

Libros de **Cátedra**

DetECCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Normas y herramientas de laboratorio
en medicina veterinaria

Gabriela Isabel Giacoboni, Fabiana Alicia Moredo
Florescia Laura Pantozzi

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

NORMAS Y HERRAMIENTAS DE LABORATORIO
EN MEDICINA VETERINARIA

Gabriela Isabel Giacoboni
Fabiana Alicia Moredo
Florencia Laura Pantozzi

Facultad de Ciencia Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



A todos los médicos veterinarios que deseen colaborar con la contención de la resistencia a los antimicrobianos.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, la que nos ofrece de diversas maneras la posibilidad de transmitir a la comunidad información para acrecentar nuestros conocimientos.

Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia

-Luis Pasteur

Hay reglas sencillas para el uso de la Penicilina: usarla sólo para los microbios que sean vulnerables a ella, aplicar la dosis indicada y que el tratamiento dure lo suficiente para eliminar la infección; siguiendo estas reglas, todos quedarán satisfechos; de lo contrario, el resultado será decepcionante

-Sir Alexander Fleming

Índice

Introducción

PRIMERA PARTE

CAPÍTULO 1

Importancia de la Resistencia Antimicrobiana en el Marco de Una Salud

Gabriela Isabel Giacoboni

CAPÍTULO 2

Resistencia Antimicrobiana Definiciones

Florencia Laura Pantozzi

CAPÍTULO 3

Resistencia Antimicrobiana Clasificación

Florencia Laura Pantozzi

CAPÍTULO 4

Listas de Antimicrobianos de Uso en Medicina Humana y Veterinaria

Gabriela Isabel Giacoboni

CAPÍTULO 5

Diagnóstico de la Resistencia Antimicrobiana

Florencia Laura Pantozzi

CAPÍTULO 6

Métodos Básicos de detección de la Sensibilidad Antimicrobiana en el Laboratorio de Bacteriología

Florencia Laura Pantozzi

SEGUNDA PARTE

CAPÍTULO 7

Estándares veterinarios para pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Fabiana Alicia Moredo

CAPÍTULO 8

Aplicación del antibiograma en el diagnóstico de laboratorio veterinario

Fabiana Alicia Moredo

Conclusiones

Los autores

Introducción

El descubrimiento y la introducción de agentes antimicrobianos fue uno de los mayores triunfos en el ámbito de la salud del siglo XX que revolucionó el tratamiento de las infecciones bacterianas. Así estos agentes se los considera como un *Bien público mundial*. Si bien la resistencia antimicrobiana (RAM) no es un fenómeno nuevo, en los últimos años se acrecentó y diseminó de manera dinámica y es una epidemia el mundial. El uso inadecuado de los antimicrobianos es uno de los factores que colaboran a la emergencia de bacterias con resistencia. En medicina veterinaria la prescripción de los antimicrobianos es uno de los pilares que sustentan la sanidad animal. Una de las maneras de hacer su uso de manera responsable es la utilización de pruebas de diagnóstico de laboratorio para predecir la sensibilidad a los antimicrobianos y así prescribirlos de una manera racional y prudente. Las pruebas y estándares de laboratorio que elaboran los comités internacionales para medicina veterinaria son relativamente nuevas. Requieren exhaustivos estudios debido a la amplia diversidad de especies animales (principal diferencia con la especie humana). Este libro ofrece a la comunidad veterinaria la actualización del enfoque de las prácticas de laboratorio como herramienta para colaborar a la contención de la RAM con la concepción de Una Salud.

CAPÍTULO 1

Importancia de la Resistencia Antimicrobiana en el Marco de Una Salud

Gabriela Isabel Giacoboni

El concepto Una Salud se basa en la interdependencia entre la salud humana y la salud animal, vinculadas al medio ambiente en el que conviven. La visión y perspectiva de este concepto data desde hace muchos años y se consolida en el año 2010 con la creación de una alianza tripartita entre la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para trabajar en forma conjunta con esa proyección (FAO-OIE-WHO 2010). Esta concepción sobre el tema y el compromiso de educar a las futuras generaciones con esa perspectiva está apoyada por otras instituciones tales como *One Health Commission* y *One Health Initiative* (Lueddeke, 2016, p.2).

Los antimicrobianos son drogas que se utilizan para prevenir y tratar enfermedades, sin importar su origen, y la resistencia que los microorganismos desarrollan a ellas es uno de los grandes problemas que se abordan como Una Salud. Es una estrategia que utilizan para subsistir a los diferentes desafíos que les ofrece el medio donde estos compuestos están presentes y a pesar de que hoy es uno de los principales problemas a los que la comunidad científica mundial afronta, es tan antigua como la presencia de estas moléculas en el entorno natural (Wright, G 2007, p. 178).

El concepto de resistoma, como el conjunto de todos los genes que contribuyen directa o indirectamente a la resistencia a los antimicrobianos, involucra además de los genes de resistencia de las bacterias patógenas (resistoma clínico) a todos aquellos del medio ambiente. En él, se encuentran no solo bacterias resistentes sino también genes que codifican para proteínas involucradas en los mecanismos de la resistencia antimicrobiana (RAM) y que son sometidos a la presión de selección por la contaminación del hombre (residuos de uso clínico, de agricultura y ganadería, aguas residuales sin descontaminar, etc. (Amábile-Cuevas, 2021, p. 4).

Así, el avance y dispersión de bacterias resistentes se potencializa por circunstancias que el hombre propició tales como: “deficientes prácticas de prevención y control de infecciones y enfermedades, uso inadecuado y uso excesivo de los antimicrobianos en las prácticas de producción agropecuaria y en la salud pública” (FAO, 2018).

La OMS declaró a la RAM como una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad (OMS 2020). Las distintas formas de uso de los antimicrobianos en medicina veterinaria que además del uso terapéutico y profiláctico, como en medicina humana, tiene indicaciones de uso metafiláctico y como promotor de crecimiento, expone a la profesión a un mayor compromiso al momento de prescribirlos.

Como lo expresa la OIE, “las acciones coordinadas para la utilización prudente y responsable de los agentes antimicrobianos colabora a la preservación de estos medicamentos para el control de enfermedades que afectan a la población humana y animal”. Esta organización describe normas internacionales para el uso responsable de antimicrobianos y compromete al médico veterinario como parte de la solución actuando acorde a las directrices para el uso de antimicrobianos y la vigilancia de la resistencia OIE (2021).

En 2016, la 84ª Asamblea General de la OIE adoptó consolidar las acciones para combatir la RAM proponiendo la Estrategia sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos conforme con el Plan de acción mundial iniciado por la OMS (2005) y desde 2010, forma parte, junto con la OMS y la FAO, de la Alianza Tripartita en enfoque «Una Sola Salud» OIE (2016).

La *Estrategia* tiene cuatro objetivos principales que son:

- Mejorar la concienciación y la comprensión
- Reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación
- Apoyar la buena gobernanza y el refuerzo de competencias
- Promover la aplicación de normas internacionales

Por otro lado, en el año 2008, la OMS estableció el grupo Asesor para la Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos (AGISAR). El objetivo de dicha comisión está dirigido a minimizar el impacto en la salud pública, debido a la resistencia a los antimicrobianos por el uso en animales de producción y el desarrollo de programas de vigilancia integrada de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias transmitidas por los alimentos adoptando un enfoque de Una sola salud (OMS/AGISAR, 2017).

Para destinar de manera prudente los antimicrobianos que se utilizan en medicina humana y veterinaria, la OMS los clasificó y agrupó por su importancia en el uso para el tratamiento de infecciones en humanos. Así esa lista incluye drogas de importancia crítica, muy importantes e importantes.

Esta organización también publicó la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos. En ella figuran 12 familias de bacterias (algunas zoonóticas) que representan la mayor amenaza para la salud humana debido a la falta de drogas para que respondan al tratamiento OMS (2017).

Recientemente, la FAO estableció los sectores o grupos de interés y su influencia en el problema de la RAM. Así dentro de los que denomina “aliados” involucra a las instituciones y/o

personas del ámbito nacional o internacional que tienen elevada influencia y que apoyan o están de acuerdo con la necesidad de incrementar las acciones tendientes a la contención de la RAM. A su vez, los aliados están clasificados en grupos de interés primario y secundario según puedan tomar decisiones y poder de acción para la solución del problema y aquellos que pueden influir en las decisiones respectivamente. Las Facultades de Medicina Humana y Veterinaria junto con los Colegios de Médicos y Veterinarios se encuentran dentro del grupo de los aliados (FAO 2018).

La información y avance de las diferentes disciplinas para aportar herramientas e intentar contener la RAM, se pone de manifiesto con actualizaciones cotidianas y exige la constante información por parte de los profesionales para adoptarlas y ponerlas en práctica.

Dentro de las más recientes está la secuenciación del genoma completo para evaluar el contenido de los genes de la RAM. Más aún, se publicó un catálogo con la base de datos, lo que permitirá una mayor precisión en la identificación de genes RAM, relacionando genotipos, fenotipos, y determinar las posibles relaciones entre RAM, virulencia y respuesta al estrés (Felgarden, M 2021, p.1278).

Las pruebas de diagnóstico para predecir la sensibilidad a los antimicrobianos es una de las prácticas indicadas para su uso prudente y responsable (OIE). Hasta hace no muchos años, en las bacterias de origen animal no se realizaban este tipo de pruebas o eran propias de trabajos de investigación, más aún se hacían bajo las normas que rigen a la medicina humana.

El problema de la RAM motivó a los equipos de trabajo a definir directrices para interpretar la sensibilidad *in vitro* de los antimicrobianos en animales. Las diferencias entre especies y el comportamiento de las drogas según la farmacocinética y farmacodinamia ofrece valores más aproximados. De esta manera, la predicción *in vitro* de la sensibilidad de patógenos de origen animal tiene un fundamento racional.

Así en la actualidad, las pruebas que se utilizan para evaluar *in vitro* el comportamiento de los antimicrobianos en medicina veterinaria tienen normativas y documentos propios para poder prescribir tratamientos basados en ellas, y promover su uso responsable. Se pueden encontrar en el *Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST 2015) y *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estándares para medicina veterinaria (CLSI 2021).

Este libro tiene como objetivo dar a conocer el alcance de las pruebas de laboratorio de bacteriología en la medicina veterinaria y la interpretación de sus resultados como una herramienta para colaborar a la contención de la RAM con la concepción de Una Salud.

Referencias

Amábile-Cuevas,CF. 2021. Antibiotic resistance from, and to the environment. *Environmental Science*, 8(1): 18–35.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2021 (CLSI) <https://clsi.org/>

- Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, Hofmann M, Pettengill JB, Prasad AB, Tillman GE, Tyson GH and Klimke W. 2021 AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep* 11, 12728 . <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- Grupo Asesor de la OMS sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos (AGISAR) 2017 <http://www.agisar.org/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) 2018 Concienciación y abogacía para la contención de la resistencia a los antimicrobianos. Directrices para el diseño de estrategias bajo el enfoque una salud. Recuperado de (www.fao.org/publications)
- Lueddeke GR, Kaufman GE, Kahn LH, Krecek RC, Willingham AL, Stroud CM, Lindenmayer JM, Kaplan B, Conti LA, Monath TP, Woodall J. 2016. Preparing society to create the world we need through 'One Health' education, *South Eastern European Journal of Public Health* (SEEJPH). <https://doi.org/10.4119/seejph-1841>
- FAO-OIEWHO Collaboration. A Tripartite Concept Note, 2010 https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Current_Scientific_Issues/docs/pdf/FINAL_CONCEPT_NOTE_Hanoi.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2016) Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente, https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/PortalAMR/ES_OIE-AMRstrategy.pdf
- European Committee on antimicrobial resistance VET CAST https://eucast.org/ast_of_veterinary_pathogens/
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2021). <https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/resistencia-antimicrobiana>. Recuperado 10 de julio 2021
- Organización Mundial de la Salud (27 de febrero 2017) Lista de bacterias de las que se necesitan nuevos antibióticos . <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Recuperado 10 de julio 2021
- Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud. Resistencia a los antimicrobianos 13 de octubre 2020 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Recuperado 10 de julio 2021
- Wright GD. 2007 The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* volume 5, pages175–186 <http://doi.org/10.1038/nrmicro1614>

CAPÍTULO 2

Resistencia Antimicrobiana Definiciones

Florencia Laura Pantozzi

¿Qué se entiende por resistencia a los antimicrobianos?

Definiciones

OIE 2003: La resistencia antimicrobiana (RAM) es la capacidad de una bacteria de sobrevivir a la exposición de una concentración definida de una sustancia antimicrobiana.

Resistencia Clínica: las bacterias sobreviven a un tratamiento adecuado con un antimicrobiano (ATM).

Resistencia Microbiológica-Molecular: las bacterias adquieren un mecanismo por el cual elevan las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) con respecto a las bacterias originales o salvajes.

Resistencia Farmacológica: las bacterias sobreviven a las concentraciones de un ATM presentes en las diferentes partes del cuerpo, cuando es administrado a la dosis recomendada.

Resistencia Epidemiológica: cualquier grupo o población de cepas bacterianas que se diferencia de la CIM normal a un ATM en la distribución de Gauss.

Resistencia versus persistencia

Cuando las bacterias se exponen a un ATM, existen dos posibilidades, que éste interactúe con células resistentes o persistentes. Si hay células bacterianas resistentes a dicho ATM, morirán las bacterias sensibles quedando solo las resistentes, que al crecer y multiplicarse originará que todas las bacterias del cultivo sean resistentes. Dicho de otro modo, si una bacteria es resistente a un determinado ATM, todas las células hijas también serán resistentes, a menos que ocurran mutaciones adicionales. La otra posibilidad es que el ATM interactúe con células bacterianas persistentes, que son bacterias no sensibles al ATM, pero que no poseen genes de resistencia. La persistencia se debe sin duda al hecho de que algunas células de una población bacteriana pueden estar en fase de crecimiento estacionaria, latentes y la mayoría de los ATM no tienen ningún efecto sobre las células que no están creciendo y dividiéndose activamente.

Estas células persistentes se producen a una tasa de alrededor del 1% en un cultivo que se encuentra en fase estacionaria (Keren y col., 2004; Wood y col., 2013).

Origen y transferencia de los genes de resistencia

La evolución genética de las cepas bacterianas resistentes es un fenómeno de selección natural. Los antibióticos naturales (ATB), producidos por microorganismos ambientales, los cuales, constituyen el origen evolutivo, existen desde la existencia de las bacterias en la Tierra hace aproximadamente unos 3.500 millones de años. La base del desarrollo de la RAM está en la selección de cepas resistentes que se generan a partir de ciertas concentraciones de ATB y antibióticos semisintéticos y sintéticos, denominados también antimicrobianos (ATM). La RAM es la respuesta evolutiva a la fuerte presión selectiva que resulta de la exposición a estos compuestos (Wright, 2010). El ATM no induce resistencia, solamente selecciona las bacterias resistentes eliminando las sensibles. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia, en el sitio del organismo de que se trate o en la naturaleza; en presencia del ATM sobrevivirán solo aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones del mismo, presentes en ese lugar. El ATM se convierte en el primer factor de selección, y es lo que se conoce con el nombre de presión selectiva. Una cepa bacteriana es resistente a un ATM determinado cuando para inhibirse necesita concentraciones de fármacos superiores a la concentración que el agente ATM puede alcanzar en el sitio de la infección (Pantozzi, 2018).

El resistoma y moviloma antibiótico

La transferencia horizontal de genes es un fenómeno significativamente mayor que la transferencia vertical, y entre los organismos unicelulares posiblemente es la forma dominante de transferencia genética (Edwards, 2010; Arnold, 2011). Es considerada la primera causa de la RAM, jugando un rol importante en la evolución bacteriana. (Koonin y col., 2001, Nielsen, 1998, OECD, 2010). En la transferencia, la bacteria receptora, obtiene la información genética que codifica la RAM de otra bacteria que es resistente. Los elementos móviles, plásmidos, transposones, integrones y casetes genéticos, son la principal fuerza impulsora en la transferencia horizontal de genes entre cepas, especies y géneros cercanos y filogenéticamente distantes y son responsables de la rápida propagación de elementos particulares en toda una comunidad bacteriana y entre los ecosistemas (Roberts, 2011).

