

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Microbiología Clínica. Clínica Hospital de Clínicas-UBA. Laboratorio de Bacteriología

Carlos Hernán Rodríguez, Jonathan J. Maza, Carlos A. Vay, Marcela B. Nastro, Angela MR Famiglietti.

Detección Rápida de Resistencia adquirida a Colistina en *Enterobacteriaceae*

Revisión de la literatura

DIFUSION: Las polimixinas difunden poco en MHA y tienden a producir halos de inhibición pequeños independientemente de la concentración de disco utilizada (10 µg -50 µg o 300 U) o si se usa COL o polimixina B. La gran cantidad de errores “very major” (EVM) que se producen se debe a que no se puede diferenciar aquellos aislamientos sensibles de los que son resistentes o no sensibles (CIM > a 2 µg/ml); por lo tanto, cualquier halo de inhibición debería ser confirmado mediante dilución. No se detecta falsas resistencias (halos de 6 mm).

PREDIFUSION: Esta metodología no representa grandes ventajas con respecto a la difusión debido a que no puede diferenciar aislamientos sensibles de aquellos resistentes con un valor de CIM cercano a 4 µg/ml.

ETEST: Diversos estudios /resultados se han publicado con respecto a la correlación del Etest y la dilución con las polimixinas. En líneas generales a medida que aumenta la presencia de aislamientos resistentes a COL disminuiría la performance del este método (Tabla 1). Según algunos autores las tiras de Etest tenderían a producir valores de CIM 1 0 2 diluciones menores que las obtenidas por dilución. Por este motivo los aislamientos que por dilución presentan valores de CIM de 8 µg/ml o 4 µg/ml (resistentes) darían por Etest valores de 2 µg/ml (sensibles) produciéndose EVM.

Tabla 1

Autor	año	R a COL N (%)	EVM	EVM en RCOL	CA ¹	EA ²	METODO DE REFERENCIA
Arroyo	2005	115 (19)	1,7	9	98,2		Dilución caldo
Lo Ten Foe	2007	102 (42)	&	ND	ND	72,6	Dilución caldo
Tan	2007	172 (31)	4,7	6,6	87	75	Dilución agar
Behera	2010	281 (8,5)	1	30			Dilución caldo
Maalej	2011	150 (17)	0	0	52	33	Dilución agar
Lee	2013	213 (6,1)	0	0	99,1		Dilución agar
Hindler	2013	107 (13)	47	32	91	61	Dilución polisorbato
Dafopoulou	2015	61 (95)	39,3	41	59	50,8	Dilución caldo
Chew	2017	66 (31)	12	ND	92,1	75	Dilución caldo

&: alto grado de concordancia;

¹ CA: concordancia o acuerdo dentro de las mismas categorías de sensibilidad;

² EA: acuerdo esencial, los valores de CIM se encuentran dentro de $\pm 1 \log_2$ de dilución entre sí.

METODOS AUTOMATIZADOS: Un menor número de trabajos se han publicado con respecto a la capacidad de los métodos automatizados para realizar las pruebas de sensibilidad a COL. También en este tema se observa una gran variación de resultados y conclusiones. Como ejemplo de esta dispersión de resultados un mismo grupo de trabajo ha publicado 2 trabajos sucesivos, con aislamientos de la misma área geográfica y porcentajes de resistencia a COL similares, donde los EVM encontrados fueron del 0 % y del 40 %. En líneas generales se detecta un mayor número de errores a medida que se incrementa la participación de aislamientos resistentes en los trabajos. Básicamente, los principales problemas hallados se encuentran en la falta de sensibilidad, pero alta especificidad para la detección de la resistencia a COL. Por lo tanto, si el aislamiento se categoriza como resistente no habría falsa resistencia y el resultado no debería ser confirmado, sin embargo, si fuera detectado como sensible debería confirmarse mediante dilución en caldo. Trabajos más recientes (2017) mencionan como causa de la mayor cantidad de EVM a la heteroresistencia presente en aislamientos de *Enterobacter* spp. En estos aislamientos heteroresistentes a colistina (HCOL) detectados por Landman, se observa un comportamiento irregular en la CIM debido a que crece a mayores concentraciones y deja de crecer a concentraciones menores (“skip wells” o pocillos saltarines). Estos saltos, poco reproducibles, en el

crecimiento se observan más frecuentemente entre las concentraciones de 0,12 µg/ml y 8 µg/ml, no solo afectan la capacidad de detección de los equipos automatizados que utilizan concentraciones entre 0,5 µg/ml y 16 µg/ml, sino que también pueden provocar que la CIM sea No-interpretable si se observan varios saltos de crecimiento entre las diferentes concentraciones del antimicrobiano. Por otro lado, Guerin y otros autores determinaron que la HCOL en *Enterobacter* spp es “cluster” dependiente. Landman además, advierte que debería ensayarse un mayor número de concentraciones y no solamente las cercanas al punto de corte para efectuar la prueba de sensibilidad a COL poniendo en duda también a los métodos rápidos de detección de la resistencia que utilizan solo una concentración. Sin embargo, Nordmann en un estudio publicado en 2017 que incluye 7 aislamientos de *Enterobacter* spp HCOL, pudo detectarlos a todos.

