugiere mecanismo de eflujo u otro (fig. 13). 3) <b>ERI y CLI resistentes:</b> MLS <sub>B</sub> constitutivo o combinación de mecanismo (fig. 14).	1) Informar sensibilidad a ERI y CLI. 2) a) Informar resistencia a ERI, CLI, LIN y S <sub>B</sub> independientemente de la eventual sensibilidad <i>in vitro</i> . b) Informar resistencia a ERI y sensibilidad a CLI. 3) Informar resistencia a ERI y CLI.
<b>Mecanismo de resistencia a glicopéptidos en <i>Enterococcus</i> spp</b>	1) Antibiograma por difusión de VAN y TEI.  FIGURA 14  FIGURA 15  FIGURA 16 	2) Placa de VAN de 6 $\mu$ g/ml en agar BHI (Ver CLSI Tabla 2D Documento de CIM para <i>Enterococcus</i> sp). 3) CIM a VAN y TEI. 4) PCR para genes de resistencia a VAN (VAN A, VAN B, VAN C, etc).	1) Fenotipos posibles: a) VAN y TEI R: probable genotipo VAN A (fig. 15). b) VAN R y TEI S: probable genotipo VAN B ó VAN C (fig. 16). c) VAN y TEI S: cepa sin mecanismo de resistencia o posible genotipo VAN B o VAN C de muy bajo nivel.  2) Crecimiento de más de una colonia implica resistencia a VAN (determinar el nivel de resistencia por CIM). 3) Se interpreta según puntos de corte del CSLI para las pruebas de dilución (Tabla 2D). 4) Producto de amplificación esperado para VAN A, VAN B, VAN C, etc. implica presencia del gen.	Informar VAN resistente. TEI se informará según el diámetro de inhibición interpretando con los puntos de corte de la Tabla 2D de las normas CLSI para pruebas de difusión.
<b>Detección de alto nivel de resistencia de aminoglicósidos en <i>Enterococcus</i> spp</b>	1) Antibiograma por difusión con discos de GEH (120 $\mu$ g) y STH (300 $\mu$ g)	2) Prueba de tamizaje de alto nivel de resistencia a aminoglicósidos. (ver CLSI Tabla 2D Documento de CIM para <i>Enterococcus</i> sp):  a- Placa de agar BHI con 500 $\mu$ g/ml de GEN y con 2000 $\mu$ g/ml STR. b-Tubo con caldo BHI y 500 $\mu$ g/ml GEN y otro con 1000 $\mu$ g/ml STR.	1) Interpretar la sensibilidad según puntos de corte propuestos por el CSLI para las pruebas de sensibilidad por difusión en agar (Tabla 2D). 2) a-Más de una colonia en la placa de agar indica resistencia de alto nivel al aminoglicósido considerado. b-Cualquier enturbiamiento del caldo indica resistencia de alto nivel al aminoglicósido considerado.	Informar resistencia de alto nivel a GEN y/o STR. Ausencia de sinergia con los antibióticos $\beta$ -lactámicos o glicopéptidos.

ACRÓNIMOS	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)	Cefalotina (CEP); Cefalosporinas de tercera generación (C3G); Cefazolina (CFZ); Cefepime (FEP); Cefoperazona (CFP); Cefotaxima (CTX); Cefotaxima-Ac. Clavulánico (CTC); Cefazidima (CAZ); Cefoxitina (FOX); Ceftriaxona (CRO); Cefuroxima (CFM); Ciprofloxacina (CIP); Claritromicina (CLR); Clindamicina (CLI); Cloranfenicol (CHL); Colistina (COL); Doxiciclina (DOX); Enefloxacina (ENR); Eritromicina (ERI); Estreptomina (STR);	Estreptomina de alta carga (STH); Fosfomicina (FOS); Furazolidona (FRZ); Gentamicina (GEN); Gentamicina de alta carga (GENH); Kanamicina (KAN); Imipenem (IPM); Levofloxacina (LVX); Linezolidina (LIN); Lomefloxacina (LOM); Meropenem (MEM); Minociclina (MNO); Nitrofurantoina (NTT); Norfloxacina (NOR); Oxacilina (OXA); Ofloxacina (OFX); Penicilina (PEN); Pefloxacina (PEF); Piperacilina (PIP); Piperacilina-tazobactam (TZP); Rifampicina	(RIF); Sulfafiazol (SLF); Sulfisoxazol (SOX); Teicoplanina (TEC); Tetraciclina (TCY); Teicoplanina (TIC); Trimetoprima+sulfametoxazol (SXT); Tobramicina (TOB); Vancomicina (VAN).
-----------	---	---	---	--