Es muy importante, como lo mencionan Prescott y col. (2002), considerar que el interés científico, haya enfocado sus prioridades sobre las bacterias patógenas, desestimando lo que podría ocurrir con las saprófitas. Mientras tanto, esta porción “inofensiva” de la población bacteriana siguió actuando como reservorio de resistencias. Esta hipótesis conocida como

“hipótesis del reservorio” asume que cierta concentración de ATM es necesaria para inducir o seleccionar bacterias resistentes que se mantendrán como reservorio cuando la población sensible haya desaparecido (Sundin y Bender, 1996; van der Waaji, 1971). Luego de la introducción en la clínica de un nuevo ATM, en un plazo variable de tiempo, aparecen variantes bacterianas resistentes contra las que se pretende luchar con la nueva droga. Esto se ha ido cumpliendo inexorablemente con la mayoría de los ATM. Esto no implica que, con el uso criterioso y racional de los mismos no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias, aunque en los últimos tiempos se ha visto acelerado principalmente por el uso inapropiado de estos compuestos.

El concepto del resistoma antibiótico, comprende el conjunto de todos los genes que contribuyen directa o indirectamente a la RAM; el resistoma clínico, el medioambiental, el intrínseco y el de los precursores de la resistencia (Baquero, 2012). Los microorganismos, muchos de ellos del suelo, están expuestos a la acción selectiva de los ATB producidos por otros microorganismos o liberados al medio tras su uso en humanos, animales o plantas, o a la acción de otros compuestos tóxicos, entre ellos metales pesados, biocidas, etc., de diversos orígenes y por ello han tenido que desarrollar estrategias de defensa frente a todos estos compuestos. Todos estos genes del resistoma ambiental pueden ser movilizados por mecanismos de transferencia horizontal a bacterias, tanto patógenas como saprófitas, de otros ecosistemas, incluyendo el compartimento humano, animal o el acuático entre otros. Al conjunto de todas estas plataformas de movilización de genes de resistencia, más otras funciones que existen en la naturaleza, se lo denomina moviloma antibiótico.

El estudio del resistoma antibiótico, entendido desde esta perspectiva global, es complejo pero permitirá entender las bases moleculares de la resistencia, su origen y su evolución, así como comprender por qué la resistencia es tan prevalente y emerge tan rápidamente después de la incorporación de los ATM en la clínica. El siguiente paso sería, estudiar en mayor profundidad, los mecanismos de movilización por transferencia horizontal de estos genes del resistoma ambiental a las bacterias patógenas.

Las nuevas herramientas de la metagenómica están permitiendo un mayor conocimiento de las rutas de evolución que serán de gran utilidad para el diseño de nuevos fármacos utilizando la estrategia eco-evo, la cual tiene en cuenta el resistoma antibiótico y los aspectos evolutivos de la resistencia (Baquero, 2012).

Clasificación de la resistencia

Según grado de resistencia a los antimicrobianos	
Multirresistente (MDR)	Bacteria resistente a por lo menos 3 grupos de ATM.

Extensamente resistente (XDR)	Solo quedan 1 o 2 opciones de ATM frente a los cuáles la bacteria es sensible.
Panresistente (PDR)	Bacteria resistente a todos los ATM comercialmente disponibles.

Según origen de los genes de resistencia

Natural o intrínseca	
Adquirida	Mutaciones. Adición de nuevo ADN (transposones, plásmidos, integrones y casetes).

Resistencia natural o intrínseca

Existen dos tipos de resistencia según el origen de los genes, la natural o intrínseca, la cual siempre se expresa en la especie bacteriana, es independiente de la exposición previa a ATM, es cromosómica y no está relacionada con la transferencia horizontal de genes. Este tipo de resistencia puede limitar la absorción ATM reduciendo la permeabilidad de la membrana externa en bacterias Gram negativas, y alterando la actividad natural de las bombas de eflujo incrementando la salida del mismo.

Ejemplos de bacterias con resistencia natural o intrínseca

Bacteria	Resistencia natural intrínseca
Anaerobias	aminoglucósidos, muchos β -lactámicos, quinolonas
Todas Gram positivas	aztreonam
<i>Enterococcus spp.</i>	aminoglucósido, cefalosporinas, lincosamidas
<i>Listeria monocytogenes</i>	cefalosporinas
Todas Gram negativas	glucopéptidos, lipopéptidos
<i>Escherichia coli</i>	macrólidos
<i>Klebsiella spp.</i>	ampicilina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sulfonamidas, ampicilina, cefalosporinas 1°y 2° generación, cloranfenicol, tetraciclina
<i>Micoplasma spp.</i>	β -lactámicos y glucopéptidos

Resistencia adquirida

El otro tipo de resistencia es la adquirida, en la cual las bacterias pueden experimentar mutaciones en su propio ADN cromosómico o adición de nuevo ADN adquirido a través de elementos móviles exógenos por medio de todas las rutas de la transferencia horizontal. Las mutaciones que ayudan a la RAM generalmente solo ocurren en unos pocos tipos de genes; los que codifican los sitios diana de los ATM, los que codifican los transportadores de ATM y los reguladores de éstos y los que codifican las enzimas modificadoras o inactivantes de ATM (Martinez, 2014).

El uso de ATM en concentraciones bajas o subinhibitorias, puede llevar a la selección de un alto nivel de resistencia en generaciones bacterianas sucesivas, puede seleccionar bacterias que son cepas hipermutables aumentando la tasa de mutación, puede aumentar la capacidad de adquirir resistencia a otros ATM y pueden promover el movimiento de elementos genéticos móviles (Blázquez J y col., 2012).

Resistencia constitutiva

Es aquella en la cual los genes de resistencia están localizados en el cromosoma principal y se expresan constitutivamente, ya que forman parte de la estructura del cromosoma, Ej.: gen ampC que codificada resistencia a ampicilina.

Resistencia inducida

Se define a la resistencia que sólo se expresa después de la exposición a un ATM. En el grupo de ATM β -lactámicos una sola dosis de algún agente con alta capacidad de inducción, es suficiente para crear resistencia al resto del grupo, inhabilitando su uso para continuar con el tratamiento.

Según ubicación de los genes de resistencia

Resistencia cromosómica

Resistencia extracromosómica	transposones, plásmidos, integrones y casetes
-------------------------------------	--

Resistencia cromosómica

Este tipo de resistencias dan lugar, en general, a cambios estructurales y graduales. Se producen por mutaciones, que son errores en el proceso de replicación del ADN cromosómico. Estas mutaciones pueden generar cambios muy profundos en el nivel de resistencia, como es el

caso de la estreptomicina, cuya CIM puede aumentar mil veces a través de una sola mutación o como en el caso de las fluoroquinolonas, que en enterobacterias, una sola mutación da lugar a un nivel bajo de resistencia, requiriendo una segunda mutación para adquirir un nivel elevado, en cambio en *Campylobacter* spp., una sola mutación es capaz de generar un elevado grado de resistencia (Acar y col., 1993).

Resistencia extracromosómica extracromosómica

La resistencia está codificada en el ADN extracromosómico a partir de plásmidos, transposones, integrones y casetes genéticos y es transferido a otras bacterias por varios mecanismos.

Los plásmidos son autorreplicantes, son porciones circulares de ADN extracromosómico, independientes del ADN principal, que pueden estar codificados para resistencia a un determinado ATM. En general, codifican características que mejoran los rasgos de supervivencia de las bacterias, sin ser imprescindibles para la misma, como virulencia, resistencia, rutas catabólicas alternativas, bacteriocinas, etc., pero que aportan una ventaja selectiva en determinados nichos. La adquisición de resistencia por parte de la bacteria receptora es en un paso. Un plásmido puede ser incorporado por un virus bacteriano o bacteriófago y transferido a otra bacteria. También puede pasar de una célula a otra por conjugación o por transformación. Un rasgo central y peligroso de éstos es la posibilidad de que varios de ellos, codificando resistencias a múltiples drogas, estén incluidos dentro de un mismo plásmido, lo que permite, por transferencia de este último, la adquisición de MDR por parte de la bacteria receptora.

Los transposones, conocidos como genes saltarines, son cadenas cortas de ADN que saltan de cromosoma a plásmido, en uno u otro sentido, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos. La característica más saliente de este tipo de material es la de integrarse con facilidad a cadenas de ADN diferente del original. A diferencia de los plásmidos, los genes saltarines no son autorreplicantes, deben mantenerse dentro de una estructura autorreplicante para replicarse. A este movimiento se lo llama transposición. Los elementos transponibles más simples son, las secuencias de inserción o elementos IS, que es una secuencia de DNA corta que sólo contiene los genes que codifican las enzimas requeridas para la transposición. Existen elementos transponibles que contienen genes adicionales, aparte de aquellos requeridos para la transposición, como por ejemplo genes de resistencia a drogas, a metales pesados, a marcadores catabólicos y/o a toxinas. Un transposón se diferencia de un "elemento IS" porque presentan genes extras que codifican al menos una función que cambia el fenotipo de la célula receptora de manera predecible, por ejemplo la resistencia a un ATM. Un grupo notorio de estos transposones son los llamados transposones compuestos o clase 1. Otro grupo de elementos transponibles son los llamados transposones complejos. Es probablemente el grupo mayoritario de elementos genéticos transponibles, encontrándose ampliamente distribuidos entre las enterobacterias, habitualmente denominados como transposones clase 2 o de la Familia Tn3.

Los transposones de esta familia tienen tamaños relativamente grandes y contiene el gen de la β -lactamasa TEM-1 confiriendo resistencia a varios β -lactámicos.

Los integrones están compuestos mínimamente por tres elementos, un gen que codifica una enzima con actividad de recombinasa específica de sitio, la integrasa; un sitio de recombinación proximal, que es reconocido por la integrasa y en el que se pueden insertar casetes de genes; y un promotor, que dirige la transcripción de genes codificados en casetes. En base a la secuencia aminoacídica de las integrasas se clasifican en integrones clase 1, 2 y 3. Los integrones no son elementos capaces de autotransponerse, pero se asocian frecuentemente a secuencias de inserción o bien a transposones y plásmidos conjugativos que les sirven como vehículos para su transmisión inter e intraespecie. Se habla, en general, de integrones “móviles” a aquellos asociados a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos, que en su mayoría median mecanismos de resistencia, y “super” integrones de localización cromosómica donde uno de ellos puede llegar a contener más de 100 casetes, aunque solo asociados esporádicamente a determinantes de resistencia (Mazel, 2006).

Los casetes genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que no codifican enzimas u otros productos involucrados en su propia movilización. Generalmente se encuentran dentro de los integrones, aunque estos elementos pueden existir libremente en forma de moléculas circulares covalentemente cerradas, generadas por acción de la integrasa que escinde el casete desde un integron. White y col. (2001), han informado que la diseminación de genes de resistencia aumenta considerablemente cuando ellos forman parte de casetes genéticos móviles, lo cual los habilita para su transferencia horizontal por varios mecanismos. Algunos incluyen la movilización de casetes entre integrones, mediada por la integrasa.

Referencias

- Acar JF, O'Brien T, Goldstein F, Jones R. 1993. The epidemiology of bacterial resistance to quinolones. *Drugs*. 45 suppl. 3:24-28. doi:10.2165/00003495-199300453-00006
- Arnold C. 2011. To Share and Share Alike: Bacteria swap genes with their neighbors more frequently than researchers have realized. *Sci Am*. 304: 30 – 31. doi:10.1038/scientificamerican0411-30
- Baquero F. 2012. Metagenomic epidemiology: a public health need for the control of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18:67-73. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03860.x
- Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez Rojas A. 2012. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Curr Opin Microbiol* 15: 561–569. doi: 10.1016/j.mib.2012.07.007
- Edwards L. 2010. Horizontal gene transfer in microbes much more frequent than previously thought. *PhysOrg*. <http://phys.org/news205389256.html>
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230: 13–18. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5

- Koonin EV, Makarova KS, Aravind L. 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol.*; 55: 709–42. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.709
- Martinez JL. 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today* 11: 33–39. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001
- Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4: 608-620. doi: 10.1038/nrmicro1462. doi: 10.1111/j.1600-0463.1998.tb05653.x
- Nielsen KM. 1998. Barriers to horizontal gene transfer by natural transformation in soil bacteria. *APMIS Suppl.* 84: 77–84. doi: 10.1111/j.1600-0463.1998.tb05653.x
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2010. Safety Assessment of Transgenic Organisms: OECD Consensus Documents: Volume 4. OECD Publishing. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264096158-en>
- Pantozzi FL. 2018. Evaluación fenotípica y genotípica de la resistencia a tetraciclina en cepas de *Escherichia coli* de origen animal. Tesis de doctorado. SEDICI. <https://doi.org/10.35537/10915/70535>
- Prescott J, Baggot J, Walter R. 2002. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Tercera Edición. Intermédica. Buenos Aires.
- Roberts MC. 2011. Environmental Macrolide–Lincosamide–Streptogramin and Tetracycline Resistant Bacteria. *Front Microbiol.* 2: 40. doi: 10.3389/fmicb.2011.00040
- Sundin G, Bender C. 1996. Dissemination of the strA-strB streptomycin resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals and plants. *Mol. Ecol.* 5, 133-143. doi: 10.1111/j.1365-294x.1996.tb00299.x
- van der Waaji D, Berghuis-de Vries J M, Lekkerkerk LV. 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J. Hydrol.* 69, 405-411. doi: 10.1017/s0022172400021653
- Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. 2013. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol* 79: 7116–7121. doi: 10.1128/AEM.02636-13
- White PA, Mciver CJ, Rawlinson WD. 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2658-61. doi: 10.1128/AAC.45.9.2658-2661.2001
- Wright GD. 2010. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov.* 5:779-88. doi: 10.1517/17460441.2010.497535

CAPÍTULO 3

Resistencia Antimicrobiana Clasificación

Florencia Laura Pantozzi

Resistencia según Localización Célula Bacteriana

Resistencia extracelular	Formación de biopelículas o Biofilm
Resistencia intracelular	Envoltura bacteriana Membrana externa: Modificación sitio acción Pared Celular: Cambios en la Permeabilidad Alteración del Sistema de Expulsión Inactivación enzimática Modificación sitio acción Citoplasma: Inactivación enzimática Modificación sitio acción Inhibición de la Síntesis de Proteínas Alteración de las vías metabólicas

Mecanismo de Resistencia Bacteriana a Nivel Extracelular

Formación de Biopelículas o Biofilm

La RAM es mediada por factores estructurales y fisiológicos de las bacterias que actúan a diferentes niveles, tanto extracelular como intracelular. A nivel extracelular se destacan la capacidad de las poblaciones bacterianas en la formación de biopelículas o biofilm y la regulación de señales celulares, *quorum sensing* (QS), permitiendo la evasión de la acción ATM, entre otras cosas (Troncoso y col., 2017).

Las biopelículas son agregaciones estructuradas de células bacterianas encerradas en una matriz extracelular auto sintetizada conformada por diferentes macromoléculas, entre ellas, polisacáridos y proteínas y ADN de las bacterias residentes (Sager y col., 2015). Esta propiedad favorece el desarrollo de comunidades sésiles de microorganismos que se unen irreversiblemente a un sustrato o coagregado. El desarrollo de la biopelícula es un proceso complejo, que se inicia con la adherencia de bacterias planctónicas a una superficie con la consiguiente formación de microcolonias (Donné y Dewilde, 2015). Externamente a la biopelícula existe una matriz extracelular viscosa que la encapsula creando una barrera de difusión física. Esta barrera protege a la comunidad bacteriana de la respuesta inmune del hospedador como la fagocitosis, dificulta o impide la acción ATM y otorga alta adherencia del microorganismo a una determinada superficie (Sager y col., 2015), además, ofrece protección de las agresiones fisicoquímicas, luz ultravioleta, metales pesados, acidez del medio y cambios de hidratación y salinidad.

En relación con la acción sobre los ATM, la viscosidad de la matriz extracelular impide la difusión de los ATM a las capas más profundas de la biopelícula. Antimicrobianos como los aminoglucósidos, cargados positivamente, son repelidos por las cargas negativas de la matriz (Cos y col., 2010), además puede albergar enzimas tales como β -lactamasas, que degradan a los β -lactámicos.

Se ha demostrado que las biopelículas tienen una alta persistencia una vez que se establecen las infecciones y por lo tanto son responsables de muchos procesos infecciosos crónicos (Peyyala y Ebersole, 2013). La baja capacidad de penetración de los ATM en la biopelícula es el principal obstáculo para el tratamiento de las infecciones, generando un fenotipo con capacidad de resistencia a altas concentraciones de ATM, incluso cuando son totalmente sensibles a tales agentes en condiciones planctónicas (Peterson y col., 2015). Este mecanismo de resistencia se ha denominado "biofilm bacteriano recalcitrante a antibióticos", el cual es un proceso reversible y no heredado, y desaparece cuando se interrumpe la biopelícula y las bacterias vuelven a un estado planctónico (Lebeaux y col., 2014).

Este estilo de vida bacteriano es una adaptación particularmente importante para crecer como parte de una comunidad sésil, que imita a un organismo multicelular integrado con su propio ciclo de desarrollo, su comportamiento cooperativo entre las especies, y la gestión coordinada utilizando moléculas de detección de señal QS para comunicarse entre ellos. Este sistema QS de comunicación célula-célula es utilizado entre bacterias de una misma especie o especies distintas y es regulado por diferentes señales químicas que son sintetizadas y secretadas por las mismas. Muchas de estas señales se generan como respuesta al estrés ambiental incluido el provocado por ATM (Gill y col., 2015).

Mecanismos de Resistencia a Nivel Intracelular

Alteraciones en la Envoltura Celular Bacteriana

A nivel de la envoltura de la célula bacteriana se destaca el funcionamiento y comportamiento de la pared celular, membrana citoplasmática y membrana externa en bacterias Gram negativas.

A nivel de la membrana externa de bacterias Gram negativas, puede ocurrir, debido a mutaciones, la modificación en el sitio de acción del ATM, disminuyendo o anulando la interacción entre la polimixina B y polimixina E o colistina y el lípido A del lipopolisacárido, y de esta forma, la bacteria queda protegida de la acción bactericida de los mismos.

A nivel de la pared celular esto se lleva a cabo principalmente por medio de la regulación de canales de entrada o porinas y/ o bombas de expulsión que impiden el acceso o inducen la salida de los ATM y otros mecanismos que modifican la actividad ATM por medio de la hidrólisis o modificación del sitio de acción del ATM. Actúan diferentes grupos de ATM que incluyen a β -lactámicos, glicopéptidos, fosfomicina, daptomicina, polimixinas e ionóforos. Esta estructura puede sufrir diferentes alteraciones que inactiven al ATM, entre ellas, modificación del sitio de acción del fármaco, como es el caso del cambio del extremo terminal D-alanina-D-alanina del peptidoglicano, que impide la unión del glicopéptido vancomicina al sitio diana, o la alteración de las *Penicillin Binding Proteins* (PBP) o Proteínas Ligando de Penicilinas (PBP), transpeptidasas involucradas en la construcción de peptidoglicano y que a su vez son el sitio de acción de β -lactámicos o la degradación de β -lactámicos por enzimas inactivantes que inutiliza el fármaco, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Todos estos mecanismos participan en la selección de cepas resistentes a los ATM.

A continuación, se detallan brevemente como ocurren estos procesos. Los principales mecanismos de RAM en bacterias incluyen las siguientes categorías:

Cambios en la Permeabilidad

Este mecanismo de resistencia produce impermeabilidad o limitación de la absorción del ATM. Está dado por modificaciones en las porinas o los canales de porinas, ubicados en la membrana externa de bacterias Gram negativas, que son la vía de entrada de los ATM hidrófilos como β -lactámicos, fluoroquinolonas y otros compuestos. Las porinas son estructuras proteicas que determinan la permeabilidad de la membrana externa por medio de canales abiertos al tránsito de agua, facilitando el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas. Las dos formas principales en que las porinas pueden limitar la absorción del ATM es disminuyendo el número presente, como en el caso de las enterobacterias a carbapenemes y mutaciones que cambian la selectividad de las porinas, como *Enterobacter aerogenes*, que adquieren resistencia a imipenem y ciertas cefalosporinas. La adaptación bacteriana en el cambio en el transporte de moléculas hacia el interior de la célula a través de porinas e incluso activando los sistemas de expulsión o bombas de eflujo, generan un efecto sinérgico entre estos mecanismos, y como consecuencia resistencia a múltiples ATM (Santajit & Indrawattana, 2016).

Alteración del Sistema o Bombas de Expulsión o de Eflujo o Salida Activa del ATM

Además de las porinas, existe otro mecanismo presente a nivel de la envoltura celular que permite remover desde el compartimiento intracelular hacia el exterior una amplia variedad de sustancias tóxicas de la bacteria, incluyendo ATM, denominados bombas de expulsión o de eflujo. Éstas son proteínas de membrana, codificadas cromosómicamente, ubicadas en la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivos y en el espacio periplásmico de Gram negativas (Beceiro y col., 2013; Santajit y Indrawattana, 2016).

La expulsión de ATM de la célula a través de las bombas impide obtener concentraciones óptimas, antes que éste alcance el blanco de acción generando RAM. Algunas resistencias se expresan constitutivamente y otras se inducen o sobreexpresan por mutaciones que modifican el canal de transporte. Pueden otorgar selectividad específica a un tipo de sustancias y otras a varias simultáneamente. Producen resistencia a alto nivel. La expulsión se realiza por mecanismos activos.

Según la fuente de energía y sus usos, se consideran dos grandes grupos de sistemas de expulsión, el primero utiliza la energía del ATP y expulsión por hidrólisis, el cual incluye a la super familia ABC; el otro grupo utiliza la fuerza móvil de protones y la energía del potencial electroquímico de la membrana potencia el flujo de salida de sustancia tóxicas, (Li y col., 2015; Zhou y col., 2015) en el que se incluyen las demás familias; la familia de eliminación de compuestos tóxicos y multifármacos (MATE), la familia de pequeñas resistencias a múltiples fármacos (SMR), la principal superfamilia facilitadora (MFS) y la familia de división celular de nodulación de resistencia (RND). La mayoría de estas familias son bombas de un solo componente que transportan sustratos a través de la membrana citoplasmática. La familia RND son bombas multicomponente, que se encuentran casi exclusivamente en bacterias Gram negativas, que funcionan en asociación con una proteína de fusión de membrana periplásmica (MFP) y una proteína de membrana externa (OMP-porina) para expulsar el sustrato a través de toda la envoltura celular.

Las bombas de eflujo encontradas en bacterias Gram negativas están ampliamente distribuidas y pueden provenir de las cinco familias, siendo las de mayor importancia clínica las pertenecientes a la familia RND. Las bombas de eflujo que se encuentran en las bacterias Gram positivas pueden conferir resistencia intrínseca al estar codificadas en el cromosoma. Estas bombas incluyen miembros de las familias MATE y MFS y la bomba de eflujo tipo QepA de fluoroquinolonas de salida, que confiere resistencia a quinolonas hidrofílicas como norfloxacina, ciprofloxacina y enrofloxacina, es similar a la superfamilia MFS y esta codificada por el gen quepa. Actualmente, las bombas caracterizadas en bacterias Gram positivas son de la familia MFS.

Familia de Transportadores ABC

La familia de eflujo ABC contiene sistemas de transporte tanto de captación como de eflujo. Los miembros de esta familia son los únicos que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP.

Estas bombas transportan aminoácidos, fármacos, iones, polisacáridos, proteínas y azúcares. Tienen sustratos bastante específicos y se encuentran muy poco en bacterias clínicamente significativas. Una bomba ABC se encuentra en *Vibrio cholerae* (VcaM), y es capaz de transportar fluoroquinolonas y tetraciclinas.

Familia de Transportadores MATE

La familia de eflujo MATE usa un gradiente de Na⁺ como fuente de energía, colorantes catiónicos de eflujo y la mayoría de las fluoroquinolonas de eflujo. También se ha demostrado que algunas bombas MATE expulsan algunos aminoglucósidos.

Familia de Transportadores SMR

La familia de eflujo SMR está energizada por la fuerza motriz del protón H⁺, es hidrófoba y expulsa principalmente cationes lipofílicos, por lo que puede tener un rango de sustrato muy estrecho. Los genes de estas bombas se han encontrado en el ADN cromosómico, en plásmidos y elementos transponibles. La salida de ATM sólo se ha observado en algunas de estas bombas y, por lo general, confieren resistencia a los β-lactámicos y algunos aminoglucósidos. Se observan ejemplos de bombas SMR en *Staphylococcus epidermidis* que transporta ampicilina, eritromicina y tetraciclina y la bomba EmeR en *Escherichia coli* que transporta vancomicina, eritromicina y tetraciclina (Bay y col., 2008, Blair y col, 2014; Kumar y Schweizar, 2005).

Familia de Transportadores MFS

La familia de eflujo de MFS cataliza el transporte activo de sustancias mediante una membrana biológica a través de un simporte de soluto / catión (H⁺ o Na⁺), en donde las dos moléculas transportadas se mueven en el mismo sentido, o un antiporte de soluto / H⁺, en donde las dos moléculas transportadas se mueven en sentido opuesto, una hacia fuera de la célula y otra hacia dentro. Participan en el transporte de aniones, ATM como macrólidos y tetraciclina, metabolitos como sales biliares y azúcares. Las bombas MFS tienen la mayor diversidad de sustratos como grupo, pero individualmente tienden a ser específicas de sustrato. Ejemplos de esta especificidad de sustrato incluyen *Escherichia coli* que tiene bombas MFS separadas para macrólidos (MefB), fluoroquinolonas (QepA) y trimetoprima (Fsr), la bomba NorA en *Staphylococcus aureus* que transporta fluoroquinolonas y cloranfenicol, la bomba de *Staphylococcus aureus*, LmrS que transporta linezolid, eritromicina, cloranfenicol y trimetoprima. La mayoría de las bombas MFS se han encontrado en cromosomas bacterianos y comprenden casi el 50% de las bombas de salida en *Escherichia coli* (Blair y col, 2014; Collu y Cascella, 2013; Kumar y col., 2013).

Familia de Transportadores RND

En las bacterias Gram negativas, el sistema de flujo de transporte RND, está conformado por una estructura triple para prevenir el reflujo hacia el interior de la célula, posee una proteína transportadora ubicada en la parte más interna de la membrana citoplasmática, ABC, MFS o

RND, una proteína de fusión presente en el espacio periplásmico, MFP, y la porina de membrana externa, OMF. (Li y col., 2015). Este complejo funciona como antiportador mediante el transporte activo secundario o cotransporte. Utiliza la energía electroquímica, de un gradiente principal, generalmente de sodio, desarrollado por un transportador consumidor de ATP, usualmente ATPasa de sodio, para mantener los gradientes transmembránicos de protón/droga, catalizando el flujo de salida de una amplia variedad de sustratos, incluyendo ATM, pigmentos, sales biliares, detergentes y biocinas (Li y Nikaido, 2009; Li y col., 2015; Santajit y Indrawattana, 2016). Estos transportadores secuestran drogas desde el citoplasma o desde el interior de la membrana citoplasmática y lo trasladan al espacio periplásmico. Mientras el acceso de la droga a la estructura tripartita, ABC y MFS, es desde el citoplasma hacia la membrana citoplasmática, el sistema RND lo hace o desde el espacio periplásmico a la membrana externa a través de una conexión a la misma o por expulsión desde el citoplasma por medio de transportadores de la membrana citoplasmática. Probablemente, la bomba RND más estudiada es la bomba AcrAB-TolC en *Escherichia coli*, que confiere resistencia a penicilinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclina (Masi y col., 2017).

Producción de Enzimas Inactivantes del ATM

Existen dos formas principales en las que las bacterias inactivan los ATM, por medio de producción de enzimas inactivantes o por transferencia de un grupo químico a la molécula ATM. En el primer caso, tenemos como ejemplo a las enzimas β -lactamasas, que destruyen o degradan al ATM antes que este alcance su diana, blanco o sitio de acción, o modifica el ATM de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco. En este caso la enzima, elaborada por la bacteria, inactiva a la molécula de la ATM volviéndola incapaz de actuar. Este es el único mecanismo capaz de inactivar a la molécula de ATM.

La inactivación del ATM por transferencia de un grupo químico al mismo, utiliza más comúnmente la transferencia de grupos acetilo, fosforilo y adenilo. Hay un gran número de transferasas identificadas denominadas acetilasas, fosforilasas y adenilasas. El mecanismo más utilizado es el de la acetilación produciendo resistencia en, cloranfenicol, estreptograminas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. En este último grupo también se utilizan la fosforilación y la adenilación.

β -lactamasas

Teniendo en cuenta que el grupo de ATM más utilizado en la clínica tanto humana como veterinaria es el de los β -lactámicos, y el mecanismo de resistencia más frecuente en bacterias Gram negativas es debido a la producción de enzimas inactivantes transferidas horizontalmente, explicaremos brevemente este mecanismo.

Los β -lactámicos, reúnen cinco grandes grupos, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactames y carbapenemes, todos poseen una estructura común, el anillo β -lactámico, que

puede ser hidrolizado por las enzimas β -lactamasas. Estas enzimas, originalmente llamadas penicilinasas y cefalosporinasas, inactivan los β -lactámicos al hidrolizar un sitio específico en la estructura del anillo β -lactámico, lo que hace que el anillo se abra y no puedan unirse a su sitio diana, las proteínas PBP. Las β -lactamasas conocidas están muy extendidas y el grupo contiene enzimas que pueden inactivar cualquiera de los β -lactámicos actuales.

Las enzimas β -lactamasas se clasifican en función de su estructura molecular y / o características funcionales. Estructuralmente se clasifican en cuatro categorías principales; A, B, C o D. Hay tres agrupaciones basadas en la especificidad del sustrato: las cefalosporinasas, las serina- β -lactamasas y las metalo- β -lactamasas o MBL, dependientes de zinc. Las enzimas de clase A son del tipo penicilinasas y carbapenemasas, las de clase B metalo- β -lactamasas, las de clase C corresponden a AmpC o cefalosporinasas y las de clase D son oxacilinasas.

Estas enzimas también se conocen comúnmente por su familia de enzimas; la familia TEM, que lleva el nombre del primer paciente, la familia SHV, variable sulfhidrilo y la familia CTX, por hidrolizar preferentemente cefotaxima. La primera β -lactamasa caracterizada fue de *Escherichia coli* y está codificada cromosómicamente por el gen ampC, llamado así por la resistencia a ampicilina. Este gen se expresa constitutivamente en un nivel bajo, pero las mutaciones pueden resultar en una sobreexpresión del gen. Las β -lactamasas AmpC son más eficaces contra las penicilinas y algunas cefalosporinas de primera generación. También hay muchas β -lactamasas transmitidas por plásmidos que portan una variedad de genes bla, genes de β -lactamasas. Si estas β -lactamasas confieren resistencia a las cefalosporinas de generación posterior, se denominaron BLEE o β -lactamasas de Espectro Extendido, e incluyen miembros de las familias de enzimas TEM, SHV, CTX-M y OXA. El grupo más grande son los CTX-M, que se encuentran con mayor frecuencia en *Escherichia coli*. Los productores de BLEE con capacidad de resistencia a todas las penicilinas, monobactámicos y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, sólo permite el uso de los β -lactámicos cefamicinas y carbapenemes. Actualmente el principal problema a nivel mundial es precisamente la diseminación incontrolada de genes que codifican la resistencia a carbapenemes, hasta ahora la línea terapéutica frente a bacilos Gram negativos multirresistentes. Hay dos tipos de carbapenemasas; las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* o KPC, y aquellas designadas como enzimas Enterobacteriaceae Resistentes a Carbapenémicos o CRE. Las KPC son resistentes a todos los β -lactámicos. En las bacterias que son cepas CRE, las carbapenemasas son todas metalo- β -lactamasas y son capaces de hidrolizar todos los fármacos β -lactámicos, pero no son inactivadas por los inhibidores de β -lactamasas. Las CRE más ampliamente distribuidos son los tipos IMP-1 para resistencia al imipenem y VIM-1, que es un MBL codificado en el integrón de Verona. En el año 2009 se identificó una nueva MBL, principalmente en cepas de *Escherichia coli* que ha sido designado como Nueva Delhi MBL1 o NDM1.

Mecanismos de Resistencia a Nivel Citoplasmático

A nivel del citoplasma, algunas bacterias pueden: a) utilizar el potencial de óxido-reducción, como mecanismo de evasión del efecto ATM, como ocurre con la oxidación de la tetraciclina por la enzima TetX presente en *Streptomyces virginiae*, agente productor de ATB estreptogramina y virginiamicina, b) modificar los sitios de acción o diana del ATM, c) inactivar los grupos transfer, y d) modificar las subunidades ribosomales afectando la acción de los ATM que inhiben la síntesis de proteínas (Dzdic et al., 2008).

Modificación del sitio de acción, sitio diana o sitio blanco del ATM

En este caso se produce una reducción de la afinidad del receptor por la molécula del ATM. Esto puede deberse a mutaciones, como en el caso de las quinolonas sobre la girasa de ADN (*gyrA*) en bacterias Gram negativas o topoisomerasa IV (*grlA*) en bacterias Gram positivas, que disminuyen o eliminan la capacidad del ATM para unirse al sitio de acción o por adquisición de nuevos genes, como es el caso de alteraciones en la estructura y / o número de PBP o PLP (transpeptidasas de unión a penicilina), produciendo resistencia a los fármacos β -lactámicos, utilizados casi exclusivamente por bacterias Gram positivas. Las PBP son transpeptidasas involucradas en la construcción de peptidoglicano en la pared celular. Pueden provocar un aumento en el número de PBP, con una disminución en la capacidad de unión al ATM o disminución de PBP con unión normal al β -lactámico, que afecta la cantidad de ATM que puede unirse al sitio de acción o puede producir un cambio en la estructura, como la PBP2a en *Staphylococcus aureus* mediante la adquisición del gen *mecA*, disminuyendo o inhibiendo totalmente unión del ATM (Reygaert, 2009).

Producción Enzimas Inactivantes por Transferencia de un grupo químico

La resistencia a los ATM, que están dirigidas a las subunidades ribosómicas, dificultan la acción de ATM que actúan a nivel de la inhibición de la síntesis de proteínas. Puede ocurrir mediante una mutación que produce la metilación de la subunidad ribosómica como en aminoglucósidos y macrólidos, genes *erm* en bacterias Gram positivas o protección ribosómica en tetraciclinas. Estos mecanismos interfieren con la capacidad del ATM para unirse al ribosoma.

Alteración de las vías metabólicas o metabolitos

Esta forma de resistencia se basa en la capacidad de las bacterias para generar sustancias metabólicas que compiten con el sitio activo del ATM, como sucede con la resistencia a sulfonamidas y trimetoprima. *Staphylococcus aureus* desarrolla resistencia a sulfonamidas por medio de un compuesto similar al ácido para-amino benzoico (PABA), que es un precursor del ácido fólico bacteriano. Las bacterias deben sintetizar su propio ácido fólico y las sulfonamidas compiten con el PABA, inhibiendo a la enzima dihidrofolato reductasa necesaria para el paso de dihidrofolato a tetrahidrofolato, cofactor indispensable en la síntesis de DNA y proteínas. En el caso de la trimetoprima la enzima involucrada es la dihidroopteroato sintetasa. La resistencia

bacteriana se presenta por mutación espontánea o transferencia de la misma a través de plásmidos, generando mutación de la DHFR o DHPS, creando una vía metabólica alterna para la síntesis del ácido fólico, generando aumento en la capacidad de inactivar la droga y producción de un antagonista de la misma. Se destaca, igualmente, la alteración enzimática del sitio de acción del ATM, reduciendo la afinidad droga (Thiede y col., 2016).

Mecanismos de Acción según Grupo de Antimicrobianos

Mecanismos de acción	Grupos de ATM
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β-Lactámicos Carbapenemes Cefalosporinas Monobactames Penicilinas Glucopéptidos
Despolarización de la membrana celular	Lipopéptidos
Inhibición de la síntesis de proteínas	Unión a la subunidad ribosómica 30S Aminoglucósidos Tetraciclinas Unión a la subunidad ribosómica 50S Cloranfenicol Estreptograminas Lincosamidas Macrólidos Oxazolidinonas
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas Fluoroquinolonas
Inhibición de las vías metabólicas	Sulfonamidas Trimetoprima

Mecanismos de Resistencia frente a algunos ATM

Drogas	Impermeabilidad	Modificación sitio diana ATM	Inactivación del ATM	Bombas de eflujo
β-lactámicos	Disminución del número de porinas Modificación selectiva de porinas	Gram positivos: alteraciones en las PBP	Gram positivos y Gram negativos: Enzimas inactivantes β-lactamasas	RND
Glucopéptidos	Engrosamiento de Pared Celular	Modificación del peptidoglicano		
Lipopéptidos		Aumento de las cargas positivas en la membrana que causan rechazo del ATM		
Aminoglucósidos	Polaridad de la pared celular Cambios porinas de membrana externa. Falla gradiente de protones	Mutación ribosómica, metilación	Enzimas inactivantes modificadoras de aminoglucósidos, acetilación, fosforilación, adenilación	RND
Tetraciclinas	Disminución del número de porinas	Protección ribosomal	Modificación de ATM, oxidación.	MFS, RND
Cloranfenicol		Metilación ribosomal	Acetilación del ATM	MFS, RND
Lincosamidas		Gram positivos: metilación ribosómica		ABC, RND
Macrólidos		Mutación ribosómica, Metilación		ABC, MFS, RND
Fluroquinolonas		Gram negativos: modificación de la ADN girasa Gram positivos: topoisomerasa IV	Acetilación de la droga	MATE, MFS, RND
Sulfonamidas		Unión reducida de DHPS, sobreproducción		RND

		de DHPS resistente		
Trimetoprima		Unión reducida de DHFR, sobreproducción de DHFR		RND

ABC: familia de casetes de unión a ATP, DHFR: dihidrofolato reductasa, DHPS: dihidropteroato sintetasa, MATE: familia de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos, MFS: superfamilia de facilitadores principales, PBP: proteína de unión a penicilina, RND: familia de división celular de nodulación de resistencia.

Referencias

- Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. 2008. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *BBA-Biomembranes* 1778: 1814–1838. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.015
- Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9: 1165–1177. doi: 10.2217/fmb.14.66
- Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.* 26(2):185-230. doi: 10.1128/CMR.00059-12
- Collu F, Cascella M. 2013. Multidrug resistance and efflux pumps: insights from molecular dynamics simulations. *Curr Top Med Chem* 13: 3165–3183. doi: 10.2174/15680266113136660224
- Cos P, Toté K, Horemans T, Maes L. 2010. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Curr. Pharm. Des.* 16(20):2279-95. doi: 10.2174/138161210791792868
- Dzdic S, Suskovic J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance in bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 46(1):11-21.
- Donné, J, Dewilde S. 2015. The challenging world of biofilm physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 67:235-92. doi: 10.1016/bs.ampbs.2015.09.003
- Gill EE, Franco OL, Hancock RE. 2015. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem. Biol. Drug Des.* 85(1):56-78. doi: 10.1111/cbdd.12478
- Kumar A, Schweizer HP. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliver Rev* 57: 1486–1513. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.004

- Kumar S, Mukherjee MM, Varela MF. 2013. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Int J Bacteriol.* doi: 10.1155/2013/204141
- Lebeaux D, Ghigo JM, y Beloin C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78(3):510- 43. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- Li XZ, Nikaido H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69(12):1555-623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000
- Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(2):337- 418. doi: 10.1128/CMR.00117-14
- Masi M, Réfregiers M, Poss KM y Pagès JM. 2017. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat. Microbiol.*, 2:17001. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.1
- Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, van Winkelhoff AJ, Neut D, Stoodley P, van der Mei HC, Busscher HJ. 2015. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol. Rev.* 39(2):234-45. doi: 10.1093/femsre/fuu008
- Peyyala R y Ebersole JL. 2013. Multispecies biofilms and host responses: "discriminating the trees from the forest". *Cytokine*, 61(1):15-25. doi: 10.1016/j.cyto.2012.10.006
- Reygaert WC. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci* 22: 115–119.
- Sager M, Benten, WP, Engelhardt E, Gougoula C, Benga, L. 2015. Characterization of Biofilm Formation in *Pasteurella pneumotropica* and *Actinobacillus muris* Isolates of Mouse Origin. *PLoS One*, 10(10): e0138778, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0138778
- Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Res. Int.*, 2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067
- Thiede JM, Kordus SL, Turman BJ, Buonomo JA, Aldrich CC, Minato Y, Baughn AD. 2016. Targeting intracellular p-aminobenzoic acid production potentiates the anti-tubercular action of antifolates. *Sci. Rep.*, 6:38083. doi: 10.1038/srep38083
- Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. 2017. Structural and Physiological Implications of Bacterial Cell in Antibiotic Resistance Mechanisms. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1214-1223. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>

CAPÍTULO 4

Listas de Antimicrobianos de Uso en Medicina Humana y Veterinaria

Gabriela Isabel Giacoboni

Los medicamentos con acción antimicrobiana, son imprescindibles para preservar la salud y el bienestar de hombres, animales y medio ambiente. La reseña ofrecida en el capítulo 2 sobre los diversos y variados mecanismos que las bacterias desarrollan para evadir la acción de estos compuestos, reflejan la magnitud del problema al que se enfrenta la comunidad científica y la necesidad de plantear diferentes acciones para contenerla.

A partir del crecimiento y la emergencia y de la resistencia registrada en los últimos años, las organizaciones internacionales reunidas entre los años 2003 y 2004 FAO/OIE/WHO (2003, 2004) para abordar el problema de RAM, recomendaron que la OMS debería desarrollar una lista de agentes antimicrobianos de importancia crítica para los humanos así como la OIE debería hacerlo para los animales. La superposición de ambas listas daría así la información sobre los riesgos del uso de estos medicamentos en la salud pública. Desde la confección de las primeras listas en el año 2005 ambas organizaciones (OMS y OIE) las actualizan periódicamente. La creación en el año 2008 del grupo Asesor para la Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos (AGISAR) colabora en la actualización de las listas.

La OMS en su quinta revisión, en el año 2016, propuso una lista de antimicrobianos de importancia médica para la gestión de riesgo de resistencia a los antimicrobianos y paliar los riesgos en la salud humana con el uso de los antimicrobianos en animales de producción pecuaria. Los clasificó en: importantes, muy importantes y de importancia crítica y los prioriza con 3 factores para preservar su eficacia en medicina humana. Al ser muchos de ellos de uso veterinario, la lista publicada contribuye al uso prudente en hombres y animales OMS (2017).

En la tabla 1 se describen los criterios (C) médicos y veterinarios que la OMS adoptó para priorizar (P) los antimicrobianos de acuerdo a su importancia médica.

Tabla 1*Criterios médicos y veterinarios para priorizar los antimicrobianos por su importancia médica*

C1	C2	P1	P2	P3
Esta clase de antimicrobiano es la única o una de las terapias limitadas disponibles para tratar infecciones bacterianas graves en las personas	Usado para tratar infecciones en personas causadas tanto por (1) bacterias que pueden transmitirse a humanos de fuentes no humanas, o (2) bacterias que pueden adquirir genes de resistencia de fuentes no humanas	Gran cantidad de personas o personas en ciertas poblaciones de alto riesgo (por ejemplo, pacientes con infecciones graves en entornos de atención médica), que están afectadas por enfermedades para las cuales existen opciones antimicrobianas muy limitadas	Clase de antimicrobianos de uso muy frecuente en cualquier indicación médica humana o de uso en una gran proporción de pacientes con infecciones graves en entornos de atención sanitaria, dado que dicho uso puede favorecer la selección de resistencias en ambas circunstancias	Clase de antimicrobianos utilizada para tratar infecciones humanas en las que hay pruebas de la transmisión de bacterias resistentes o de genes de resistencia a partir de fuentes no humanas

En 2018 se realizó una nueva revisión en la que figuran 35 clases de antimicrobianos de importancia médica OMS (2019).

Por otra parte la Unión Europea (UE), a través de la European Medicine Agency (EMA), en respuesta a la solicitud de la Comisión Europea para la actualización y asesoramiento científico sobre el impacto en la salud pública y salud animal sobre el uso de antimicrobianos en animales, propuso como criterio adicional la disponibilidad de antibióticos alternativos en veterinaria, medicamentos con menor riesgo de RAM para la salud pública y animal (medicamentos aprobados por la UE). Crean así 4 categorías A, B C y D.

Categoría A Evitar: Los antibióticos en esta categoría no están autorizados como medicamentos veterinarios en la UE. No deben usarse en animales productores de alimentos. Pueden administrarse a animales de compañía en circunstancias excepcionales.

Categoría B Limitar: Los antibióticos en esta categoría tienen una importancia trascendental en la medicina humana y su uso en animales deberá limitarse a fin de mitigar el riesgo para la salud pública. Se considerarán únicamente cuando no haya antibióticos de las Categorías C o D que puedan ser clínicamente eficaces. Su uso se basará en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, siempre que sea posible.

Categoría C Precaución: Para los antibióticos en esta categoría existen alternativas en la medicina humana. Para algunas indicaciones veterinarias, no hay alternativas pertenecientes a la Categoría D. Se considerarán sólo cuando no haya antibióticos de la Categoría D que puedan ser clínicamente eficaces.

Categoría D Prudencia: Se usarán como tratamientos de primera línea, siempre que sea posible. Como siempre, se usarán con precaución, y sólo cuando sea necesario desde el punto de vista médico.

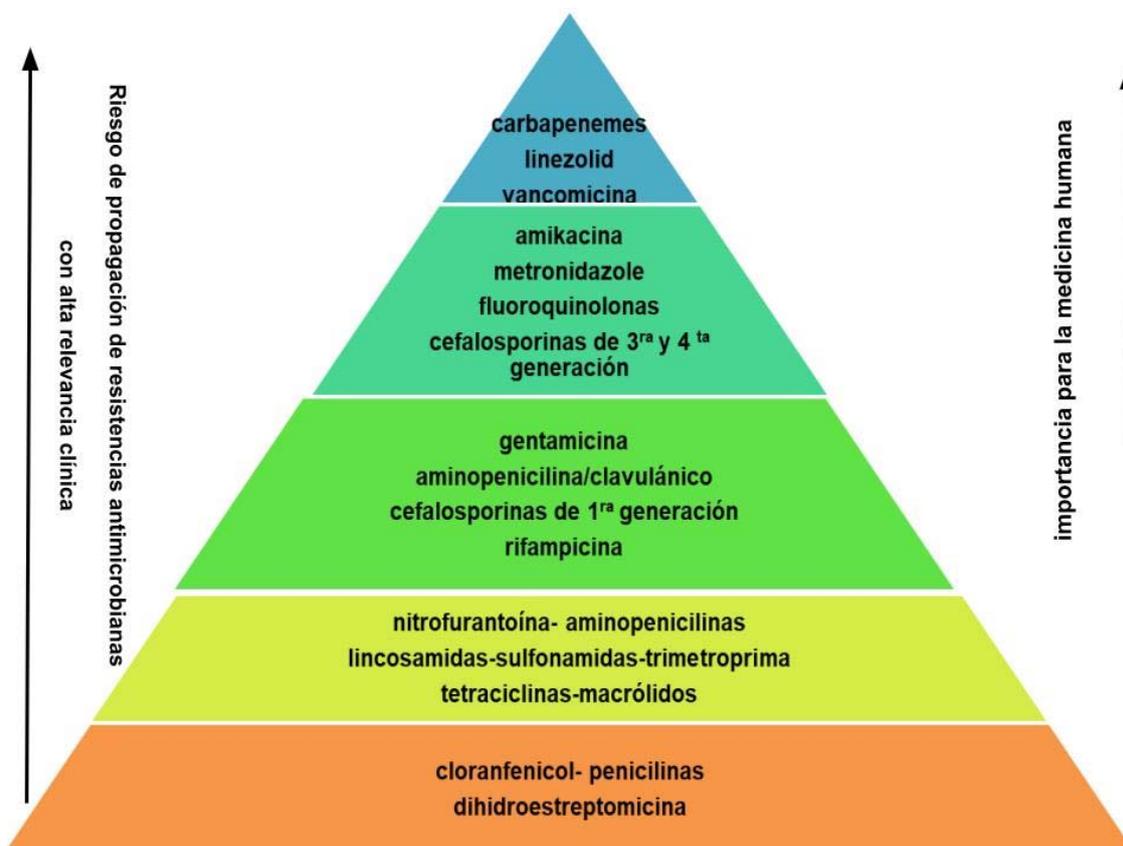
Las drogas involucradas en cada grupo pueden consultarse en el documento completo publicado en diciembre de 2019. *Categorisation of antibiotics in the European Union EMA/CVMP/CHMP/682198/201(2019).*

La cronología de la OIE para la elaboración de listas, se inicia en 2005, año en el cual elaboró a través de un grupo *ad hoc* un cuestionario y se remitió a los países miembros para que respondieran. Acorde al análisis de las respuestas en el año 2006, se realizó una lista de antimicrobianos de importancia veterinaria. La disparidad en las respuestas de los países participantes, ocasionó que esa lista se considere como preliminar. La misma se revisó y mejoró en 2007, y se fue actualizando para que su configuración tenga congruencia con los términos de la lista que la OMS formulara con referencia a los antimicrobianos utilizados en humanos.

La OIE entonces publicó una lista de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria OIE (2018). Sin embargo, esta lista contempla a los animales de producción y consumo, y quedan sin considerar los animales de compañía.

En cuanto a éstos últimos algunas instituciones como la Federación Europea de Asociaciones Veterinarias de Animales de Compañía (FECAVA), fundada en 1990, y la cual cuenta con 39 países miembros, elaboró directrices sobre RAM en pequeños animales. Los documentos si bien no son listas de antimicrobianos, presentan recomendaciones en el uso adecuado según sistemas u órganos en pequeños animales FECAVA (2018). Otro ejemplo es la publicación de pautas de uso de antibióticos para la práctica de animales de compañía por *The Danish Small Animal Veterinary Association, SvHKS* (2019). En este documento se describe una pirámide que clasifica a los antimicrobianos en 5 categorías “*basándose en lo esenciales que son para la medicina humana, junto con el riesgo de desarrollo y propagación de resistencias de gran relevancia clínica tanto para los animales de compañía como para los humanos*”. El uso correcto de este sistema de priorización requiere el conocimiento tanto del efecto clínico como de las

propiedades farmacológicas de los diferentes antibióticos, incluida su capacidad para concentrarse en el lugar de la infección.



Así en la base de la pirámide están los antimicrobianos que tienen un espectro reducido y limitada propagación de bacterias resistentes en animales de compañía (penicilinas de bajo espectro) y cloranfenicol que no se utiliza para tratamiento sistémico en la Unión Europea. Mientras que en la punta, los antimicrobianos que deben preservarse por considerarse esenciales, y reservarse a casos puntuales y muy bien justificados.

Con esta propuesta en la elección y uso de antimicrobianos, el citado grupo de trabajo (autores de la guía) pudo observar diferencias en los porcentajes de resistencia registrados en bacterias frecuentemente aisladas a partir de animales de compañía tales como *Staphylococcus pseudintermedius* y *E. coli* entre los períodos 2011/2012 y 2016/2017, con disminución en los registros de resistencia.

Las listas de antimicrobianos van a ir actualizándose a través de los años. Sin embargo, si volvemos al concepto del uso racional y prudente de los antimicrobianos que la OIE propone y recomienda ante la elección de un antimicrobiano se transcriben las siguientes consideraciones:

¿Cómo elegir un antimicrobiano?

Tener en cuenta

- Registro sobre usos anteriores y a historia epidemiológica

- Experiencia clínica y perspectiva del diagnóstico
- Información de diagnóstico de laboratorio cuando esté disponible (cultivo y pruebas de sensibilidad)
- Farmacodinámica (actividad contra patógenos implicados)
- Farmacocinética (distribución de tejidos, eficacia en el sitio de infección)
- Lista de la OIE de antimicrobianos al seleccionar el tratamiento

Referencias

Antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana - 5ª rev. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2017. <https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017es.pdf>

Categorisation of antibiotics in the European Union. EMA/CVMP/CHMP/682198/2017. 2019. <https://bit.ly/30ZEUrI>

Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. WHO Health Organization. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines>

FECAVA 2018. Consejos de FECAVA sobre el uso responsable de antimicrobianos <https://www.fecava.org/policias-actions/guidelines/>

Jessen, L.R P.P. Damborg, A. Spohr, T.M. Sørensen, R. Langhorn, S.K. Goericke-Pesch, G. Houser, J. Willesen, M. Schjærff, T. Eriksen, V.F. Jensen, L. Guardabassi. Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice (2nd ed.). The Danish Small Animal Veterinary Association, SvHKS, 2019.

https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/Assembled_FINAL.pdf

Joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Organisation for Animal Health / World Health Organization. 2003. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68883/1/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.7.pdf?ua=

OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Paris. World Organisation for Animal Health. 2018. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf

Second joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: management options. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Organisation for Animal Health / World Health Organization. 2004. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68701/1/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.8.pdf?ua=1

CAPÍTULO 5

Diagnóstico de la Resistencia Antimicrobiana

Florencia Laura Pantozzi

Métodos Básicos de Detección de la Sensibilidad Antimicrobiana en el Laboratorio de Bacteriología

El aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (RAM) tradicionalmente utilizados, se incrementó a través de los años, lo que dificulta la selección de los mismos para ser utilizados de manera empírica, o dicho de otro modo, la posibilidad de predecir de manera fiable la sensibilidad antimicrobiana para el tratamiento del hospedador infectado por parte de los profesionales de la salud encargados de la prescripción de los mismos.

Como consecuencia, la realización de la/s toma/s de muestra/s del sitio de infección, del aislamiento e identificación del o de los agentes patógenos involucrados y las pruebas *in vitro* de sensibilidad a las antimicrobianos (PSA), son imprescindibles en la actualidad, para la elección e implementación del antimicrobiano correcto. Esto determina, en el concepto de Una Salud, que las PSA influyen de forma importante en las directrices generales que deben seguirse a nivel mundial para un uso prudente de los antimicrobianos. Además, determina que los médicos veterinarios tengan que basarse más en los datos de las PSA *in vitro* y pone en relieve la importancia del laboratorio de diagnóstico en la práctica clínica.

Los objetivos de las PSA *in vitro*, utilizando métodos validados, consisten en proporcionar datos predictivos fiables de cómo un microorganismo es probable que responda a una terapia antimicrobiana en el hospedador infectado, como también, realizar una evaluación con fines de vigilancia para averiguar el desarrollo de resistencia. Este tipo de información ayuda a los clínicos a seleccionar el antimicrobiano (ATM) apropiado, ayuda en el desarrollo de la política de uso de los mismos y proporciona datos para una vigilancia epidemiológica. Los datos de esta última constituyen un punto de partida para elegir adecuadamente un tratamiento empírico o tratamiento de primera línea, y para detectar la aparición y/o la diseminación de cepas bacterianas resistentes, así como de determinantes de resistencia en diferentes especies de bacterias (OIE, 2019).

Los métodos para la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos son utilizados en la actualidad, aún, casi exclusivamente con fines de investigación, los cuales proporcionan datos adicionales relevantes para los programas de vigilancia y seguimiento epidemiológicos.

Cuando se utilizan junto con análisis fenotípicos de las PSA tradicionales de laboratorio, prometen un aumento de sensibilidad, especificidad y rapidez en la detección de genes de resistencia específicos conocidos.

Pruebas *in vitro* de Sensibilidad a los Antimicrobianos

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos *in vitro* se puede determinar por varios métodos o pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Entre los métodos básicos de detección existen métodos de difusión, que incluye la prueba de difusión en agar con discos, antibiograma o método de Kirby Bauer y métodos de dilución que incluyen las pruebas de macrodilución y microdilución en caldo y la prueba de dilución en agar. Además, existe la prueba del gradiente de concentración o método epsilométrico, que es una combinación entre el método de difusión en agar y el método de dilución.

La PSA de uso corriente en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario es la prueba de difusión en agar con discos, antibiograma o método de Kirby Bauer, mientras que en bacterias determinadas y/o en laboratorios de investigación se utilizan las pruebas de dilución. El método epsilométrico se usa en casos especiales.

Cada uno de estos procedimientos requiere aplicar condiciones y métodos específicos, como el medio de cultivo, las condiciones y los tiempos de incubación, y la utilización de microorganismos específicos con rangos de inhibición apropiados como control de calidad. Es esencial que los métodos de las PSA proporcionen resultados reproducibles en el uso diario del laboratorio y que los datos sean comparables con los resultados obtenidos mediante un método de referencia reconocido, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* e *Internacional Organization for Standardization (ISO)*.

En ausencia de métodos estandarizados o de procedimientos de referencia, los resultados de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos obtenidos en diferentes laboratorios no se podrán comparar entre ellos de manera fiable.

Para realizar las PSA, previamente deberá realizarse la identificación del microorganismo con probable rol patógeno, aislado de una muestra clínica. Posteriormente, se realizará la siembra, en medio sólido, de una colonia aislada y luego de su desarrollo se realizará la PSA según el método elegido. Comúnmente, las infecciones son monomicrobianas, en los casos que se aíslen e identifiquen dos microorganismos patógenos de una misma muestra clínica, la sensibilidad a los antimicrobianos debe realizarse sobre cada uno de ellos.

No se deben realizar pruebas de sensibilidad a cultivos polimicrobianos, ni sobre el material clínico sin procesar (Ej.: fluidos biológicos normalmente estériles y orina), excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno. Cuando la PSA haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada.

No es aconsejable la realización de PSA, cuando la naturaleza de la infección no es clara y la muestra contiene microbiota normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento y favorecer la RAM.

Estos métodos se utilizan en bacterias que tienen un desarrollo rápido y en algunas con requerimientos nutricionales especiales. Según el método de PSA utilizado el criterio de interpretación está basado en el punto de corte clínico para su uso terapéutico o en el punto de corte microbiológico o epidemiológico (ECV, ECOFF o CUTOFF) para su uso epidemiológico.

Hasta el momento no están establecidas todas las pruebas de sensibilidad, los controles de calidad ni los criterios de interpretación para todas las bacterias patógenas veterinarias, en estos casos está permitido utilizar los puntos de corte de humanos.

Un aislamiento bacteriano sensible a un determinado agente antimicrobiano en las PSA se espera que responda clínicamente a esta droga en cuestión a las dosis habituales mientras que una bacteria resistente implicaría que el tratamiento no resultará satisfactorio.

Indicaciones

Las PSA están indicadas para cualquier microorganismo capaz de producir un proceso infeccioso que requiera tratamiento ATM y con fines epidemiológicos, en el estudio de sensibilidad bacteriana a nuevos agentes antimicrobianos. Actualmente, la mayoría del o los microorganismos causales de infección son capaces de exhibir resistencia a los ATM usados habitualmente.

Método de Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Difusión

El antibiograma por difusión en agar con discos, basado en el trabajo de Kirby Bauer y colaboradores, es uno de los métodos recomendados por el CLSI para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias, anaerobias facultativas, no exigentes, de crecimiento rápido como las que integran la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a bacterias exigentes con requerimientos nutricionales especiales como, *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Streptococcus* spp., entre otras. Es un método sencillo, práctico y fácil de realizar, reproducible si está estandarizado, y no requiere disponer de una infraestructura cara. Sus principales ventajas son: bajo costo, la facilidad para modificar la prueba cambiando los discos de antimicrobianos cuando así se requiera, la posibilidad de utilizarla como prueba de detección

frente a gran número de cepas, la posibilidad de identificar un subconjunto de cepas para pruebas posteriores mediante otros métodos, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Es una prueba útil en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone.

Fundamento

El método de difusión en agar con discos o antibiograma define la actividad *in vitro* de un ATM frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Este método hace referencia a la difusión que experimenta el ATM, impregnado en un disco de papel de filtro o tableta, con una concentración determinada del mismo, colocado sobre un medio de cultivo sólido en una placa de Petri, en el que se inoculó previamente una concentración estandarizada del microorganismo puro. Tan pronto el disco de papel de filtro o tableta se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, absorbe agua y el ATM difunde a partir de ellos, en forma radial a través del agar formándose un gradiente de concentración.

El resultado de la difusión en disco se determina, transcurridas 16 a 18 horas de incubación a 35-37°C, midiendo el diámetro de la zona de inhibición que aparece alrededor del mismo, de tal forma que el diámetro es proporcional a la sensibilidad de la bacteria al antimicrobiano presente en el disco.

Al tratarse de un método de difusión es fundamental considerar el grosor del agar sobre el que difunde el antimicrobiano, y el peso molecular del antimicrobiano lo que determina que a mayor peso molecular habrá una menor difusión con un consiguiente halo de inhibición menor.

Interpretación de los resultados del Método de Difusión con Discos

La interpretación de la prueba está basada en la respuesta *in vitro* de una bacteria a un antimicrobiano en relación con la farmacocinética de la droga para dosis habituales y en los niveles que éste alcanza en sangre, líquidos o tejidos. Además, se ha analizado en relación con estudios de eficacia clínica en el tratamiento de patógenos específicos.

Para la mayoría de las drogas, los diámetros de la zona de inhibición, expresados en milímetros, del método de difusión con discos se relacionan con los resultados cuantitativos, expresados en µg/ml o mg/L, de los métodos de dilución que determinan la concentración inhibitoria mínima (CIM). Estos métodos de dilución realizados primariamente sobre un gran número de aislamientos incluyeron cepas con mecanismos de resistencia relevantes para cada una de las drogas. El diámetro de esta zona de inhibición se corresponde con la CIM para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición para cada

antimicrobiano, obtenido para cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la concentración inhibitoria mínima de las mismas, obteniéndose la línea de regresión o recta de concordancia que proporciona la correspondencia entre las CIM y los diámetros de inhibición. Existen, por lo tanto, diámetros de inhibición estandarizados para cada antimicrobiano según la bacteria en cuestión. En otras palabras, la zona de inhibición se correlaciona de modo inversamente proporcional con el valor de la CIM para la bacteria analizada. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos.

La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedio (I), resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI.

Importante: las pruebas de difusión con discos basadas sólo en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin considerar su tamaño, no son aceptables como PSA desde el punto de vista metodológico.

Referencias

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2021. Terrestrial Manual Online Access. Part 2 Section 2.1. Chapter 2.1.1. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing (version adopted in May 2019). <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

Hudzicki J. 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad//Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Servicio Antimicrobianos.

Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". <http://antimicrobianos.com.ar/uploads/2012/11>

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

CAPÍTULO 6

Florencia Laura Pantozzi

Métodos Básicos de detección de la Sensibilidad Antimicrobiana en el Laboratorio de Bacteriología

Metodología de la Prueba de Difusión en Agar con Discos

El agar Müller Hinton, se considera el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina por demostrar buena reproducibilidad lote a lote, tener bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas, adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y por la existencia de muchos datos y experiencia recopilados que avalan las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Preparación del medio

Se realiza a partir de la base deshidratada, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente después de esterilizar se deja enfriar en baño de agua hasta 45-50°C para luego colocarlo en placas de vidrio o plástico de piso plano hasta un espesor de 4 milímetros. Esto corresponde entre 25 a 30 ml para las placas de Petri de 100 milímetros de diámetro interno. Posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar. Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2-8°C) hasta 7 días en bolsas de plástico cerradas para evitar la desecación. Debe realizarse un control de esterilidad de cada lote de placas incubando una muestra representativa por el término de 24 horas a 30-35°C.

pH

El agar debe tener un pH de 7,2-7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su solidificación. Si el pH es demasiado bajo aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos parecerán menos activos mientras tetraciclinas parecerán tener mayor actividad. Si el pH es demasiado alto se podrían esperar los efectos opuestos.

Se deja solidificar la cantidad necesaria de agar Müller Hinton alrededor del bulbo del electrodo del pHmetro de modo que quede cubierto y se mide.

Humedad

Las placas no deben presentar exceso de humedad en la superficie. Si esto ocurre se deben colocar abiertas en estufa a 35-37°C o en cabina de flujo laminar durante 10 a 30 minutos.

Controles de calidad internos

El objetivo de un programa de control de calidad es el monitoreo de la reproducibilidad de las PSA basado en la exactitud y precisión, la calidad de los reactivos usados en el ensayo y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas.

Control Calidad del agar Müller Hinton

Efecto de la Timina o Timinida

Los medios que contienen excesiva cantidad de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprima, produciendo así zonas más pequeñas, menos nítidas o sin halo que pueden dar como resultado un informe de falsa resistencia. Para evaluar cada lote de agar Müller Hinton en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control de *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 o ATCC® 33186 que se prueba frente a discos de trimetoprima/sulfametoxazol. Un medio adecuado mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más. En los medios con alto contenido en timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, menores de 20 mm o sin zona de inhibición.

Efectos por variación en la composición de cationes divalentes

La variación de cationes divalentes, principalmente Ca^{++} y Mg^{++} afectarán los resultados con tetraciclinas y aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Un excesivo contenido en cationes reducirá la zona de inhibición, mientras que bajas concentraciones producirán en efecto contrario. Un exceso de Zinc^{++} podrá reducir las zonas de inhibición de los carbapenemes. Para estos controles debe utilizarse la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

Control de Calidad de los Antimicrobianos

Los diámetros de los halos de inhibición para las cepas de referencia deben estar dentro de los límites establecidos en la tabla correspondiente del documento del CLSI 2013, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* Tabla 3A, en la siguiente página:

file:///C:/Users/Admin/Documents/Downloads/CLSI2013.pdf

Cepas de referencia para control de calidad

Escherichia coli ATCC® 25922, *Escherichia coli* ATCC® 35218 productora de β -lactamasa, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 ó 33186 se utilizan para controlar los niveles de timina o timidina en el agar Müller Hinton y se utiliza también para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos (gentamicina 120 μ g y estreptomycinina 300 μ g), *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 se usa como control de calidad en la determinación de β -lactamasa de Espectro Extendido o BLEE.

Almacenamiento de los discos de antimicrobianos

Los envases comerciales están diseñados para proteger de la humedad a los discos de papel para pruebas de sensibilidad. Los mismos deberán mantenerlos refrigerados a 8°C o en freezer a -14°C o menos. Los discos que contienen drogas de la familia de β -lactámicos deben mantenerse congelados para conservar su potencia, dejando en la heladera sólo el envase que está siendo utilizado. Las drogas más inestables, como β -lactámicos más inhibidores de β -lactamasa, entre otros, deben ser mantenidos congelados hasta el día de uso. Los discos deben ser sacados del refrigerador o freezer 1 o 2 horas antes, a fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos. Una vez que el cartucho fue abierto debe ser colocado en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada. Deben usarse sólo los discos que no alcanzaron la fecha de vencimiento indicada por los fabricantes y que hayan pasado el control de calidad interno.

Turbidez estándar para la preparación del inóculo

Para la densidad del inóculo se usa una suspensión de Sulfato de Bario como estándar de turbidez, que corresponde al 0.5 de la escala de McFarland o su equivalente óptico de suspensión de partículas de látex. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. También pueden utilizarse equipos fotométricos.

Preparación del estándar 0.5 de McFarland

Agregue 0,5ml de BaCl_2 0.048M (1,175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5ml de H_2SO_4 0,18M (1%V/V). Mientras se agrega el BaCl_2 mantener la suspensión en agitación continua. Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm. El estándar 0,5 McFarland debe presentar una absorbancia de 0,08-0,10 a 625 nm. Luego, se distribuye 4 a 6 ml de la suspensión obtenida dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar los inóculos. Mantener los estándares herméticamente cerrados a temperatura ambiente y al abrigo

de la luz. Antes de su uso para lograr una turbidez homogénea agitar vigorosamente; y reemplazar los estándares o verificar la densidad de los mismos mensualmente.

Procedimiento para la realización de la Prueba de Difusión con Discos

Preparación del inóculo

Método de desarrollo previo

De la placa de cultivo de 18 a 24 horas de incubación, seleccione 3 a 5 colonias aisladas de igual morfología. Prepare una suspensión en 4 o 5 ml de caldo tripteína soya o similar, tocando la parte superior de cada colonia. Incube a 35-37°C hasta que éste alcance o exceda la turbidez del estándar, 2-6 horas, y ajuste la turbidez del inóculo con solución fisiológica o caldo hasta que su densidad óptica se asemeje a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para ajustar la densidad del inóculo se pueden utilizar equipos fotométricos o por comparación visual contra el estándar. Para este procedimiento utilizar luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

Método directo de inoculación a partir de colonia aislada

De la placa de cultivo no selectivo, agar tripteína soya o agar sangre, después de 18 a 24 horas de incubación, seleccionar 3 a 5 colonias aisladas de igual morfología. Prepare una suspensión de solución fisiológica tocando la parte superior de cada colonia y ajuste la turbidez del inóculo con solución fisiológica hasta que su densidad óptica se asemeje a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland. Esta suspensión contendrá aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922. Para este procedimiento utilice luz adecuada y mire los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

Inoculación de las placas

Se debe realizar dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo. Se siembran las placas de Müeller Hinton con un hisopo estéril. Presionar el hisopo contra las paredes del tubo por encima del nivel líquido a fin de escurrir el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca del agar por hisopado en tres direcciones, rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Como paso final se debe hisopar

la circunferencia de la placa. De esta manera se deberían obtener zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo homogéneo.

Dejar la tapa de la placa abierta de 3 a 5 minutos, máximo 15, antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Importante: nunca use cultivos *overnight* en medio líquido ni otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas.

Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas

Colocar los discos distribuidos uniformemente sobre la superficie del agar inoculada con pinza estéril o dispensador, aplicando una ligera presión a una distancia no menor a 24 mm desde el centro al otro. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser reubicado una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más 5 por placa de 100 milímetros. Incubar las placas invertidas a 35-37°C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados.

Método de difusión en agar con discos

Condiciones básicas para su realización

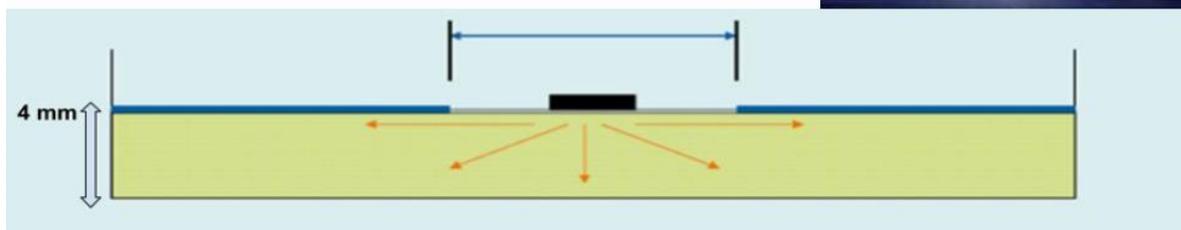
Medio de cultivo: agar Müller Hinton

Altura del agar en la placa: 4 mm

Inóculo: equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland

Sembrar toda la superficie del agar para asegurar una completa distribución del inóculo

Colocación del disco para cada antimicrobiano



Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de las zonas de inhibición, incluyendo el diámetro del disco, utilizando calibre o regla, sosteniendo la placa sobre un fondo negro e iluminada con luz reflejada.

El desarrollo bacteriano en la placa deberá ser confluyente, la aparición de colonias aisladas indica un inóculo bajo por lo que el ensayo debe repetirse. El diámetro de la zona de inhibición obtenido está muy influenciado por la densidad del inóculo bacteriano aplicado, lo cual respalda la exigencia de estandarizarlo. Si se aplica un inóculo más denso de lo previsto, se obtendrán

zonas de inhibición más pequeñas, y si es más escaso se obtendrán zonas de inhibición más grandes.

El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas. Las colonias de tamaño significativo que crezcan dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. *Proteus* spp. podría presentar *swarming* dentro de la zona de inhibición lo que deberá ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se deberá medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de hemólisis, Ej. *Streptococcus* spp.

Los tamaños de la zona de inhibición serán interpretados en las tablas correspondientes y los organismos se informarán sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

Microorganismos con requerimientos nutricionales especiales

Cuando se deban probar microorganismos con requerimientos nutricionales especiales, se utilizará agar Müeller Hinton suplementado el medio, los procedimientos de control de calidad y las categorías de interpretación deben ser adaptados para cada uno de ellos (*Streptococcus* spp. y *Actinobacillus* spp.).

***Streptococcus* spp.**

El medio recomendado es el agar Müeller Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada.

***Actinobacillus* spp.**

El medio recomendado es el agar Müeller Hinton–Chocolate en atmósfera del 5 - 7% de CO₂.

Método de Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución

Fundamento

La finalidad de estos métodos de dilución en caldo de cultivo y en agar es determinar la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión ya sea en caldo de cultivo o en agar, denominada concentración mínima inhibitoria o CIM.

Son utilizadas para medir cuantitativamente la actividad in vitro de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano.

El intervalo de concentraciones analizadas en los métodos de dilución en general incluye el punto de corte clínico y microbiológico, con diluciones a la mitad, por encima y por debajo de esos valores, según corresponda.

Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos, macrodilución, o placas con caldo, microdilución, o agar, dilución en agar; a los cuales se les agrega el ATM en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan luego de 16 a 18 horas de incubación a 35-37°C y se determina la CIM de cada ATM frente al microorganismo ensayado. El valor de la CIM obtenido por los métodos de dilución, orienta al clínico sobre que concentración de ATM que necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante. La CIM, sin embargo, no representa un valor absoluto. La CIM real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo. Si para la determinación de la CIM, se utiliza la metodología más común de diluciones seriadas al medio, por Ej. 1, 2,4, 8,16 µg/ml, etc., y se determina una CIM de 16 µg/ml, el verdadero valor podría estar entre 16 y 8 µg/ml. Debe tenerse en cuenta que a pesar de realizar las pruebas de dilución bajo condiciones cuidadosamente controladas, no siempre se obtienen los mismos resultados. Por lo tanto, las determinaciones de las CIM tienen una variación inherente de ± 1 dilución.

Cuando se produce inhibición del crecimiento con la menor concentración utilizada, por Ej. 0,25 µg/ml, el verdadero valor de la CIM no se puede determinar exactamente y debe informarse como menor o igual (\leq) que dicha concentración, a la inversa ocurre cuando la inhibición del crecimiento se produce con la mayor concentración utilizada, por Ej. 512 µg/ml, donde debe informarse mayor o igual (\geq) que dicha concentración.

En el informe del resultado de la CIM al veterinario, el valor debe ser acompañado por su correspondiente interpretación, sensible, intermedio o resistente, para una combinación específica de bacteria/antimicrobiano y del o los microorganismos que se tienen en cuenta en los controles de calidad.

El método por dilución en sus diferentes variantes es utilizado, con mayor frecuencia, en laboratorios de investigación o de diagnóstico donde la cantidad de muestras recibidas lo justifique.

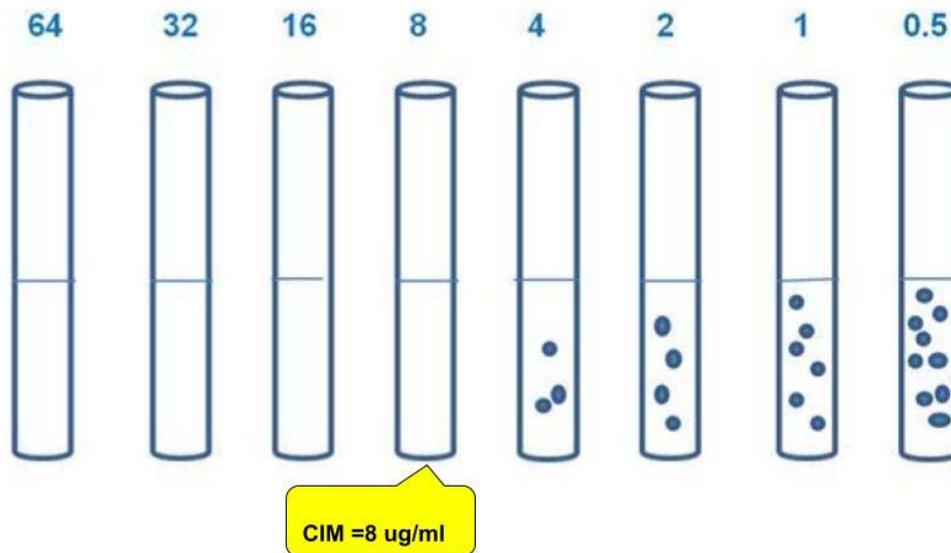
Existen en el mercado varios tipos de placas de microtitulación que contienen ATM prediluidos liofilizados o desecados dentro de los pocillos de las placas. Para facilitar la comparación de resultados entre laboratorios, es conveniente utilizar siempre los mismos lotes, lo que ayudaría a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los ATM, junto a la utilización de un protocolo estandarizado que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados. Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad de ajuste a las posibles necesidades de cambio en el programa de control y seguimiento. Como la compra de placas antimicrobianas y de la

infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología puede resultar inviable para algunos laboratorios.

Las técnicas detalladas de PSA estandarizadas de dilución en caldo, macrodilución y microdilución, y de dilución en agar, podrán encontrarlas en la siguiente página: <http://antimicrobianos.com.ar> > uploads > 2012/11metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución.

Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Es la concentración más baja de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en cuestión



Prueba del Gradiente de Concentración o Método Epsilométrico (E-test®)

Es una combinación entre el método de difusión en agar y el método de dilución. Consiste en una tira plástica que contiene gradientes predefinidos de concentraciones de un antimicrobiano y es usada para la determinación de la CIM. Determina 15 diluciones del antimicrobiano. Se coloca la tira sobre una placa de agar Müeller Hinton inoculada con la bacteria a estudiar estandarizada con la escala 0,5 de McFarland. Luego de 16 a 18 horas de incubación a 35-37°C aparece una elipse en la intersección del valor de la escala de la CIM expresada en $\mu\text{g/ml}$ donde la concentración del antimicrobiano inhibe el crecimiento de la bacteria. El Etest® de BioMérieux es una versión comercial de esta técnica.

Referencias

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2021. Terrestrial Manual Online Access. Part 2 Section 2.1. Chapter 2.1.1. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing (version adopted in May 2019). <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

Hudzicki J. 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad//Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Servicio Antimicrobianos. Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". <http://antimicrobianos.com.ar/uploads/2012/11>

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BioMérieux. <https://www.biomerieux.com.ar/diagnostico-clinico/productos/etestr>

CAPÍTULO 7

Estándares veterinarios para pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Fabiana Alicia Moredo

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana estandarizadas para medicina veterinaria están disponibles desde la década de 1990, mientras que los laboratorios de diagnóstico de medicina humana contaban con ellas 30 años antes. Esto no es sorprendente dada la variedad de especies hospedadoras (animales de compañía, para consumo humano y exóticos) y las diferencias en la aplicación de los resultados de las pruebas, individual o poblacional (por ejemplo, los resultados obtenidos para un patógeno de un canino se usarán para seleccionar el tratamiento para el animal individual, mientras que la misma información para un aislamiento porcino se puede usar para diseñar una terapia poblacional). Estas variables son la principal causa para que la disponibilidad de métodos estandarizados y tablas de interpretación de resultados que proporcionen resultados precisos, reproducibles y clínicamente relevantes para los patógenos veterinarios es lento, aunque en las últimas 2 décadas se logró un progreso sustancial (Watts, 2018).

El uso apropiado y prudente de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria es uno de los ítems claves que deben considerarse como estrategia de control de la RAM. Diversos organismos nacionales, europeos e internacionales tomaron la iniciativa para su promoción (OMS 2014, OIE 2012, EMA 2014, EFSA 2014, FVE 2012). Entre las medidas vinculadas al sector veterinario, numerosas directrices y recomendaciones nacionales e internacionales destacan la importancia del diagnóstico bacteriano y promueven la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Hasta hace no muchos años, no se realizaban con fines terapéuticos, sino que eran propias de trabajos de investigación, y se llevaban a cabo según normativas que rigen para aislamientos de origen humano (Toutain, 2017).

Actualmente, son dos las principales instituciones con mayor influencia en la aplicación de criterios de estandarización, el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de Estados Unidos y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de la Unión Europea. Sin embargo, existen otros comités y agencias, con frecuencia de carácter nacional, que contribuyen con el desarrollo paralelo de programas de estandarización de las técnicas de estudio de sensibilidad y, sobre todo, de la interpretación de los resultados obtenidos.

Las diferencias entre distintos comités no sólo tienen un componente académico, sino que suponen, en ocasiones, serios problemas para estimar la importancia de la resistencia en

distintos países. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, a través del EUCAST (que representa sociedades científicas de la mayoría de los países europeos) y el CLSI, publican actualizaciones continuas, documentos sobre terminología, metodología de los estudios de sensibilidad *in vitro*, y determinación de puntos de corte de sensibilidad y resistencia para algunos antimicrobianos.

Actualmente, muchas de las pruebas que se utilizan para evaluar *in vitro* el comportamiento de los antimicrobianos en medicina veterinaria tienen normativas y documentos propios para poder prescribir tratamientos basados en ellas.

Como se describió en el capítulo anterior, para que los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana sean reproducibles y comparables, es fundamental seguir las directrices establecidas por instituciones de reconocimiento internacional como CLSI, EUCAST o ISO.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Los documentos del CLSI se centran en una variedad de áreas de especialidad, desde los conceptos básicos del laboratorio hasta los sistemas de gestión de calidad, verificación y validación y gestión de información. También desarrollan herramientas interactivas y productos complementarios.