DILUCION: En el año 2016 en un documento conjunto el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) recomiendan solamente la metodología de dilución en caldo (micro y/o macrodilución) para realizar la prueba de sensibilidad a colistina (técnica de referencia). Sin embargo, la dilución en agar ha demostrado tener una buena correlación con la dilución en caldo y permite ensayar varios aislados simultáneamente y evita el fenómeno de adsorción de COL al plástico. Algunos autores proponen agregar polisorbato 80 (Tween 80) al Mueller-Hinton para evitar la adsorción de las polimixinas al plástico, pero el agregado de este compuesto provoca una disminución en los valores de la CIM. Actualmente, no se recomienda el uso de Tween 80 en la realización de las pruebas de dilución. El uso de tubos de vidrio disminuye este fenómeno de adsorción.

Precauciones para la realización de la CIM

- No usar colistina metanosulfonato (colistina inyectable, por ser una prodroga inactiva IN Vitro)
- Ajustar el inóculo final a 5×10^5 UFC/ml (dilución 1/100 de escala 0,5 Mc Farland) para evitar el efecto inóculo.
- Utilizar siempre caldo Mueller-Hinton sin ningún agregado o suplemento.

METODOS RAPIDOS DE DETECCION DE RESISTENCIA A COLISTINA

En 2016 Nordmann publica un método de detección rápido de la resistencia a COL en enterobacterias, evaluando el crecimiento en una solución glucosada con el agregado de COL en una concentración final de 3,75 µg/ml. La sensibilidad y especificidad de este método, 99,3 % y 95,4 % respectivamente; permite considerarlo como una buena y rápida alternativa para detectar resistencia adquirida a COL.

En el año 2017 en el Hospital de Clínicas “José de San Martín” adaptamos dicha técnica a reactivos ya utilizados en nuestro laboratorio y además empleamos (a diferencia de Nordmann) el mismo inóculo con el que realizamos las pruebas de sensibilidad a los demás antimicrobianos.

REACTIVOS Y PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACION DE LA PRUEBA RAPIDA

REACTIVOS NECESARIOS

1- Medio base para la fermentación de hidratos de carbono (Andrade)

Composición:

Peptona	10 g
Extracto de carne	3g
CINa	5g
Indicador de Andrade*	10ml
H ₂ O csp	1000ml

Esterilizar mediante autoclave 15 minutos a 121°C.

***Indicador de Andrade:**

Fucsina ácida	0,5 g
NaOH 1N	16ml
H ₂ O csp	100ml

Disolver la fucsina en aproximadamente 70 ml de H₂O destilada y agregar 1 espátula de carbono activado. Calentar y filtrar en caliente. Sobre el filtrado

agregar 16 ml de NaOH. Si luego de varias horas no decolora agregar 1-2 ml más de NaOH. Completar con H₂O hasta 100 ml. Conservar en frasco color caramelo en heladera.

2- Solución de stock de glucosa

Se prepara al 10 % en H₂O destilada estéril y se adiciona 1 ml de cloroformo (esterilización) cada 10 ml de solución. Se dejan 5 días en reposo antes de usar. Conservar a T. ambiente.

3- Solución stock de colistina

Pesar 5 mg de sulfato de colistina y disolver en 5 ml de H₂O destilada (1000 µg/ml). Conservar a -20 °C (freezer)

4- Tubos para prueba rápida de detección de resistencia a colistina

Por cada 20 ml de caldo andrade se agregan 2 ml de solución stock de glucosa. Esta se subdivide en dos alícuotas de 10 ml cada una.

Se fracciona 0,5 ml en cada tubo (20 test)

a- Tubo Testigo: Se agrega 30 µl de H₂O destilada.

b- Tubo Prueba: Se agrega 30 µl de solución stock COL (concentración final de COL: 3 µg/ml).

c- Tubo Control Positivo: Idem Tubo Prueba, pero se inocula con 30 µl de un aislamiento con resistencia a colistina, confirmada mediante sensibilidad por dilución.

PROCEDIMIENTO

Se prepara un inóculo del aislado a investigar con una turbidez equivalente al tubo 0,5 de Mac Farland. Se inoculan 30 µl de dicha suspensión al Tubo Testigo y al Tubo Prueba. Se incuba 3 horas a 37°C

Siempre se debe utilizar un Tubo Testigo, un Tubo Prueba y un Tubo Control Positivo.

Especies de la Tribu *Proteae* (resistentes naturalmente a COL) no se recomiendan como control positivo porque necesitan mayor tiempo de incubación (más de 5 horas) para dar la reacción positiva.

Interpretación de resultados

La interpretación de los resultados se observan en la tabla 2 y figura 1

Tubo Testigo: fucsia indica crecimiento del microorganismo en la solución de Andrade sin COL, evidenciado por la fermentación de la glucosa que provoca viraje del indicador (de incoloro pasa a fucsia).

