

# Detección de mecanismos de resistencia

Juan Luis Muñoz y José Ángel García-Rodríguez

Departamento de Microbiología. Hospital Universitario de Salamanca. España.

La aparición de resistencias a los antimicrobianos es paralela al uso clínico de estos agentes. Los mecanismos de resistencia clásicos suelen detectarse fácilmente con las pruebas de sensibilidad *in vitro*. En los últimos años, sin embargo, se están describiendo nuevos mecanismos cuyo reconocimiento puede ser complejo. Las betalactamasas de espectro extendido pueden causar bajo nivel de resistencia o su actividad hidrolítica puede afectar sólo a algunos compuestos. La detección de estas enzimas se facilita demostrando sinergia entre uno o más sustratos (cefalosporinas) y un inhibidor enzimático (ácido clavulánico). En microorganismos que, además, producen betalactamasas cromosómicas resistentes a inhibidores, la detección es aún más difícil, requiriéndose técnicas bioquímicas o genéticas. La resistencia a metilina o la resistencia intermedia a glucopéptidos en *Staphylococcus aureus* puede ser heterogénea (sólo existe en una parte de la población), por lo que se requieren métodos especiales: técnicas genéticas (resistencia a metilina) o análisis de poblaciones (resistencia intermedia a glucopéptidos).

**Palabras clave:** Resistencia. Antibiograma. Betalactamasas de espectro extendido. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina.

Detection of mechanisms of resistance

Emergence of resistance to antibiotics parallels the introduction of these agents into clinical use. Classic mechanisms of resistance are easily detected by *in vitro* susceptibility tests. Recognition of new mechanisms described during the last years, however, may be difficult. Extended-spectrum beta-lactamases may cause low level resistance or may hydrolyze only some compounds. Detection of these enzymes depends on the demonstration of synergism between one or more substrates (cephalosporins) and an inhibitor (clavulanic acid). Detection is even more difficult in organisms which additionally produce chromosomal inhibitor-resistant enzymes; biochemical and genetic tests are required in these cases. Methicillin-resistance or intermediate resistance to glycopeptides in *Staphylococcus aureus* may be

heterogeneous (expressed by only a portion of the whole population) making necessary to use special methods: a genetic test (methicillin resistance) or population analysis (intermediate resistance to glycopeptides).

**Key words:** Resistance. Antibiogram. Extended-spectrum beta-lactamases. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

## Introducción

La capacidad de los microorganismos para desarrollar resistencia a los antibióticos se detectó muy poco después del desarrollo de los primeros antimicrobianos. En el caso de las penicilinas, apenas se habían iniciado los experimentos en animales cuando ya se detectó la primera cepa productora de penicilinas, y 3 años después de comenzar el uso clínico ya se describen los primeros fracasos terapéuticos derivados de la aparición de resistencia.

Desde entonces, con un margen mayor o menor de tiempo, se han desarrollado resistencias a las diferentes familias de antimicrobianos que se han ido desarrollando, desde la resistencia a penicilina descrita en 1940 a la resistencia a linezólida descrita en enterococos y, más recientemente, en estafilococos, y la últimamente descrita resistencia de alto nivel a glucopéptidos, mediada por *vanA*, en *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>.

Uno de los factores esenciales para que la aparición de una resistencia no implique un fracaso terapéutico es su adecuada detección.

Sin embargo, buena parte de los nuevos mecanismos de resistencia que se han ido describiendo tienen una característica común, ser distintos de los que se conocían y que podrían denominarse clásicos.

La práctica totalidad de los mecanismos clásicos guardaban una clara correlación con los resultados de las pruebas de sensibilidad estándar (disco placa, dilución en agar o en caldo) para cada antimicrobiano. En muchos casos la descripción exacta del mecanismo íntimo de resistencia podía ser más compleja, por el menor desarrollo de las técnicas moleculares, pero había una clara correspondencia entre la presencia de un mecanismo de resistencia a un antimicrobiano y la aparición de dicho antimicrobiano como resistente en cualquiera de las pruebas características. Como consecuencia, había una excelente correlación entre lo que reflejaban las pruebas de sensibilidad *in vitro* y el comportamiento *in vivo* del antimicrobiano.

Por el contrario, buena parte de los mecanismos de resistencia de descripción más reciente, se caracterizan por detectarse dificultosamente mediante las técnicas habituales, de modo que la presencia del mecanismo de resistencia no se deduce con facilidad de los resultados del

Correspondencia: Dr. J.A. García.  
Departamento de Microbiología. Hospital Universitario de Salamanca.  
P: San Vicente, s/n. 7007 Salamanca. España.  
Correo electrónico: jagarro@usal.es

antibiograma. Ello lleva a que aparezcan como activos los antimicrobianos frente a los cuales, en realidad, el microorganismo alberga mecanismos de resistencia, e implica por tanto un alto riesgo de fracaso terapéutico, a pesar de una posible sensibilidad *in vitro* mediante los métodos clásicos.

Naturalmente, no todos los mecanismos de resistencia de nueva descripción reciente responden a este esquema. Mecanismos de resistencia a nuevos antimicrobianos, descritos recientemente, como son la mayor parte de las resistencias de alto nivel a glucopéptidos en enterococos y estafilococos o la resistencia a linezolid, siguen el comportamiento habitual en cuanto que se detectan sin dificultad mediante las técnicas habituales de estudio de la sensibilidad.

Sin embargo, varios de los mecanismos de mayor importancia descritos en los últimos años se caracterizan por requerir procedimientos específicos para su diagnóstico o, en alguna ocasiones, por no disponerse de técnicas ampliamente aceptadas.

Este tipo de mecanismos de resistencia incluye los responsables de algunos de los mayores problemas actuales en el campo de los antimicrobianos, como son las betalactamasas de espectro ampliado, la resistencia a penicilina y la tolerancia a vancomicina en neumococos y la resistencia a meticilina y la sensibilidad intermedia a vancomicina en estafilococos.

La resistencia a meticilina en estafilococos deriva, como es bien conocido, de la presencia de una PBP adicional con baja afinidad por los betalactámicos (PBP2a), codificada por el gen *mecA* que, junto con la alteración de otros genes, condiciona la resistencia. El principal problema deriva de que, en la mayor parte de los casos, se trata de poblaciones heterogéneas, en las que sólo una parte, con frecuencia muy minoritaria, de la población, expresa la proteína responsable. En estas condiciones, un estudio disco-placa estándar, con los discos con la carga habitual de antimicrobianos y en las condiciones habituales de incubación, es probable que no sea capaz de detectar esta resistencia.

A lo largo del tiempo han existido diversas tendencias respecto al método ideal para la identificación de *S. aureus* resistentes a meticilina. Actualmente, el National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda utilizar placas con 4% de cloruro sódico y 6 mg/l de oxacilina, incubadas a no más de 35 °C durante 24 h<sup>2</sup>.

## Resistencias en gramnegativos

Como es bien conocido, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) derivan de mutaciones en las betalactamasas plasmídicas clásicas que modifican bien su espectro, ampliándolo a cefalosporinas de tercera generación y monobactamas, bien su susceptibilidad a la inhibición por ácido clavulánico y derivados, haciéndolas resistentes a su acción (Inhibitor Resistant TEM, IRT)<sup>3</sup>.

Las características de estas betalactamasas hacen que los métodos que permitían detectar y caracterizar a las betalactamasas clásicas no sean válidos para ellas. Las betalactamasas clásicas reflejaban perfectamente su actividad en el antibiograma, con la evidencia de resistencia a una serie de antimicrobianos distintos según el tipo de

betalactamasas. Su caracterización, de interés a efectos epidemiológicos y de investigación, aunque con poca trascendencia clínica inmediata, se realizaba adecuadamente mediante isoelectroenfoque.

Esto no ocurre así en el caso de las BLEE. Por una parte, pueden pasar desapercibidas mediante el antibiograma clásico, ya que con frecuencia no producen unas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) elevadas de las cefalosporinas de tercera generación, situadas claramente en la categoría de resistente, por lo que requieren métodos específicos de detección.

Por otra parte, la enorme profusión de BLEE, extremadamente similares desde el punto de vista bioquímico (se diferencian en la mayor parte de los casos en no más de 3 o 4 aminoácidos, y en bastantes ocasiones en uno solo) hace que existan un gran número de ellas con puntos isoelectrónicos muy similares, que no pueden diferenciarse adecuadamente por tanto mediante isoelectroenfoque.

Ello obliga a trabajar con métodos diferentes, con estudios de sensibilidad específicos para su detección y mediante técnicas moleculares que identifiquen de forma precisa su secuencia genética para su caracterización.

Las BLEE derivadas de TEM y SHV son la causa más frecuente de resistencia a aminotiazol-oximino cefalosporinas en nuestro medio. Ello obliga a modificar el modelo de antibiograma que se venía realizando en primera instancia a las enterobacterias más sensibles, y que con frecuencia excluía a cefalosporinas de tercera generación como ceftacídima. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy recomienda que se incluyan ceftacídima y cefpodoxima en todos los antibiogramas, al menos, de los gramnegativos más probables como portadores de BLEE (*Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.), ya que son, entre las cefalosporinas de tercera generación, las que constituyen un mejor sustrato para las BLEE derivadas de TEM y SHV<sup>4</sup>.

Sin embargo, tanto estos como otros gramnegativos pueden ser resistentes a estas cefalosporinas por otros mecanismos, transmisibles o no.

Se ha descrito en diversos gramnegativos, entre ellos el género *Klebsiella*, la presencia de cefalosporinasas tipo AmpC de codificación plasmídica, además de la posible presencia de enzimas cromosómicas de este tipo en otras enterobacterias. Estas enzimas hidrolizan eficazmente cefoxitina y aztreonam, de modo que la inclusión de estos antimicrobianos constituye un apoyo útil para la inferencia de la posible enzima implicada.

Además, las BLEE más próximas a las cefalosporinasas cromosómicas como son las de tipo CTX-M, hidrolizan en menor medida ceftacídima y aztreonam, pero hidrolizan eficazmente cefotaxima. Aunque son infrecuentes en Europa occidental, son prevalentes en Sudamérica y se han descrito en Europa oriental, por lo que su presencia se debe considerar<sup>5</sup>.

En conjunto, el uso de estos antimicrobianos permite establecer unos fenotipos que pueden orientar hacia la sospecha de la presencia de una u otra de estas enzimas. En cualquier caso, la característica que permite corroborar definitivamente la presencia de una BLEE es el sinergismo entre cefalosporinas de tercera generación y el ácido clavulánico.

A estos efectos, es recomendable incluir tanto cefotaxima como ceftacídima, ya que las enzimas tipo CTX-M pueden no

mostrar un sinergismo claro entre ceftacidima y ácido clavulánico<sup>4</sup>.

La determinación de este sinergismo puede realizarse por diversos métodos. Los de doble disco, en los que a una placa inoculada con la cepa problema le colocan discos de amoxicilina clavulánico (20 g + 10 g), cefotaxima y ceftacidima (30 g) a una distancia de 25-30 mm, tienen la ventaja de su sencillez y bajo precio, y la desventaja de que la distancia ideal puede variar de una cepa a otra.

Se puede recurrir también al uso de tiras de E-test que combinan una cefalosporina aislada en un extremo y la misma cefalosporina más ácido clavulánico en el otro. Si la proporción entre las CIM obtenidas en uno y otro extremo es superior o igual a 8 se admite la presencia de sinergismo. Una variante son los discos que contienen ya el antibiótico y el inhibidor, considerándose positivo cuando este disco origina halos al menos 5 mm mayores que el disco con el antibiótico solo, al menos con un diámetro de más de 5 mm.

Cualquiera de estas pruebas es capaz de detectar a la mayor parte de las BLEE. Desde el punto de vista práctico, la principal consecuencia es que todas las bacterias en las que se deduzca la presencia de una BLEE deben considerarse resistentes a todas las cefalosporinas de amplio espectro, con independencia de los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad habituales.

La detección de BLEE en géneros distintos a *E. coli* y *Klebsiella*, mucho menos frecuentes, tiene la dificultad adicional de que, con frecuencia, conviven con otras enzimas e, incluso, con mecanismos de resistencia no enzimáticos. En el caso de caso de enterobacterias, esto implica sobre todo cefalosporinasas cromosómicas inducibles o desreprimidas. En estos casos puede ser muy problemática su detección, mientras en *Pseudomonas*, habitualmente puede ser orientativo el hecho de que las BLEE suelen dar CIM elevadas de ceftacidima (> 64 mg/l), habitualmente superiores a las originadas por cefalosporinasas y problemas de permeabilidad. Un dato importante es que, en *P. aeruginosa*, los estudios de sinergismo con ácido clavulánico no tienen utilidad.

En todos los casos, la caracterización definitiva de la enzima requiere la secuenciación del gen codificador de la betalactamasa o de un fragmento representativo.

## Resistencias en grampositivos

En el caso de los grampositivos pueden diferenciarse dos tipos de mecanismos entre los que plantean problemas en la actualidad: *a*) aquellos que se detectan adecuadamente mediante las pruebas sistemáticas de sensibilidad, aunque su caracterización molecular pueda ser más o menos dificultosa, y *b*) aquellos que requieren estudios de sensibilidad específicos para su detección. Dentro de éstos, probablemente los de mayor importancia son los que se refieren a la detección de resistencia a meticilina y la detección de resistencia intermedia a glucopéptidos en *S. aureus*.

En el caso de la resistencia a meticilina, la clave del problema está en la expresión heterogénea de la resistencia dentro de una misma población bacteriana, de modo que puede haber grandes diferencias de resistencia entre las células individuales de una población.

Se han producido numerosas propuestas sobre los métodos más recomendables para su detección, basadas en la modificación de diversas condiciones (tiempo de incubación, temperatura, concentración de cloruro sódico).

En la actualidad, de todas las condiciones propuestas, para la mayor parte de los métodos se conserva la adición de cloruro sódico, se considera necesario modificar la temperatura de incubación sólo en algunos métodos y no se considera necesario prolongar el tiempo de incubación respecto a las condiciones estándar. En cambio, la detección de resistencia en estafilococos coagulasa negativos requiere incubación de 48 h en la mayor parte de los métodos<sup>2,6</sup>.

Se consideran cepas intermedias (*borderline*) aquellas con CIM o halos en los límites de sensibilidad. Este comportamiento puede deberse a tres mecanismos:

1. Hiperproducción de penicilinasas.
2. Alteraciones en PBP.
3. Cepas resistentes a meticilina con alto nivel de heterogeneidad.

Las primeras se han pretendido diferenciar de *S. aureus* resistentes a meticilina verdaderos mediante la modificación del halo de meticilina u oxacilina por ácido clavulánico, pero no es un método recomendable, ya que algunos *S. aureus* resistentes a meticilina verdaderos también incrementan su halo en estas circunstancias.

En estos casos, y en cualquier circunstancia en que se pretenda caracterizar de forma definitiva la resistencia, el método adecuado es la detección del gen *mecA* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Del mismo modo, han existido controversias relativas a la detección de la resistencia intermedia a glucopéptidos en *S. aureus*, aunque en la actualidad existe un mayor consenso respecto a la mayor utilidad de los métodos basados en el estudio de poblaciones<sup>7</sup>.

## Bibliografía

1. Mohammed JM, Weigel L, Clark N, McDougal L, Raney P, Withney A, et al. High-level vancomycin resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. 42nd ICAAC, San Diego, California, 2002. Abstract n° LB-7.
2. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed. Wayne: NCCLS document M7A5, 2000.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
4. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl 1):59-64.
5. Bauerfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC  $\beta$ -lactamases: How far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998;39:520-5.
6. Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 2001;48(Suppl 1):65-70.
7. Bischoff M. The genetic basis of glycopeptide resistance. 41st ICAAC, Chicago, 2001. Abstract n° 1068.