El desarrollo de estándares comienza con voluntarios, quienes aportan una diversidad de conjuntos de habilidades, gran experiencia y vastos conocimientos de los requisitos regulatorios para liderar el desarrollo de estándares de laboratorios clínicos aplicables a nivel mundial. El enfoque colaborativo de CLSI garantiza una representación equilibrada de la comunidad global de laboratorios para producir estándares de consenso imparcial que pueden ser adoptados con confianza por laboratorios, médicos, agencias reguladoras y la industria en todo el mundo.

CLSI promovió la conformación de tres subcomités cuyo rol principal es colaborar con el desarrollo de los estándares y pautas que promuevan la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobianas precisas y confiables e informes apropiados de resultados lo que permite el asesoramiento a los médicos en la selección de la terapia antimicrobiana adecuada: i) Subcomité de pruebas de sensibilidad antimicrobiana (AST) (del inglés *Antimicrobial Susceptibility Testing*), ii) Subcomité de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos; iii) Subcomité de pruebas de sensibilidad antimicrobianas veterinarias (VAST) (del inglés *Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Los voluntarios del subcomité VAST colaboran con el desarrollo y promoción de estándares metodológicos, puntos de corte y categorías de interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas *in vitro* para el estudio de bacterias de origen animal, aportan sugerencias para las pruebas y estrategias de informes que sean clínicamente relevantes y rentables, actualizan continuamente los estándares mediante el desarrollo de métodos nuevos o revisados, puntos de corte, categorías interpretativas y parámetros de control de calidad, instruyen a los usuarios a

través de la comunicación multimedia de estándares y pautas y fomentan el diálogo con los usuarios de estos métodos y quienes los aplican.

Los tres documentos de criterios de interpretación de pruebas de sensibilidad antimicrobiana del CLSI para bacterias y hongos para uso humano y veterinario están disponibles gratuitamente en su sitio web. También se encuentran otros recursos valiosos relacionados con las actividades y decisiones del Subcomité de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana.

Documentos elaborados por el subcomité VAST

Hasta la fecha, los documentos elaborados por el subcomité VAST de relevancia para medicina veterinaria son:

VET01. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, 5th Edition*. Publicado en 2018.

VET01S. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, 5th Edition*. Publicado en 2020 (Reemplaza Vet-08 4th ed. y está disponible en línea, de manera gratuita).

VET02. *Development of Quality Control Ranges, Breakpoints, and Interpretive Categories for Antimicrobial Agents Used in Veterinary Medicine, 4th Edition*. Publicado en 2021.

VET03. *Methods for Antimicrobial Broth Dilution and Disk Diffusion Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals, 2nd Edition*. Publicado en 2020.

VET03 Supplement (VET04). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals, 3rd Edition*. Publicado en 2020.

VET05. *Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin, 1st Edition*. Publicado en 2011.

VET06. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals, 1st Edition*. Publicado en 2017.

VET09. *Understanding Susceptibility Test Data as a Component of Antimicrobial Stewardship in Veterinary Settings, 1st Edition*. Publicado en 2019.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

EUCAST se formó en 1997 como un comité permanente organizado conjuntamente por ESCMID (del inglés *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), ECDC (del inglés *European Centre for Disease Prevention and Control*) y comités de puntos de corte nacionales europeos.

EUCAST se ocupa de los puntos de corte y los aspectos técnicos de las pruebas fenotípicas de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* y funciona como el comité de puntos de corte de la EMA (del inglés *European Medicines Agency*) y el ECDC. EUCAST no se ocupa de políticas de

antibióticos, vigilancia o contención de resistencias o control de infecciones. El Comité Directivo es el órgano de toma de decisiones. Cuenta con el apoyo de un Comité General con representantes de 50 países europeos y no europeos como Australia, Brasil, Canadá, China, Estados Unidos, Israel, Marruecos, Nueva Zelanda, Sudáfrica.

Desde 2019, todos los países europeos se rigen por las sus directrices y, a partir de 2020, el ECDC solo acepta "datos con fines de vigilancia" generados por laboratorios que utilizan los puntos de corte y métodos de EUCAST. Muchos países fuera de Europa también decidieron adoptar las directrices de EUCAST.

Los puntos de corte para nuevos agentes antimicrobianos se establecen como parte del proceso de concesión de licencias a través de la EMA o las agencias nacionales de medicamentos. Si bien con algunas limitaciones, los puntos de corte EUCAST también están disponibles para sistemas automatizados de sensibilidad antimicrobiana.

EUCAST está organizado en subcomités que se establecen para tratar cuestiones o áreas específicas que requieren conocimientos especializados. Las consultas y decisiones sobre las propuestas de los subcomités se realizan a través del Comité Directivo y sigue la estructura de todas las demás consultas y decisiones. En la actualidad, se encuentran vigentes: i) *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing* (EUCAST-AFST), establecido en 2002. ii) *Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST), se formó en 2015 y se ocupa de todos los aspectos de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de patógenos bacterianos de origen animal y bacterias animales con potencial zoonótico. Funciona de manera permanente y dentro del formato y estructura de EUCAST. iii) *Subcommittee on the role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing* creado en 2015. iv) *Subcommittee on antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria*. v) *Subcommittee on MIC distributions and the setting of ECOFFs*. vi) *Subcommittee on Anaerobe Susceptibility Testing* se encuentra revisando los puntos de corte para bacterias anaerobias y desarrollando los protocolos para las pruebas de sensibilidad por difusión.

La visión de VetCAST es contribuir con los estándares globales para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de patógenos bacterianos de origen animal. Para cumplir con esta misión, es de suma importancia obtener el reconocimiento oficial de la EMA, el ECDC y la EFSA (del inglés *European Food Safety Authority*). El objetivo final es convertirse en un organismo operativo de la Unión Europea (UE) con base científica de EMA/CVMP (del inglés *Committee for Medicinal Products for Veterinary*) para la definición/aprobación de puntos de corte específicos para veterinarios.

Parte de las actividades que lleva a cabo VetCAST incluyen: i) Proporcionar asesoramiento sobre el tipo y la calidad de la CIM, los datos farmacocinéticos (PK) y clínicos necesarios para establecer puntos de corte clínicos; ii) Definir puntos de corte de CIM clínicos para nuevos agentes antimicrobianos veterinarios; iii) Revisar puntos de corte para medicamentos genéricos; iv) Asesorar sobre el espectro bacteriano de agentes antimicrobianos veterinarios.

La función de VetCAST es: i) Establecer un comité con fundamentos científicos para cooperar con los profesionales europeos en medicina veterinaria, la EMA, el ECDC y la EFSA; ii)

Determinar puntos de corte de antimicrobianos específicos para el campo veterinario; iii) Armonizar las pruebas veterinarias de sensibilidad a los antimicrobianos en la UE; iv) Estimular la capacitación sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y la terapia antimicrobiana en el campo veterinario en Europa; v) Iniciar y coordinar la investigación en la UE destinada a dar claridad en las pruebas veterinarias de sensibilidad antimicrobianas; vi) Establecer puntos de corte específicos veterinarios faltantes o insuficientes (puntos de corte específicos de especies bacterianas, hospedadores animales e infecciones); vii) Elaborar métodos optimizados para las pruebas de sensibilidad antimicrobianas de patógenos bacterianos de origen animal y bacterias zoonóticas que pueden afectar a los seres humanos; viii) Asegurar que los protocolos de pruebas de sensibilidad antimicrobianas y los criterios de interpretación sean de libre acceso en línea a través del sitio web de EUCAST.

A esta información se puede acceder de forma libre en el sitio web de EUCAST. Las recomendaciones se actualizan con frecuencia y las últimas versiones están disponibles en www.eucast.org.

Referencias

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) <https://clsi.org/>

CLSI. Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. 5th ed. M23. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

CLSI. Procedure for optimizing disk contents (potencies) for disk diffusion testing of antimicrobial agents using harmonized CLSI and EUCAST criteria. 1st ed. CLSI supplement M23S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) <https://www.eucast.org/>

Grupo Asesor de la OMS sobre Vigilancia Integrada de la Resistencia a los Antimicrobianos (AGISAR) 2017 <http://www.agisar.org/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) 2018 Concienciación y abogacía para la contención de la resistencia a los antimicrobianos. Directrices para el diseño de estrategias bajo el enfoque una salud. Recuperado de (www.fao.org/publications).

Lueddeke GR, Kaufman GE, Kahn LH, Krecek RC, Willingham AL, Stroud CM, Lindenmayer JM, Kaplan B, Conti LA, Monath TP, Woodall J. 2016. Preparing society to create the world we need through 'One Health' education, South Eastern European Journal of Public Health (SEEJPH). [https://doi: 10.4119/seejph-1841](https://doi.org/10.4119/seejph-1841)

- FAO-OIEWHO Collaboration. A Tripartite Concept Note, 2010
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Current_Scientific_Issues/docs/pdf/FINAL_CONCEPT_NOTE_Hanoi.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2016) Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente,
https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/PortalAMR/ES_OIE-AMRstrategy.pdf
- European Committee on antimicrobial resistance VET CAST
https://eucast.org/ast_of_veterinary_pathogens/
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2021). <https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/resistencia-antimicrobiana>. Recuperado 10 de julio 2021
- Organización Mundial de la Salud (27 de febrero 2017) Lista de bacterias de las que se necesitan nuevos antibióticos . <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Recuperado 10 de julio 2021
- Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud. Resistencia a los antimicrobianos 13 de octubre 2020 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Recuperado 10 de julio 2021
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A, Damborg P, Ferran AA, Mevius D, Pelligand L, Veldman KT and Lees P. 2017. En Route towards European Clinical Breakpoints for Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing: A Position Paper Explaining the VetCAST Approach. *Front. Microbiol.* 8:2344. doi: 10.3389/fmicb.2017.02344
- Watts JL, Sweeney MT. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria of veterinary origin. *Microbiol Spectrum* 6(2):ARBA-0001-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0001-2017

CAPÍTULO 8

Aplicación del antibiograma en el diagnóstico de laboratorio veterinario

Fabiana Alicia Moredo

La elección del agente antimicrobiano adecuado para el tratamiento de animales que padecen una infección bacteriana es un tema complejo. Si bien los resultados de los diagnósticos bacteriológicos y las pruebas de sensibilidad antimicrobianas, orientan sobre los antimicrobianos potencialmente adecuados, las pruebas de sensibilidad antimicrobianas armonizadas, los criterios de interpretación veterinarios específicos y los rangos de control de calidad, que son esenciales para su realización *in vitro* y evaluar los resultados correspondientes, no están disponibles para todos los antimicrobianos, patógenos bacterianos, especies animales y sitios de infección de relevancia veterinaria. Además, el beneficio clínico de un agente antimicrobiano (definido como su eficacia *in vivo*) no depende exclusivamente de la sensibilidad *in vitro* del patógeno en estudio. Independientemente de la elección correcta de un fármaco antibacteriano con propiedades farmacocinéticas adecuadas y una formulación farmacéutica apropiada, el éxito del tratamiento depende sustancialmente de su uso adecuado. Incluso, si esto se asegura y se confirma la sensibilidad *in vitro*, una mejora insuficiente de los signos clínicos puede deberse a bacterias formadoras de biopelículas, persistentes o condiciones fisicoquímicas específicas en el sitio de la infección, como el valor de pH, la presión parcial de oxígeno y la tasa de perfusión (Richter, 2020).

En este capítulo se describirán los criterios de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana del CLSI y EUCAST.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se encuentran entre los más importantes que emiten los laboratorios de microbiología clínica porque guían rutinariamente las decisiones críticas de tratamiento. Debido a la complejidad que reviste seleccionar un agente antimicrobiano apropiado para el tratamiento de una enfermedad infecciosa es importante considerar: si es necesario administrar una dosis de antibiótico más altas o más frecuentemente que lo habitual; si el antimicrobiano alcanzará la concentración necesaria en el sitio del organismo donde se localiza la infección; y si existe incertidumbre en los resultados de las pruebas debido a la variabilidad técnica que no se puede eliminar. El informe de los resultados y la interpretación de los mismos debe ser un trabajo conjunto entre profesionales veterinarios de laboratorio, sanitaristas, farmacólogos y clínicos.

Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas

Tanto EUCAST como CLSI utilizan las categorías "sensible" (S), "intermedio" (I) y "resistente" (R) y, hasta hace poco, también compartían sus definiciones. Durante el proceso internacional de promoción de las directrices EUCAST, se hizo evidente que no era posible una interpretación constructiva del significado de "intermedio". Al analizar la definición, quedó claro que había al menos tres partes no relacionadas reunidas en una: (i) el fármaco tiene un nivel de actividad antimicrobiana asociado a un efecto terapéutico incierto, (ii) una infección debida a un aislamiento puede ser tratada adecuadamente en regiones del cuerpo donde el fármaco se concentra físicamente o cuando se puede utilizar una dosis alta del fármaco, y (iii) una zona de amortiguamiento debe evitar que pequeños factores técnicos no controlados causen grandes discrepancias en las interpretaciones (Kahlmeter, 2019).

Tabla 1

Criterio de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas según el documento VET01S ED5:2020 del CLSI

Categoría	Definición
SENSIBLE	categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con CIM igual o inferior o un diámetro de halo de inhibición igual o superior al punto de corte sensible son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del antimicrobiano cuando se usa la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, lo que resulta en probable eficacia clínica.
RESISTENTE	categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con CIM igual o superior o un diámetro de halo de inhibición igual o inferior al punto de corte resistente, no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del antimicrobiano con esquemas de dosificación normales y/o que demuestran CIM o diámetros de inhibición que caen en el rango en el que son probables los mecanismos de resistencia microbianos específicos, y la eficacia clínica no se demostró de manera confiable en aislamientos con fenotipos similares.
INTERMEDIO	categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con CIM o diámetros de halo de inhibición dentro del rango intermedio que se acercan a los niveles sanguíneos y tisulares usualmente alcanzables y/o para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que para los aislamientos sensibles ¹ .
NO-SENSIBLE	categoría utilizada para aislamientos para los cuales solo se designa punto de corte sensible debido a la ausencia o rara ocurrencia de cepas resistentes. Los aislamientos para los cuales la CIM del antimicrobiano está por encima o los diámetros de halo de inhibición están por debajo del valor indicado para el punto de corte sensible, deben informarse como no sensibles ^{2,3} .

1. La categoría intermedia implica eficacia clínica en sitios anatómicos donde los medicamentos están fisiológicamente concentrados o cuando se puede usar una dosis más alta de lo normal de un medicamento. Esta categoría también sirve como una zona de amortiguamiento para la

variabilidad inherente en los métodos de prueba, lo que debería evitar que factores técnicos pequeños e incontrolados causen discrepancias importantes en las interpretaciones, especialmente para medicamentos con márgenes de farmacotoxicidad estrechos. 2. Un aislamiento que se interpreta como no sensible no significa necesariamente que tenga un mecanismo de resistencia. Es posible que los aislamientos con CIM por encima del punto de corte sensible que carecen de mecanismos de resistencia puedan encontrarse dentro de la distribución de tipo salvaje después del momento en que se estableció el punto de corte solo sensible. 3. El término "no sensible" no debe utilizarse cuando el texto describe una categoría de organismo/fármaco con categorías interpretativas intermedias y resistentes.

En principio, EUCAST evitó definir puntos de corte que dividieran las distribuciones de CIM de microorganismos que carecían de mecanismos de resistencia a un antimicrobiano determinado, debido a, en primer lugar, que no encontró evidencia que sugiriera que existe una correlación entre el resultado clínico y la CIM dentro de la distribución de fenotipo salvaje y, en segundo lugar, porque no sería posible lograr la reproducibilidad de los resultados de la prueba. Complementariamente, evitó definir una categoría intermedia si la exposición no podía aumentarse cambiando la dosis, la frecuencia o el modo de administración o porque el antimicrobiano se concentraría en el sitio de la infección como resultado de su farmacocinética. Finalmente, al publicar los regímenes de dosificación en los que se basaron los puntos de corte, como parte de la tabla de puntos de corte, aclaró que todos dependen de la dosis. Las dosis se sometieron a una consulta pública internacional en la que se pidió a los usuarios de los puntos de corte de EUCAST que se cercioraran de que las pautas nacionales de dosificación y las tradiciones coinciden o reemplazan la guía de EUCAST sobre "estándar" y "alta exposición" (Kahlmeter, 2019).