Tubo Testigo y Tubo Prueba: Ambos fucsia, se corresponde con un aislamiento resistente a COL.

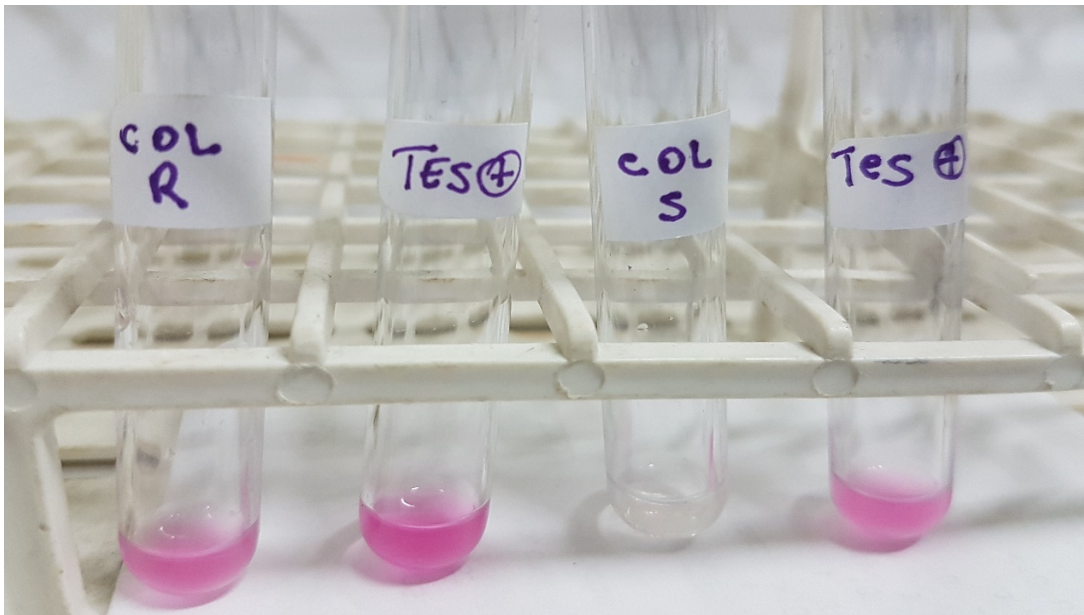
Tubo Testigo fucsia y Tubo Prueba: Incoloro, se corresponde con un aislamiento sensible a COL.

Tubo Testigo incoloro, independientemente del color observado en el Tubo Prueba indica no crecimiento del aislamiento y la prueba debería ser reevaluada.

Tabla 2

Aislamiento	Resultado	
	Tubo Prueba	Tubo Testigo
Sensible	fucsia	incoloro
Resistente	fucsia	fucsia
Control positivo	Fucsia	fucsia

Figura 1



Resultados obtenidos

Hasta el momento se evaluaron 135 enterobacterias (98 sensibles y 35 resistentes) con los siguientes resultados:

SENSIBILIDAD: 94,5 % y ESPECIFICIDAD: 100 %

Tabla 3: Resultados obtenidos Hospital de Clínicas.

Aislamientos		Nº	Prueba Rápida (+)	Prueba Rápida (-)
Sensibles	CIM ≤ 2 µg/ml	98		98
Resistentes	CIM 4 µg/ml	4	2	2 ^{&}
	CIM 8 µg/ml	6	6	
	CIM ≥16 µg/ml	25	25	

&: 2 aislamientos de *Escherichia coli*

CONCLUSIONES E INTERROGANTES

- Un aislamiento resistente no debería ser confirmado ya que el problema de la mayoría de los métodos no es la especificidad (Falsas resistencias)
- En cambio, un aislamiento sensible sí debería ser confirmado mediante dilución en caldo (micro o macro-método) cuando este antimicrobiano sea utilizado en un paciente.
- Los métodos rápidos muestran, hasta el momento según nuestra experiencia, buenos resultados para el ensayo de sensibilidad a COL.
- Debería investigarse la presencia de la HCOL en *Enterobacter spp* en los aislados recuperados en Argentina.

Bibliografía

1. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016;(March, 22):2016. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations fo MIC determination of colistin March 2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf)
2. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
3. Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, Giard JC. Cluster 348 dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. J Antimicrob Chemother. 2016;71(11):3058–61.

4. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(8): 4625-30.
5. Lee SY, Shin JH, Lee K, Joo MY, Park KH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW, Kim SH. Comparison of the vitek 2, microscan, and etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean University Hospital. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(6):1924-6.
6. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1678–84.
7. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against *Enterobacteriaceae*. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53(5):546-51
8. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (10): 3726-30.
9. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(12):4106-11.
10. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:557–96.
11. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2016; 22:1038–43.
12. Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, Aznar J. 2005. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:903
13. Tan TY, Ng SY. 2007. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:541-544.
14. Vourli S, Dafopoulou K, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. 2017. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemoter*