

Relevancia de la detección de los fenómenos de sinergias y antagonismos entre antimicrobianos en los sistemas automatizados de lectura de antibiogramas

Ferran Navarro y Beatriz Mirelis

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Actualmente, está en auge la aplicación de la biología molecular para detectar las resistencias a los antimicrobianos lo más fácil y rápidamente posible. Ello se consigue mediante la detección de los genes de resistencia por técnicas como la amplificación de ADN (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) o mediante técnicas de hibridación. En otros casos, no sólo se requiere la detección del gen, sino saber si está presente o no una determinada mutación o mutaciones en un determinado gen. Para ello se dispone de estas y de otras herramientas moleculares como son la búsqueda de dianas de restricción creadas o eliminadas por la mutación (PCR y digestión con enzimas de restricción) o secuenciación (técnicas variadas de secuenciación o *pyrosequencing*)¹.

Todas estas metodologías tienen considerables limitaciones, como son los requerimientos tecnológicos, los costes económicos y sobre todo el hecho de que sólo nos permite detectar aquellas resistencias cuyo mecanismo está bien caracterizado. Además, debemos tener presente la enorme plasticidad genética de los microorganismos, que hace que constantemente estemos ante nuevos genes y nuevos mecanismos de resistencia. Las dos primeras limitaciones se van suavizando con el desarrollo de preparados comerciales que facilitan el trabajo y, en cierta manera, lo automatizan y permiten su incorporación a los laboratorios de microbiología.

Por todo ello, la aplicación de estas técnicas moleculares para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos se ha limitado, en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica, a situaciones muy concretas y precisas como la detección de resistencia a los antivirales, a los antimicrobianos y a determinados antibacterianos como el caso de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* o a vancomicina en enterococos.

Así, para el estudio de la sensibilidad de las bacterias, básicamente se utilizan técnicas fenotípicas, en su mayoría estandarizadas con la excepción de algunos grupos bacterianos (corinebacterias, actinomicetales, etc.). Ello implica que se han determinado las condiciones en las que se ha de realizar el estudio y se han establecido puntos de corte que permiten predecir la respuesta terapéutica.

Las dos técnicas básicas que se utilizan son las de difusión (disco difusión y Etest) y las de microdilución, siendo fundamentalmente estas últimas las que más modificaciones han experimentado. La razón de ello es fundamentalmente debida a que son técnicas fácilmente automatizables, tanto a la hora de preparar y realizar la técnica, como a la hora de su lectura e interpretación. Además son técnicas cuantitativas que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), sin embargo, tienen la limitación de que el número y tipo de antibacteriano estudiado está definido por la industria y no por el usuario.

La técnica de disco difusión, ha sido una de las técnicas más utilizada, permitiendo el estudio de una gran variedad de antibacterianos que son seleccionados por el propio usuario, adaptándose a las necesidades de su entorno, al microorganismo en cuestión y a los intereses epidemiológicos o de investigación del mismo. Por el contrario, una de las principales limitaciones es la falta de estandarización para algunos grupos bacterianos (algunos bacilos gramnegativos aerobios, bacterias anaerobias, bacterias exigentes, etc.) y el hecho de ser una técnica semicuantitativa que no determina la CIM, a diferencia de la técnica del Etest.

Dicho esto, concluiríamos que para el estudio de la sensibilidad a los antibacterianos, las técnicas fenotípicas descritas presentan ventajas e inconvenientes. Una de las posibilidades más atractivas para la rutina de un laboratorio de microbiología clínica son las técnicas de microdilución por su fácil automatización², pero, debemos ser conscientes que en este caso se pierde cierta información, que aportan las técnicas de difusión, como por ejemplo, la presencia o ausencia de fenómenos de antagonismo o de sinergia entre diferentes antimicrobianos. En este sentido, debemos destacar que la detección de la betalactamasa cromosómica inducible de clase C en bacterias gramnegativas como *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* o *Pseudomonas aeruginosa* o las betalactamasas cromosómicas inducibles de clase A de *Proteus vulgaris* y *P. penneri* ayudan en su identificación^{3,4}. En estos casos observaremos un fenómeno de inducción (antagonismo), generalmente por betalactámicos como el imipenem o la cefoxitina reduciéndose los halos de inhibición al resto de betalactámicos sensibles, mayoritariamente cefalosporinas de tercera y cuarta generación y el aztreonam^{3,4}.

De todos modos, una de las principales aportaciones del estudio de sinergia y antagonismo entre antimicrobianos es la ayuda a la lectura interpretada del antibiograma⁵.

Correspondencia: Dr. F. Navarro.
Servicio de Microbiología.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Sant Antoni M.^a Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: fnavarror@santpau.es

Ello permite predecir con mayor precisión el mecanismo de resistencia implicado y con ello determinar la mejor opción terapéutica. El ejemplo más conocido es la sinergia entre un inhibidor de betalactamasas, como por ejemplo el ácido clavulánico, y una cefalosporina de tercera o cuarta generación y/o aztreonam. En este caso, sobre todo si se trata de una enterobacteria o *P. aeruginosa*, se debe pensar en la posible presencia de una betalactamasa de espectro extendido^{3,4,6} (<http://www.sfm.asso.fr>). La detección de estas betalactamasas será de vital importancia para orientar adecuadamente el tratamiento antibiótico y para iniciar medidas preventivas que reduzcan el riesgo de brotes nosocomiales.

Otro ejemplo, lo tenemos con las carbapenemasas de clase B, enzimas capaces de hidrolizar la práctica totalidad de betalactámicos (excepto monobactams) y se caracterizan por ser inhibidas por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)⁷. La presencia o ausencia de sinergia entre imipenem y EDTA nos permitirá detectar estas enzimas, que cuando están presentes en enterobacterias, resultan difíciles de detectar, pudiendo comportar un fracaso terapéutico⁷.

En otras situaciones, la presencia de sinergia entre carbapenemes y ácido clavulánico nos hace pensar en la presencia de carbapenemasas de la clase A o la presencia de sinergia entre cefalosporinas y cloxacilina, en la posible existencia de una betalactamasa de clase C, que podría ser adquirida. La detección de estas betalactamasas plasmídicas de la clase C en microorganismos portadores de una betalactamasa cromosómica de la misma clase (inducible o constitutiva) puede ser difícil. Un ejemplo es *Escherichia coli* donde resulta difícil de diferenciar la hiperproducción de su betalactamasa cromosómica de la presencia de estas betalactamasas plasmídicas adquiridas de clase C. Recientemente algunos caracteres fenotípicos han sido propuestos para ayudar a sospechar la presencia de estas enzimas plasmídicas⁸.

En otras familias de antimicrobianos, es de gran interés terapéutico la detección de los diferentes mecanismos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. La diferenciación entre un fenotipo de resistencia a macrólidos (M) o macrólidos y estreptograminas (MS_B), de otro de resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS_B) puede ser difícil de detectar por técnicas de microdilución y únicamente se pondrá en evidencia al detectar la presencia o ausencia de sinergia entre un macrólido como la eritromicina y una lincosamida como la clindamicina^{6,9} (<http://www.sfm.asso.fr>). Trabajos como el de Merino et al¹⁰ enfatizan y sitúan en contexto la importancia de la detección de este mecanismo y por extensión la utilidad de las técnicas de disco difusión para complementar, si es el caso, las técnicas de microdilución.

En el caso de la resistencia a macrólidos, existe cierta controversia respecto a la interpretación de los resultados de sensibilidad y no todos los comités de expertos coinciden en interpretar un fenotipo MLS_B inducible como resistente a clindamicina⁶ (<http://www.sfm.asso.fr>). Algunos comités como el de la Sociedad Francesa de Microbiología (<http://www.sfm.asso.fr>), no proponen ninguna interpretación en este fenotipo argumentando que a pesar del riesgo de seleccionar mutantes resistentes si se trata con clindamicina, esto no invalida su utilidad en ciertas situaciones clínicas. En cualquier caso, el conocimiento de la presencia de uno u otro mecanismo tiene sin duda un gran interés clínico permitiendo predecir la respuesta terapéutica en determinadas circunstancias así como un gran interés epidemiológico.

En conclusión, si bien los sistemas de estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos ha experimentado una gran evolución en cuanto a la facilidad de utilización y lectura, siendo muchos los sistemas automatizados disponibles actualmente (tanto utilizando técnicas de microdilución como de disco difusión), existen ciertas pruebas fenotípicas manuales complementarias que aportan las técnicas de difusión, que son imprescindibles para poder realizar una buena lectura interpretada del antibiograma. Muchos de los sistemas automáticos actuales incorporan programas informáticos con sistemas expertos que ayudan en la lectura interpretada del antibiograma y que alertan sobre posibles estudios alternativos que se deban realizar.

Bibliografía

1. Woodford N, Sundsford A. Molecular detection of antibiotic resistance: When and where? *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:259-61.
2. Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:176-83.
3. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:225-34.
4. Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:304-10.
5. Courvalin P. Interpretative reading of antimicrobial susceptibility test. *ASM News.* 1992;58:368-75.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteen informational supplement. CLSI. M100-S16. 2006;26:1-178.
7. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamasas: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306-25.
8. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamasas in *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:370-372.
9. Torres C. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:354-63.
10. Merino L, Cantos A, Torres M, Aznar J. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:77-81.