Como consecuencia, el Comité Directivo de EUCAST acordó redefinir las categorías sensible, intermedio y resistente, conservando las abreviaturas S, I y R. Esta decisión fue tomada en junio de 2018, luego de tres consultas (2015, 2017 y 2018) disponibles en el sitio web de EUCAST. Las nuevas definiciones son válidas desde 2019-01-01 (punto de corte EUCAST tabla v.9.0).

Tabla 2

Criterio de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas según EUCAST tabla v.9.0

Categoría (Abreviatura)	Definición
SENSIBLE, RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN ESTÁNDAR (S)	un microorganismo se clasifica como sensible, régimen de dosificación estándar ¹ , cuando existe una alta probabilidad de éxito terapéutico utilizando el régimen de dosificación estándar del antimicrobiano.
SENSIBLE, CON MAYOR EXPOSICIÓN (I)	un microorganismo se clasifica como sensible, con mayor exposición ¹ , cuando existe una alta probabilidad de éxito terapéutico debido a que la exposición al agente antimicrobiano aumenta al ajustar el régimen de dosificación o por su concentración en el sitio de la infección.
RESISTENTE	un microorganismo se clasifica como resistente cuando existe una alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso cuando haya mayor exposición ¹ .

1. Exposición refiere al modo de administración, dosis terapéutica, intervalo de dosificación, tiempo de infusión, así como la distribución, el metabolismo y la excreción del agente antimicrobiano influirán en el microorganismo infectante en el sitio de la infección.

Selección de agentes antimicrobianos para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobianas y su informe

Agentes antimicrobianos apropiados para ser incluidos en las pruebas de rutina

Seleccionar los agentes antimicrobianos apropiados para probar e informar es una decisión que debe tomar cada laboratorio en consulta con veterinarios, profesionales de enfermedades infecciosas, farmacólogos clínicos y equipos de administración de antimicrobianos, si están disponibles. Las recomendaciones para cada grupo de organismos incluyen agentes antimicrobianos que muestran un rendimiento aceptable en las pruebas *in vitro*. Las consideraciones en la asignación de agentes antimicrobianos a grupos específicos de prueba/informe incluyen eficacia clínica, prevalencia de resistencia, minimización de la aparición de resistencia, costo, indicaciones clínicas de uso aprobadas por la agencia reguladora y recomendaciones de consenso actuales para agentes de primera elección y alternativos. Las pruebas de agentes seleccionados pueden ser útiles para fines de control y/o seguimiento de infecciones (CLSI, 2020).

Si bien hay agentes antimicrobianos que pueden probarse de manera rutinaria o selectiva, debe considerarse si están aprobados o no por las agencias o autoridades reguladoras en cada país ya que antimicrobianos que en algunos países pueden ser legales o estar permitidos, en otros no. Por ejemplo, en la República Argentina, el SENASA prohibió el uso de carbadox (Res. SENASA 57/16), cloranfenicol (Disposición 655 / 1988) y colistina (Res. SENASA 22/19) en animales de producción para consumo humano; en los Estados Unidos, AMDUCA el uso no prescrito de fluoroquinolonas y glicopéptidos en el mismo grupo de animales.

Agentes antimicrobianos equivalentes

Hay determinados antimicrobianos, en las tablas del CLSI se encuentran enumerados juntos en un solo recuadro, para los cuales las categorías interpretativas (sensible, intermedio o resistente) y la eficacia clínica son similares. Dentro de cada cuadro, un "o" entre antimicrobianos indica agentes para los cuales la resistencia y la sensibilidad cruzada son casi completas. Los resultados de un antimicrobiano conectado por un "o" se pueden usar para predecir los resultados del otro. Por ejemplo, las Enterobacteriales sensibles a la ampicilina pueden considerarse sensibles a la amoxicilina. Los resultados obtenidos de ampicilina podrían informarse junto con un comentario de que el aislamiento también es sensible a amoxicilina. Para los medicamentos conectados con "o", los errores mayores y muy importantes combinados son inferiores al 3 %, y los errores menores son inferiores al 10 %, según una gran población de bacterias analizadas. "O" también se usa para agentes comparables cuando se prueban contra organismos para los cuales se proporcionan puntos de corte "solo sensibles" (p. ej., ampicilina o amoxicilina con *Streptococcus canis*). Cuando ningún "o" conecta a los antimicrobianos dentro de un cuadro, los resultados no se pueden usar para predecir los de otro, debido a discrepancias o datos insuficientes.

Informe de resultados

Cada laboratorio debe decidir qué agentes antimicrobianos informar de forma rutinaria y cuáles solo de forma selectiva. Los resultados de los agentes antimicrobianos probados, pero no informados de forma rutinaria deben estar disponibles a pedido, o pueden informarse para tipos de muestras seleccionados.

Los clientes del laboratorio es responsable de garantizar que los compuestos se utilicen adecuadamente para las categorías de hospedadores de cada animal (p. ej., vacas lactantes, terneros) de acuerdo con la indicación aprobada.

Los valores de CIM pueden informarse directamente a los médicos con fines de atención al paciente. Sin embargo, para facilitar la comprensión del informe CIM, es esencial que también

se proporcione un resultado de categoría interpretativa (es decir, S, I o R). **Las mediciones de diámetro de zona sin una categoría interpretativa no deben informarse.**

Test/ Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Antimicrobial Agent Class/ Subclass	Organism	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
						S	I	R	S	I	R	
Cats (Continued)												
A	UTI	Cefovecin	Cephalosporin III	<i>E. coli</i>	30 µg	≥ 24	21-23	≤ 20	≤ 2	4	≥ 8	
A	SST	Enrofloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	5 µg	≥ 23	17-22	≤ 16	≤ 0.5	1-2	≥ 4	
A	SST	Marbofloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	5 µg	≥ 20	15-19	≤ 14	≤ 1	2	≥ 4	
A	SST	Orbifloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	10 µg	≥ 23	18-22	≤ 17	≤ 1	2-4	≥ 8	
A	Resp, skin	Pradofloxacin	Fluoroquinolones ^c	<i>E. coli</i>	5 µg	≥ 24	20-23	≤ 19	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	(20) Pradofloxacin breakpoints were determined using a dose of 3 mg/kg once daily of an oral tablet or 5 mg/kg once daily of an oral suspension for cats.

Imagen 1. Tabla 2A. Diámetros de halo de inhibición y puntos de corte de la CIM para Enterobacterales. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition

Los laboratorios solo deben informar los resultados de los agentes antimicrobianos para los cuales se dispone de puntos de cortes según microorganismo, especie animal y proceso infeccioso. No es apropiado aplicar puntos de corte de CIM o de difusión en disco tomados de una tabla en la que el organismo no está incluido. Puede haber casos raros en los que un agente antimicrobiano para el que no existen puntos de corte CLSI (p. ej., tigeciclina) puede ser eficaz contra el organismo aislado. En estos casos, se debe consultar el prospecto del agente antimicrobiano.

La imagen 1, corresponde a una sección de la tabla 2A del documento CLSI VET01S ED5:2020 (acceso libre). A modo de ejemplo, se pueden observar los puntos de cortes para CIM y diámetros de halos de inhibición para determinar el comportamiento de diversos antimicrobianos frente a Enterobacterales aislados de infecciones del tracto urinario (UTI), piel y tejidos blandos (SST) y aparato respiratorio y piel de gatos.

Para determinados microorganismos, aún no se dispone de estudios adecuados para desarrollar estándares definitivos y reproducibles que permitan interpretar los resultados como *Mycoplasma*, y *Lawsonia intracellularis*. Estos microorganismos pueden necesitar diferentes medios, sustratos o atmósferas de incubación, o pueden mostrar una marcada variación de cepa a cepa en la tasa de crecimiento, por lo cual se recomienda la consulta con un especialista en enfermedades infecciosas para que oriente en la determinación de la necesidad de pruebas de

sensibilidad y en la interpretación de los resultados. Los informes publicados en la literatura médica veterinaria y las recomendaciones de consenso actuales para la terapia de microorganismos poco comunes, pueden descartar la necesidad de realizarlas. Si es necesario, el método de dilución suele ser el más apropiado, y esto puede requerir el envío del microorganismo a un laboratorio de referencia. Se debe informar a los veterinarios de las limitaciones de los resultados y recomendarles que los interpreten con precaución (CLSI, 2020).

Respuestas insuficientes o fracasos de tratamientos antimicrobianos

Las respuestas insuficientes a un tratamiento antimicrobiano o directamente su fracaso, pueden deberse a diversas circunstancias como son las interacciones entre los agentes antimicrobianos, los patógenos bacterianos y los animales enfermos y su comprensión es un tema importante en los intentos de optimizar la terapia antibacteriana en animales.

Richter y col. (2020) mencionan como principales motivos de respuesta insuficiente o fracaso de los tratamientos antimicrobianos a:

- Diagnóstico clínico inapropiado,
- Resistencia del patógeno bacteriano causante contra el agente antimicrobiano elegido,
- Falta de diagnóstico bacteriológico o identificación incorrecta del patógeno causante,
- Uso de criterios interpretativos incorrectos al evaluar los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas,
 - Bajo valor predictivo de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas con respecto a condiciones específicas en el sitio de infección,
 - Elección inadecuada de antimicrobianos con respecto a las propiedades farmacocinéticas y el sitio de infección,
 - Inicio tardío del beneficio malinterpretado como fracaso del tratamiento,
 - Deficiencia del sistema inmunitario del hospedador
 - Régimen de tratamiento subóptimo (inicio demasiado tarde, dosis incorrectas, vía de administración inadecuada, intervalos de dosificación demasiado largos, período de tratamiento demasiado corto),
 - Cumplimiento deficiente del propietario al administrar los agentes antimicrobianos,
 - Interacciones medicamentosas (administración combinada de diferentes antimicrobianos o coadministración de otros medicamentos),
 - Inactivación de fármacos antimicrobianos antes de su administración (por ejemplo, almacenamiento inadecuado).

Conclusión

Es importante destacar que, si bien las pruebas de sensibilidad antimicrobianas no imitan las condiciones *in vivo*, proporcionan resultados reproducibles que pueden correlacionarse con el resultado clínico, por lo cual ayudan al médico veterinario en la selección de los antimicrobianos apropiados para la implementación de la terapéutica. Teniendo esta consideración, una de las principales responsabilidades del laboratorio veterinario es seleccionar los agentes más apropiados para las pruebas y los informes de rutina.

Referencias

- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2019. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. <https://www.eucast.org/>
- Kahlmeter G, Giske CG, Kirn TJ, Sharp SE. 2019. Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations for reporting antimicrobial susceptibility results. *J Clin Microbiol.* 57:e01129-19. doi.org/10.1128/JCM.01129-19.
- Richter A, Feßler AT, Böttner A, Köper LM, Wallmann J, Schwarz S. 2020. Reasons for antimicrobial treatment failures and predictive value of in-vitro susceptibility testing in veterinary practice: An overview. *Vet Microbiol.* 245:108694. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108694.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A, Damborg P, Ferran AA, Mevius D, Pelligand L, Veldman KT, Lees P. 2017. En Route towards European Clinical Breakpoints for Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing: A Position Paper Explaining the VetCAST Approach. *Front. Microbiol.* 8:2344. doi: 10.3389/fmicb.2017.02344
- Watts JL, Sweeney MT. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria of veterinary origin. *Microbiol Spectrum* 6(2):ARBA-0001-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0001-2017

Conclusiones

La resistencia antimicrobiana (RAM) bajo el concepto de *Una Salud* compromete a la medicina veterinaria y es, según la *Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura* (FAO), uno de los grupos o sectores de interés por la influencia que tiene sobre el tema. Al esfuerzo de las organizaciones internacionales tales como la *Organización mundial de*

la Salud (OMS) y la *Organización de Sanidad animal* (OIE) que se alían para unificar conceptos, confeccionar listas de antimicrobianos que evolucionan en el tiempo según la emergencia de la RAM, proponiendo objetivos y estrategias para contenerla, se suman otros grupos de trabajo que evalúan el comportamiento de los antimicrobianos “*in vivo*” e “*in vitro*” para predecir su comportamiento y permitir prescribirlos de manera prudente y responsable. Así el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) son las dos instituciones más relevantes que ofrecen a través de sus estudios y métodos estandarizados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, herramientas de laboratorio que si bien no imitan las condiciones “*in vivo*”, proporcionan resultados reproducibles que se pueden correlacionar con el resultado clínico, y así ayudar al profesional de la salud en la selección de los antimicrobianos apropiados para la implementación de la terapéutica. En los laboratorios de medicina humana se utilizan desde hace muchos años los documentos del CLSI y EUCAST, mientras en medicina veterinaria es relativamente reciente su incorporación a la práctica. Numerosos son los estudios que se deben realizar para poder interpretar el comportamiento de una droga en animales, cuando hay diferentes especies y razas y más aún extrapolarlo a un sistema “*in vitro*”. Los avances en este campo han llevado a proponer por el CLSI estándares para medicina veterinaria y por el EUCAST a través del *Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST) documentos propios. Comprender los fundamentos de estas normas y poder llevarlas a la práctica en el laboratorio de diagnóstico veterinario de rutina es junto con otras prácticas responsables, involucrar a los médicos veterinarios en la contención de la RAM con la concepción de Una Salud.

Las autoras

Giacoboni, Gabriela Isabel

Médica Veterinaria. Bacterióloga Clínica e Industrial. Doctora en Ciencia Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Actividad docente: Curso electivo Modelos de patogenicidad bacteriana, salud pública y Una Salud Profesora Adjunta FCV-UNLP. Coordinadora y docente del Módulo Bacteriología y diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias. Miembro del Comité Científico. Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio FCV –UNLP. Coordinadora de la Comisión Científica de Resistencia a antimicrobianos de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico de Laboratorio (AAVDL). Directora y codirectora de proyectos de investigación sobre resistencia antimicrobiana en el programa de proyectos de la UNLP. Autora de numerosos trabajos publicados en revistas científicas y en eventos de ciencia y técnica en el área temática. Integrante del Banco de evaluadores del FONCyT.

Moredo, Fabiana Alicia

Doctora en Ciencias Veterinarias. Especialista en Docencia Universitaria. Médica Veterinaria egresada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). Profesora Adjunta (dedicación exclusiva) de la Cátedra de Microbiología FCV-UNLP. Profesora a cargo del Laboratorio de Bacteriología y Antimicrobianos de la FCV-UNLP. Docente de grado en los cursos Microbiología I y Coordinadora del curso Microbiología II de la Carrera Medicina Veterinaria. Directora de tesis. Directora e Integrantes de Proyectos de Investigación y Desarrollo relacionados con el estudio de la Resistencia Antimicrobiana en el marco de Una Salud. Autora de diversos trabajos científicos y disertante en reuniones científicas y de divulgación sobre esta temática. Áreas de experticia: Bacteriología veterinaria y resistencia antimicrobiana.

Pantozzi, Florencia Laura

Doctora en Ciencias Veterinarias. Bacterióloga Clínica e Industrial y Médica Veterinaria. Profesora Adjunta de Microbiología I y II, carrera de Ciencias Veterinarias. Jefe de Trabajos Prácticos de Microbiología Especial, carrera de Microbiología Clínica e Industrial. Responsable del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Antimicrobianos (FCV- UNLP). Directora y Participante de Proyectos de Investigación sobre Resistencia Antimicrobiana en veterinaria en animales de compañía y de producción para consumo humano, estudios fenotípicos y genotípicos. Autora de capítulos de libros Microbiología Veterinaria 1° y 3° Ed., 2007 y 2019 y Bacteriología Práctica para el Médico Veterinario 1° Ed., 2009. Integrante del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009-2011. Egresada Distinguida del año 2018 de la

carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Evaluadora de los proyectos PICT 2020, integrando el Banco de evaluadores del FONCyT.

Giacoboni, Gabriela Isabel

Detección de la resistencia antimicrobiana : normas y herramientas de laboratorio en medicina veterinaria / Gabriela Isabel Giacoboni ; Fabiana Alicia Moredo ; Florencia Laura Pantozzi. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2023.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-2328-8

1. Medicina Veterinaria. I. Moredo, Fabiana Alicia. II. Pantozzi, Florencia Laura. III. Título.
CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina

+54 221 644 7150

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

EduLP integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2023

ISBN 978-950-34-2328-8

© 2023 - EduLP

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA