

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editor: **Juan J. Picazo**

12.

Métodos especiales para el
estudio de la sensibilidad a
los antimicrobianos

2 0 0 0

Coordinador: **Jose A. García Rodríguez**

Rafael Cantón
J. Elías Sánchez
M^a Luisa Gomez-Lus
Luis Martínez Martínez
Carmen Rodríguez-Avial
Jordi Vila

INDICE

A. Capacidad bactericida

- A.1. Concentración mínima bactericida (CMB)
 - A.1.1. Fundamento
 - A.1.2. Método de macrodilución en tubo
 - A.1.2.1. Materiales
 - A.1.2.3. Método
 - A.1.2.3. Control de calidad
 - A.1.3. Método de microdilución en placa
 - A.1.4. Cálculo de la CMB, tolerancia y efecto paradójico

A.2 Curva de letalidad o de muerte

- A.2.1. Fundamento
- A.2.2. Indicaciones y limitaciones
- A.2.3. Materiales
- A.2.4. Método
- A.2.5. Control de calidad

A.3. Actividad bactericida del suero

- A.3.1. Fundamento
- A.2.2. Indicaciones y limitaciones
- A.2.3. Materiales
- A.2.5. Método
- A.3.5. Resultados

B. Actividad combinada de antimicrobianos

- B.1. Definiciones de interacciones entre antimicrobianos
- B.2. Técnica del tablero
 - B.2.1. Método en tubos con caldo
 - B.2.2. Método de dilución en agar
 - B.2.3. Método automatizado mediante microdilución
 - B.2.4. Interpretación de los resultados
- B.3. Técnica de curvas de letalidad
- B.4. Método de difusión

C. Detección de mecanismos de resistencia

- C.1. β -Lactamasas
 - C.1.1. Métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa
 - C.1.1.1. Método acidimétrico
 - C.1.1.2. Método yodométrico.
 - C.1.1.3. Método cromogénico
 - C.1.1.4. Control de calidad y limitaciones de los métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa
 - C.1.2. Identificación fenotípica de β -lactamasas en bacilos Gram-negativos
 - C.1.2.1. β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado: Prueba de doble difusión con discos y métodos de cribado.
 - C.1.2.2. β -lactamasas cromosómicas inducibles: Prueba de aproximación de discos.
- C.2. Mecanismos de resistencia en *Staphylococcus aureus*
 - C.2.1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
 - C.2.1.1. Estudio de la sensibilidad a la oxacilina.
 - C.2.1.2. Métodos de cribado.

C.2.1.3. Métodos directos de detección.

C.2.2. *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a la vancomicina

C.3. Mecanismos de resistencia en *Enterococcus spp.*

C.3.1. Resistencia a la ampicilina

C.3.2. Resistencia de alto nivel a los aminoglicósidos (ANRA)

C.3.2.1. Detección de ANRA en placas de cribado.

C.3.2.2. Detección de ANRA en medios líquidos (microdilución).

C.3.2.3. Detección de ANRA con discos con alto contenido en aminoglicósidos

C.3.2.4. Control de calidad y limitaciones.

C.3.3. Resistencia a los glicopéptidos

C.3.3.1. Estudio de la sensibilidad a vancomicina y teicoplanina.

C.3.3.2. Métodos de cribado.

C.3.3.3. Métodos directos de detección.

C.3.3.4. Control de calidad y limitaciones.

D. Estudios farmacodinámicos

D.1. Efecto postantibiótico (EPA)

D.1.1. Determinación del EPA "in vitro"

D.1.2. Otros modelos "in vitro" para la determinación del EPA

D.1.3. Modelos experimentales en el estudio del EPA "in vivo"

D.1.3.1. Modelo de infección en muslo de ratón:

D.1.3.2. Modelo de meningitis en conejos

D.1.3.3. Modelo de endocarditis en ratas

D.1.3.4. Otros modelos.

D.1.4. Factores que afectan al EPA

D.2. Efecto de las concentraciones subinhibitorias

D.2.1. Efectos sobre la morfología bacteriana

D.2.2. Efectos sobre el crecimiento de los microorganismos

D.2.2.1. Concentraciones subinhibitorias en microorganismos en fase de EPA.

D.2.2.2. Concentraciones subinhibitorias en microorganismos en fase logarítmica de crecimiento

D.2.3. Otros efectos de las concentraciones subinhibitorias

12. MÉTODOS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS. 2001

A. Capacidad bactericida

Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear tres métodos: el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB), la curva de letalidad y la actividad bactericida del suero. Metodológicamente, en las pruebas de poder bactericida recomendamos la utilización de técnicas de macrodilución tal y como recoge el "Manual of Clinical Microbiology" de la Sociedad Americana de Microbiología.

Indicaciones. Se emplean más en investigación que en la práctica clínica de laboratorio, donde sólo deben realizarse en determinadas circunstancias.

En terapéutica: Están indicadas para el estudio de antibióticos considerados bactericidas en:

- Infecciones graves en las que previamente se ha determinado su utilidad, como en las endocarditis estreptocócicas o por otras bacterias. Si el microorganismo no es destruido se debe asociar un aminoglicósido. En las enterocócicas la asociación es obligada. También en meningitis, osteomielitis y artritis.
- Infecciones en inmunocomprometidos, particularmente en la sepsis del neutropénico.
- Infecciones crónicas de prótesis y otras infecciones crónicas.
- Exacerbaciones pulmonares agudas en la fibrosis quística.
- Para determinar fenómenos de tolerancia en infecciones estafilocócicas que no responden a la terapia.

En investigación: Son adecuados para evaluar nuevos antimicrobianos o viejos frente a nuevos patógenos y para determinar la capacidad y poder bactericida y la presencia de efecto paradójico y tolerancia.

Limitaciones. No se dispone de técnicas normalizadas a pesar de las recientes revisiones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). En general, tiene baja reproducibilidad

debido a razones técnicas. Influyen las variables de los métodos de dilución: medios de cultivo, variaciones del medio elegido (lote, fabricante, etc.), iones, pH, inóculo (fase de crecimiento y tamaño), incubación (atmósfera, temperatura y tiempo, etc.) (tabla 1). Se debe partir de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento porque algunos antimicrobianos, como los β -lactámicos, sólo son bactericidas en este periodo. Asimismo, existen dificultades con los anaerobios de crecimiento lento y muy sensibles al oxígeno y con otros microorganismos exigentes.

El valor de la prueba debe determinarse por el éxito de su aplicación en clínica.

A.1 Concentración mínima bactericida (CMB)

A.1.1. Fundamento

Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana, con el fin de compararla con la que alcanza en una determinada localización. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo. Se parte de los mismos métodos utilizados para obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. Lo que se pretende es comprobar en los tubos o pocillos sin crecimiento qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado.

En general la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB, en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas. Habitualmente difieren en una o dos diluciones. En ocasiones esto no ocurre y estamos ante los fenómenos: paradójico, de tolerancia y de persistencia.

El **fenómeno paradójico o de Eagle** consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CMB. Parece ser que no tiene transcendencia en los tratamientos antimicrobianos.

La **tolerancia** es la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado aislamiento o especie. Su significado clínico es dudoso aunque puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con otro. Este hecho se ha comprobado en infecciones estafilocócicas que no responden al tratamiento con un antibiótico.

La **persistencia** refleja el hecho de que una pequeña población resiste a la acción bactericida. Su cuantía suele ser menor del 0,1% y por esto, la definición de CMB se refiere a la muerte del 99,9% del inóculo. Aparece sobre todo con β -lactámicos.

A.1.2. Método de macrodilución en tubo

Es el preferido porque el inóculo es mayor y se controlan mejor las variables técnicas, aunque la NCCLS recomienda la microdilución en placa.

A1.2.1. Materiales. Para su cálculo se parte de los tubos sin crecimiento de la bacteria empleada para determinar la CMI. Es decir del tubo que determina la CMI y de los posteriores en una escala doble de menor a mayor concentración de antimicrobiano. Aparte del material específico utilizado para el método del cálculo de la CMI por macrodilución en caldo y de sus variaciones para microorganismos exigentes (ver el correspondiente apartado en el Protocolo nº 11 de la SEIMC), es necesario el siguiente material:

- a). Vortex para homogeneizar el contenido de los tubos.
- b). Micropipetas de 100 μ l con puntas estériles desechables.
- c). Placas de agar sangre o del medio que precise el microorganismo.
- d). Sembradores estériles de cristal.
- e). Cámara de seguridad biológica para las bacterias que la requieran (ej. *Brucella* spp.).
- f). Jarras de anaerobios para estas bacterias con generadores e indicadores.
- g). Estufa de 35°C o incubador de CO₂ para capnófilos.

A.1.2.2. Método. Los pasos a realizar son los siguientes:

- a). Determinar la CMI y tomar los tubos sembrados sin crecimiento, no el de control de esterilidad.
- b). Agitar los tubos sin crecimiento con un Vortex u homogeneizarlos con la micropipeta aspirando o vaciando de 6 a 10 veces.
- c). Depositar 100 μ l. de cada tubo sobre el medio de cultivo elegido y extender con un sembrador. De esta forma se diluye la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutraliza su efecto y se favorece el recuento.
- d). Incubar a 35°C y leer a las 24, 48 y 72 horas
- e). Hay que recontar las colonias que han crecido, tras 24-48 horas de incubación, en las placas donde se sembró el inóculo original. Calcular qué número de colonias represente el 0,1%.
- f). Recontar las colonias crecidas en los tubos sin crecimiento.

A.1.2.3. Control de calidad. Se emplean las mismas cepas que las referidas en la técnica de cálculo de la CMI por dilución en caldo. En la tabla 2 se incluyen los valores dados por Reimer et al.

A.1.3. Método de microdilución en placa

El material, salvo el Vortex que puede ser sustituido por un agitador de placas, es idéntico al descrito anteriormente, así como el control de calidad. En cuanto al método, una vez leída la CMI se homogeneiza el contenido de los pocillos (con agitador, micropipeta o manualmente) y se siembran 100 μ l. (todo el contenido) de los pocillos donde no hay crecimiento. El resto de la técnica es idéntica a la descrita en el apartado anterior. Dada su baja rentabilidad, cuando se emplee la microdilución se hará la prueba por duplicado y si se necesita un subcultivo de 48 horas, por cuadruplicado. El NCCLS en su último documento ha recomendado agitar las placas de microtitulación a las 20 horas y sembrar 10 μ l.

A.1.4. Cálculo de la CMB, tolerancia y efecto paradójico

Se considera como CMB la menor concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9% del inóculo original, usando la fórmula $n+2 \log n$ para la determinación del punto de corte final. Esto equivale a la disminución de 3 logaritmos decimales con relación al recuento de las colonias (UFC) del inóculo inicial. Si se sigue al NCCLS, los resultados se valoran por las tablas de rechazo.

La tolerancia se define cuando la CMI y la CMB están separadas por al menos 5 diluciones dobles o cuando la CMB/CMI >32 . El efecto paradójico aparece cuando a concentraciones superiores a la CMB aumenta el número de microorganismos viables.

A.2 Curva de letalidad o de muerte

A.2.1. Fundamento

Es un método cinético de determinación del poder bactericida. Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. En este sentido es complementario de la CMB.

Consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Las concentraciones normalmente son la CMI, 2 y 4 veces la CMI y, a veces, las concentraciones que se alcanzan en suero, líquido o tejidos. Hay un control sin antibiótico. Se hace un recuento a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas habitualmente. En antibióticos muy bactericidas, puede hacerse a las 1, 2, 4, 5, y 24 horas. Los recuentos se expresan en escala semilogarítmica en el eje de las ordenadas y el tiempo en escala aritmética de las abscisas. Para facilitar la operación se puede utilizar un papel milimetrado. El poder bactericida se determina en la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado. Es imprescindible el cálculo de la CMI preferentemente por el método de dilución en caldo.

A.2.2. Indicaciones y limitaciones

Se utiliza fundamentalmente en investigación de nuevos antimicrobianos o patógenos emergentes.

En clínica puede emplearse sobre todo en las endocarditis. Con esta técnica también se pueden valorar los fenómenos de persistencia, paradójico y de tolerancia. Utilizando este método se ha comprobado que los aminoglicósidos y las quinolonas son rápidamente bactericidas y concentración dependiente.

Como limitaciones, no es una técnica normalizada, es muy laboriosa y, en general poco reproducible ya que existen numerosos factores técnicos y metodológicos (ver CMB en microdilución en caldo) que pueden condicionar los resultados.

A.2.3. Materiales

Los aparatos, materiales, reactivos y medios son los mismos que los descritos en la CMI y CMB mediante macrodilución en caldo.

A.2.4. Método

1º. Inóculo, preparación del antimicrobiano y siembra del inóculo: los descritos en la macrodilución en caldo.

2º. Recuentos: a horas predeterminadas se depositan 100 µl. o diluciones de éstas para facilitar el recuento de cada uno de los tubos en agar sangre o el medio apropiado y se extiende con un sembrador de vidrio estéril.

3º. Interpretación. Existe capacidad bactericida cuando en un tiempo determinado existe una caída del recuento de células viables de al menos 3 logaritmos decimales.

A.2.5. Control de calidad

Es el mismo que el descrito en la macrodilución en caldo (apartado A.1.2.3.).

A.3. Actividad bactericida del suero

A.3.1. Fundamento

Es uno de los pocos métodos de sensibilidad "*in vitro*" que valora las interrelaciones existentes ente el antimicrobiano, el microorganismo y el paciente. Permite estudiar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano en presencia de suero y frente al microorganismo responsable del proceso.

Consiste en determinar la dilución del suero de un paciente que toma antimicrobianos que

produce al menos una reducción de 3 log con relación al inóculo. Para su determinación puede emplearse una técnica de microdilución o de microdilución.

A.3.2. Indicaciones y limitaciones

Su utilidad más inmediata es la monitorización rápida de la terapia antimicrobiana en las indicaciones generales de las pruebas empleadas para determinar el poder bactericida.

Sus limitaciones derivan tanto de la falta de normalización como de diversos factores biológicos inherentes a la propia técnica, que pueden interferir con los resultados y con su interpretación.

Los factores condicionantes más trascendentes derivan del momento de la toma de la muestra, tamaño del inóculo que es la variable más determinante de los resultados, la fase de crecimiento, la existencia de tolerancia, el medio utilizado para las diluciones (pH, cationes...), la composición de los tubos que pueden favorecer la adherencia bacteriana, el modo de pasar el antimicrobiano desde el tubo al medio sólido, la definición del punto final, etc. (tabla 1).

A.3.3. Materiales

Es necesario el siguiente material:

- a). Tubos de recogida de suero
- b). Tubos de vidrio como los utilizados para la determinación de la CMI por microdilución en caldo
- c). Placas de microtitulación, si se emplea una técnica de microdilución.
- d). Medio adecuado para la realización del inóculo y dilución. Habitualmente caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes. Los microorganismos exigentes pueden requerir otros medios (ver el apartado correspondiente a microorganismos exigentes en este documento).
- e). Placas de los medios de cultivo sólido acordes al microorganismo.
- f). Pipeta, micropipetas y puntas estériles.

g). Vortex, agitador de placas de microdilución.

A.3.4. Método

Obtención de la muestra. Son necesarios dos sueros, uno cuando se calcule que la concentración del antibiótico es máxima (pico) y otro cuando los niveles sean mínimos (valle). Estos parámetros dependen de la farmacocinética del antimicrobiano y de la vía de administración utilizada. Habitualmente la 1ª toma se realiza tras 30-45 minutos de una infusión intravenosa ó 60 de una inoculación intramuscular ó 90 de una administración oral. La segunda inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis.

Tras la obtención de la muestra se extrae el suero y si no se utiliza inmediatamente se conserva congelado a -20°C.

Dilución. Varía según se emplee macro o microdilución:

a) Macrodilución en caldo

- Preparar una batería de tubos con 1 ml de caldo Mueller-Hinton.
- Añadir 1 ml de suero al tubo 1
- Añadir 1 ml de suero al tubo 2 y mezclar con Vortex
- Pasar 1 ml del tubo 2 al tubo 3, mezclar y repetir la operación con los siguientes tubos (generalmente se usan un total de 6) y desechar el ml tomado del último tubo.
- Se añade 1 ml de caldo Mueller-Hinton a cada uno de los tubos en los que se ha diluido el suero para que todos tengan 2 ml.
- Se preparan los tubos adicionales con 2 ml de caldo Mueller-Hinton que sirva de control de crecimiento y de esterilidad.
- Se añaden 100 µl del inóculo debajo de la superficie a cada uno de los tubos, salvo al de control de esterilidad. El inóculo es una suspensión del microorganismo aislado del paciente ajustado al 0,5 de la escala de MacFarland. Es conveniente verificar el inóculo mediante siembra en medio sólido y recuento.

b) **Microdilución.** La microdilución sigue las mismas pautas que la macrodilución siendo las diferencias fundamentales el empleo de placas de microtitulación y la necesidad de hacerlo por duplicado. Se hacen diluciones progresivas de suero de tal forma que queden por pocillo 0,05 µl a los que se añade el mismo volumen de inóculo. Es necesario incluir los mismos controles mencionados para la macrodilución. La valoración se realiza sembrando 10 µl en el medio adecuado. (Existen 2 excelentes revisiones sobre el tema, una de Griffin y otra realizada por el NCCLS).

Incubación. Se realiza 24 horas a 35°C. Las microplacas se cubren para evitar la evaporación.

Subcultivo. Se realiza en medio sólido como en el cálculo de la CMB (100 µl y extensión con sembrador en el medio adecuado).

A.3.5. Resultados:

Tras la incubación se determina el poder inhibitorio o bacteriostático del suero, definido como la máxima dilución capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Será aquella en la que desaparece la turbidez del crecimiento bacteriano.

El poder bactericida se define como aquella dilución que es capaz de destruir el 99.9% del inóculo inicial o disminuirlo al menos en 3 log 10.

Aunque no existe consenso en la interpretación de los resultados, títulos en el pico $\geq 1:32$ y en el valle $\geq 1:8$ indican un poder bactericida adecuado. Por el contrario títulos ≤ 2 en ambas tomas sugieren un poder bactericida inadecuado.

Tabla 1. Factores técnicos que influyen en las pruebas de determinación de la CMB	
Factor Variable	Efecto
Fase de crecimiento	Las bacterias supervivientes aumentan en la fase estacionaria. El efecto paradójico está aumentado al final de la fase logarítmica
Tipo de tubo o de vidrio	La adherencia al tubo depende del material y puede falsear los recuentos
Modo de incubación	La adherencia por encima del menisco puede eliminarse empleando pequeños volúmenes de inóculo, depositados por debajo del mismo y evitando la agitación.
Agitación a las 24h	Es preciso la agitación con vortex para suspender todas las células
Reincubación durante 4h y reagitación	Permite destruir las bacterias que estaban adheridas por encima del menisco, antes de la agitación de 24h.
Transporte de antibiótico (error por arrastre de antibiótico)	Conduce a un falso recuento bajo en las concentraciones altas de antibiótico
Reincubación del medio	Los estafilococos y microorganismos exigentes pueden necesitar una incubación de 48 y 72h respectivamente.
Adaptado de Schoenknecht et al.	

Tabla 2. Control de calidad de la CMB

Antimicro- biano	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		
	ATCC 25923		ATCC 25922		ATCC 27853		
	CMH	CMH-I-SH	CMH	CMH-I-SH	CMH	CMH-I-SH	CMH-I
Penicilina G	0.1*	0.2	141	70.4	>512	>512	
Amoxicilina	0.3	0.3	9.6	13.6	>512	>512	
Cloxacilina	0.3	1.2	48.6	>512	>512	>512	
Cefaclor	2.0	6.8	10.4	>64	>512	>512	
Cefazolin	0.2	1.2	2.4	7.6	>512	>512	
Cefoxitin	3.2	5.0	6.0	7.6	>512	>512	
Cefuroxima	2.4	3.6	12.8	8.4	>512	>512	
Amikacina	0.5	2.6	1.5	3.2	3.5	12	8
Gentamicina	0.1	0.7	0.5	1.6	1.4	7.2	6
Tobramicina	0.1	0.3	0.6	0.7	0.3	1.3	2.1
Doxiciclina	>8	>8	35.2	>64	>64	>64	
Cloranfenicol	>64	>64	>64	>64	>64	>64	
Colistina	>32	>32	0.1	0.2	0.1	1.8	
Polimixina B	>32	>32	0.1	0.2	0.3	3.2	
Clindamicina	0.2	0.2	>64	>64	>64	>64	
Eritromicina	16	24.8	>64	>64	>64	>64	
Lincomicina	>32	>32	>64	>64	>64	>64	
Metronidazol	>32	>32	>32	>32	>32	>32	
Rifampicina	0.5	0.8	8	>32	>32	>32	
Vancomicina	1.1	1.5	>256	>512	>512	>512	

Tomado de Reimer et al.

CMH = Caldo Mueller-Hinton; CMH-I = Caldo Mueller-Hinton iones (calcio y magnesio);

CMH-I-SH = Caldo Mueller-Hinton con iones y suero humano.

* µg/ml

B. ACTIVIDAD COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS

La combinación de antimicrobianos se utiliza principalmente con pacientes que sufren infecciones graves y que pueden llegar a desarrollar una septicemia. También se utiliza de forma menos frecuente cuando un microorganismo es resistente a un antimicrobiano pero se muestra sensible en asociación con otro. En los dos casos, lo que se consigue es disminuir la probabilidad de aparición de subpoblaciones que sean resistentes a todos los antimicrobianos administrados.

Sin embargo, la administración de dos o más antimicrobianos puede producir varios efectos en la actividad combinada, por lo que es necesario estudiar previamente dichos efectos en el laboratorio.

B.1. Definiciones de Interacciones entre antimicrobianos

Los efectos en la actividad combinada de dos antimicrobianos pueden ser los siguientes:

- **indiferencia:** la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario.
- **adición:** la actividad de los dos antimicrobianos es la aproximadamente la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.
- **sinergismo:** la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adición de las actividades de los dos antimicrobianos separados.
- **antagonismo:** la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Según lo anterior, se han desarrollado varias técnicas "in vitro" que de forma fácil pueden mostrar las interacciones de dos o más antimicrobianos.

B.2. Técnica del tablero

Esta técnica es una de las más empleadas en el estudio de la actividad combinada, ya que es fácil de llevar a cabo y sus resultados no necesitan

operaciones matemáticas complicadas. Su nombre se refiere a que los tubos o pocillos que se utilizan forman un tablero (como el ajedrez) donde hay múltiples diluciones de los antimicrobianos en concentraciones superiores o inferiores a la CMI de cada uno de ellos frente al microorganismo a estudiar. Los pasos a desarrollar son los siguientes:

- en el eje X se colocan las diluciones del antimicrobiano A en las siguientes concentraciones : 0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1 y 2 veces la CMI. Estas diluciones pueden incrementarse si se considera necesario o existe la posibilidad de que exista antagonismo.
- en el eje Y se colocan las mismas diluciones para el antimicrobiano B, de forma que la primera casilla es la correspondiente a 0 x CMI de los dos antimicrobianos.

De esta manera quedan representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones de los dos antimicrobianos, además de un control (primera casilla).

A continuación se pueden utilizar varias técnicas para realizar las distintas diluciones de los dos antimicrobianos.

B.2.1. Método en tubos con caldo

Cada casilla queda representada por un tubo con un volumen final de 1 ml. A continuación se describe los siguientes pasos:

- de este 1 ml, 0,25 se añadirán con la concentración del antimicrobiano A y 0,25 con la del B para esa casilla, siendo los restantes 0,5 ml la concentración del inóculo. De esta forma, los 0,25 del antimicrobiano A y los del B deben de obtenerse de un stock en el que se ha multiplicado por 4 la concentración de la casilla. Así, para una CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$ del antimicrobiano A, en las casillas con concentraciones de 2 x CMI se añadirán 0,25 ml de un stock de 8 $\mu\text{g/ml}$.
- a cada casilla se le añaden 0,5 ml con el inóculo. Éste debe ser el mismo que se suele emplear para la determinación de la CMI (10^5

UFC/ml). Para ello debemos preparar un matraz con una concentración de 2×10^5 UFC/ml, ya que al añadirlo en el tubo se diluirá a la mitad con los 0,5 ml de caldo con antimicrobiano del punto anterior.

- a continuación se incuba a 35-37° C durante 16-20 horas

B.2.2. Método de dilución en agar

En este método, cada casilla queda representada por una placa de agar. Para el estudio de una gran cantidad de cepas es más conveniente utilizar este método. Para ello, realizamos lo siguiente:

- tras preparar dos grandes recipientes con agar (habitualmente M-H) y autoclavarlo, se dejan enfriar hasta los 50-55° C, tras lo cual se les añade a cada uno de ellos un antimicrobiano (A o B) en las concentraciones necesarias.
- mezclando cantidades de los dos agares que contienen cada antimicrobiano se obtienen placas con las concentraciones que marcan las casillas del tablero.
- tras enfriarse el agar y cuidando que su superficie esté seca, se inoculan con las distintas cepas de microorganismos mediante un replicador, con un inóculo de aproximadamente 10^4 UFC/ml.
- a continuación, las placas se incuban a 35-37° C durante 16-20 horas.

B.2.3. Método automatizado mediante microdilución

Al igual que en el estudio de la CMI, existen hoy en día equipos automatizados con los cuales se pueden conseguir las concentraciones necesarias de antimicrobianos y microorganismos. El empleo de placas de plástico con pocillos en los cuales se depositan pequeños volúmenes (100 o 200 μ l) puede sustituir aquí a los tubos y placas de agar. Si además las diluciones se realizan de forma automatizada, se ahorra tiempo y se puede realizar el ensayo con muchas más muestras.

B.2.4. Interpretación de los resultados

Tras el periodo de incubación, los resultados en las distintas técnicas se pasan al tablero, colocando en cada casilla si ha habido crecimiento visible o no. Posteriormente, estos resultados se pueden transferir a una gráfica en la que de forma aritmética se representen estos datos para una mejor comprensión de los efectos.

En muchos casos, los estudios de asociaciones de antimicrobianos incluyen un índice de **Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF)**. Este índice se calcula de la siguiente manera: para el antimicrobiano A se divide la concentración de ese compuesto necesaria para inhibir el crecimiento en una fila o columna por la CMI de ese antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Del mismo modo, se calcula el CIF del antimicrobiano B, sumándose luego los dos y obteniéndose el CIF conjunto. La fórmula es la siguiente:

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

En vez de calcular todas las series de CIF para todas las columnas o filas, se suele calcular para concentraciones igualmente efectivas de los dos antimicrobianos ensayados. Según los valores de CIF obtenidos, se considera:

- si CIF < 0,5 hay sinergismo
- si CIF = 1 hay adición
- si CIF entre 2 ó 4 se suele considerar antagonismo, dependiendo de la literatura.

B.3. Técnica de curvas de letalidad

Mediante este método se estudian más los efectos bactericidas en el tiempo que las concentraciones inhibitorias de los dos antimicrobianos. Se trata de realizar curvas de letalidad para los dos antimicrobianos más una tercera en la que se añaden concentraciones de los dos al mismo matraz. El mayor inconveniente es que solamente se pueden ensayar en el mismo estudio unas pocas combinaciones de los dos

antimicrobianos, debido a la laboriosidad del recuento de microorganismos. El método es el siguiente:

- a tres matraces con medio fresco (el requerido para el microorganismo o M-H en general), se le añade el inóculo en fase de crecimiento logarítmico. La concentración de microorganismos suele estar entre 10^5 - 10^8 UFC/ml, y su calibración se puede llevar a cabo utilizando la escala de MacFarland de 0,5, al igual que en los estudios de curvas de letalidad de capítulos anteriores.
- a los primeros dos matraces se les añade el antimicrobiano A y B respectivamente en concentraciones que sean conseguidas fácilmente en lugares de infección.
- al tercer matraz se le añade una combinación de los dos antimicrobianos que también sea conseguida in vivo fácilmente.
- al igual que en las curvas de letalidad, se hacen recuentos en placa durante un periodo de tiempo de entre 16-24 h, llevándose los resultados a una gráfica de letalidad frente al tiempo.

Los resultados de efectividad de la asociación se obtienen observando la curva de letalidad de los dos antimicrobianos separados y juntos. Los tres tipos de actividad de la asociación son los siguientes:

- sinergia: si hay un aumento de letalidad de más de 10^2 UFC/ml a las 24 h en la curva de la asociación frente a la del antimicrobiano más activo en solitario.
- antagonismo: si hay un aumento en el crecimiento de más de 10^2 UFC/ml a las 24h en la curva de la asociación frente a la del antimicrobiano más activo en solitario.
- adición o indiferencia: si entre la curva del antimicrobiano más activo y la de la asociación no hay una diferencia de letalidad mayor de 10 veces a las 24 h.

Algunos autores han propuesto otras técnicas de análisis de resultados basándose en métodos

estadísticos, ya que son más fiables en determinados casos.

B.4. Método de difusión

Esta técnica tiene la ventaja de no tener que utilizar las grandes cantidades de tubos o pocillos que se emplean en los otros métodos anteriores. Se basa en la misma técnica que el antibiograma en placa: la colocación de discos o tiras de papel absorbente con concentraciones conocidas de antimicrobianos.

Se lleva a cabo de la siguiente forma:

- en una placa con agar Mueller-Hinton (u otro requerido para el microorganismo que se ensaya) se siembra el inóculo en superficie, al igual que en la técnica de susceptibilidad en placas de agar.
- a continuación, se colocan dos discos con concentraciones conocidas estándar de los dos antimicrobianos a estudiar. La distancia entre los discos debe ser igual o ligeramente superior a la del radio de la zona de inhibición de los antimicrobianos cuando se examinan por separado.
- se incuba la placa a 35-37° C durante 16-18 h, tras lo cual se observan los resultados.

El sinergismo se observa como una zona de inhibición que une los halos de los dos antimicrobianos, mientras que en el antagonismo esta zona de unión aparece con crecimiento visible incluso en las zonas de inhibición de los dos antimicrobianos.

Esta técnica puede ser modificada utilizando tiras o discos de papel absorbente a los que se les añade las concentraciones que queremos ensayar, con lo cual se puede ampliar el estudio a diversas combinaciones de los dos antimicrobianos.

C. Detección de mecanismos de resistencia

C.1. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas producidas por microorganismos capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos β -lactámicos dando

lugar a compuestos sin actividad antibacteriana.

En ocasiones, es necesario conocer, incluso antes del resultado de las pruebas de sensibilidad, si un aislamiento produce este tipo de enzimas. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos rápidos de detección de β -lactamasas que, con una información preliminar, contribuyen a una correcta elección del antimicrobiano. Asimismo, y aunque son más de cuatrocientas las enzimas caracterizadas y muy diversos los perfiles de sustrato que determinan, existen ejemplos, sobre todo en microorganismos Gram-negativos, en los que la síntesis de estas enzimas se asocian a patrones fenotípicos de sensibilidad y resistencia constantes.

C.1.1. Métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa

Este tipo de pruebas es útil en *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Saphylococcus aureus* e incluso en *Enterococcus* spp. (Tabla 3). En ellos es posible definir la resistencia a determinados β -lactámicos cuando el resultado es positivo. En otros microorganismos, *Enterobacteriaceae* o *Pseudomonas aeruginosa*, no deben emplearse, ya que la posible producción simultánea de diversas enzimas impide relacionar el resultado positivo con la resistencia a un determinado antibiótico o grupo de antibióticos.

La mayoría de los métodos rápidos se basan en la detección del producto resultante de la hidrólisis del anillo β -lactámico por el enzima. Los más difundidos son: a) El **método acidimétrico** que detecta ácido peniciloico después de la hidrólisis de la penicilina y su presencia se pone de manifiesto mediante un indicador de pH; b) El **método yodométrico** que utiliza yodo-yoduro potásico que reacciona con el ácido peniciloico, impidiendo que se forme el complejo iodo-almidón de intenso color azul; y c) El **método** más difundido, el **cromogénico**, que detecta la presencia de β -lactamasa al hidrolizarse una cefalosporina cromogénica (nitrocefín o PADAC). El color inicial del nitrocefín no hidrolizado, amarillo-

naranja, cambia al rojo intenso al hidrolizarse. Existen discos y tiras comerciales con nitrocefín que permiten en pocos segundos demostrar la producción de β -lactamasa. En todos los casos deben utilizarse cepas control.

C1.1.1. Método acidimétrico. Puede realizarse en medio líquido o empleando discos o tiras de papel, generalmente comerciales. En el primer caso se emplean tubos estériles o placas de microtitulación con 0,1 ml de una solución de penicilina G (1 millón de U/ml) pH 8,5 y rojo de fenol (0,5%). Esta solución puede prepararse añadiendo 2 ml de rojo fenol 5%, 16.6 ml de agua destilada y 1,2 g de penicilina G (1 vial de 20 millones de U). El pH se ajustará con sosa 1N. Los tubos una vez preparados pueden conservarse a -20°C durante 6 meses.

El cambio de color violeta de esta solución al amarillo antes de 15 minutos, después hacer una suspensión con 4-5 colonias de un cultivo puro de una bacteria, indicará la producción de β -lactamasa. La ausencia de cambio de color durante estos 15 minutos se considerará como negativo para la producción de esta enzima. Los cambios de color a partir de los 15 minutos pueden ser inespecíficos o producidos por el propio deterioro del reactivo. No obstante, algunas cepas de estafilococo, generalmente sin inducción previa, pueden requerir más de 15 minutos para demostrar su capacidad de producción de β -lactamasa. No debe añadirse cultivos líquidos sobre la solución de penicilina puesto que puede modificarse el pH y variar el resultado de la prueba.

Los sistemas acidométricos comerciales suelen utilizar discos o tiras de papel impregnados con una solución alcalina (1,25 mmol/litro NaOH) de penicilina G (125 $\mu\text{g/ml}$) y 0,1% de azul de bromocresol. Una vez desecadas pueden conservarse a 4°C hasta 6 meses. Antes de utilizarse deben rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada, pudiendo para ello colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de petri. La aparición de un color amarillo antes de 5 minutos después de colocar 2-3

colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos o tiras rehidratados indicará la presencia de β -lactamasa. Al igual que en el caso anterior, no deben utilizarse cultivos líquidos.

C1.1.2. Método yodométrico. El método yodométrico utiliza bencilpenicilina como sustrato, aunque también se ha descrito con alguna cefalosporina. En presencia de β -lactamasa se produce ácido peniciloico o cefalosporánico. Disminuye el pH del medio y se reduce el yodo de la mezcla yodo-almidón desapareciendo el intenso color azulado de este complejo. En ausencia de β -lactamasa no se decolora la mezcla yodo-almidón.

Es menos sensible y específico que los otros dos métodos y por ello es menos empleado. Puede realizarse en tubo o con tiras de papel. En tubo, se parte de alícuotas de 0,1 ml de una solución de penicilina G (6 mg/ml) disuelta en tampón fosfato 0,1 M pH 6,0. Los tubos se inoculan con las colonias del cultivo a estudiar hasta obtener una turbidez aproximada de 10^9 UFC/ml. Posteriormente, se añaden 20-25 μ l de una solución de almidón al 1%, se mantiene 30-60 minutos a temperatura ambiente y se añade 20-25 μ l de una solución de yodo (2%)-yoduro potásico (53%). La mezcla se agita durante 1 minuto y debe decolorarse en menos de 10 minutos si el microorganismo produce β -lactamasa.

También se utilizan discos o tiras de papel desecados. Están impregnados con una solución de almidón (0,2%) y penicilina G (1%) que se rehidratan con una solución de yodo (2%)-yoduro potásico (53%). Tras depositar sobre su superficie unas colonias, se observará como con los tubos el cambio de color.

El método yodométrico tampoco debe realizarse a partir de medios líquidos. Pueden existir falsos positivos por reducción del yodo.

C1.1.3. Método cromogénico. A diferencia del acidimétrico y yodométrico, el método cromogénico es altamente específico, aunque está limitado por la capacidad de hidrólisis que ejerza la β -lactamasa sobre la cefalosporina cromogénica que

se emplee. La más utilizada es el nitrocefín ya que en pocos segundos puede obtenerse un resultado positivo. Habitualmente se comercializa en forma de discos. Estos, deben colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de petri y rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada. La aparición de un color rojo intenso en 1-2 minutos después de colocar 2-3 colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos indicará la presencia de β -lactamasa.

En ocasiones se emplea una solución de nitrocefín 0,5 mM que se prepara disolviendo 2,58 mg de nitrocefín en 9,5 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 y 0,5 ml de dimetilsulfóxido. La prueba suele realizarse emulsionando las colonias del microorganismo a estudiar en 20 μ l tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 depositados sobre un portaobjetos o placa de petri. Después se añaden 20 μ l de la solución de nitrocefín. La aparición de un color rojo intenso en 1-2 minutos indicará la presencia de β -lactamasa. Algunas enzimas como ROB-1 de *H. influenzae*, determinadas carbapenemasas de *Aeromonas* spp. y algunas β -lactamasas de espectro ampliado y de estafilococos sólo consiguen cambios lentos y tenues del color amarillo inicial de la solución de nitrocefín. Asimismo, en ocasiones algunas PBP pueden tener cierta acción " β -lactamasa" sobre el nitrocefín e inducir cambios de color después de 10 minutos.

El método del nitrocefín es el sistema más empleado para detectar la producción de β -lactamasa. Se han desarrollado diversas modificaciones entre las que destacan:

- incubar previamente la suspensión del microorganismo con soluciones 0,1 mM de antibióticos o inhibidores de β -lactamasa. Se utiliza, en el supuesto caso de que exista una sola β -lactamasa, para conocer de manera preliminar el perfil de sustrato.
- dispensar directamente sobre las colonias de un cultivo unas gotas de la solución del nitrocefín o colocar sobre la superficie de una placa con crecimiento un papel impregnado

con nitrocefín. Se emplea para poder detectar subpoblaciones que no produzcan β -lactamasa.

- detectar la posible inducción del enzima al comparar los tiempos que tardan en cambiar de color dos solución de nitrocefín cuando se añade una suspensión del microorganismo expuesto a la acción de un β -lactámico y otra sin exponer.

El compuesto PADAC (piridina 2-azo-p-dimetil-alinina cromóforo) es otra cefalosporina cromogénica que también se utiliza para la detección rápida de la producción de β -lactamasa. Es peor sustrato que el nitrocefín y por ello, menos sensible. Se emplea en solución (250 μ g/ml en tampón fosfato 50 mM pH 7.0) o en discos o tiras de la misma manera que el nitrocefín.

C.1.1.4. Control de calidad y limitaciones de los métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa. La Sociedad Americana de Microbiología a través de sus procedimientos recomienda la utilización de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo y la cepa de *H. influenzae* ATCC 10211 como control negativo.

Algunas de las **limitaciones** ya han sido comentadas para cada método. En general, estas pruebas sólo indican la producción del enzima, no son cuantitativas y no sirven para saber el tipo de enzima que se produce. Para este último punto es más ilustrativa la información que se obtiene del propio antibiograma (fenotipo de sensibilidad). Asimismo, la mayoría de los métodos emplean penicilina por lo que no es muy sensible cuando el microorganismo a estudiar produce una β -lactamasa con baja afinidad o tasa de hidrólisis con este sustrato (por ejemplo las β -lactamasas de clase C o cefalosporinas).

Por otra parte, el resultado positivo indica que la cepa es resistente al antibiótico para el cual es útil la prueba pero no excluye, en caso de ser negativo, que pueda existir otro mecanismo de resistencia y por lo tanto que pueda emplearse dicho antibiótico. Como

ejemplo ilustrativo tendríamos los aislamientos de *H. influenzae* resistentes a ampicilina no productores de β -lactamasa y que deben su resistencia a la presencia de PBPs modificadas.

C.1.2. Identificación fenotípica de β -lactamasas en bacilos Gram-negativos

El antibiograma por difusión con discos (Protocolo nº 11 de la SEIMC) puede ser utilizado como una herramienta útil y sencilla en la identificación fenotípica y detección de β -lactamasas en algunos microorganismos. Ejemplos de ello son las β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado (β IPEA) (prueba de doble difusión) y las cromosómicas inducibles de clase 1 (prueba de aproximación de discos).

C.1.2.1. β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado. Prueba de doble difusión con discos y métodos de cribado. Las β IPEA se describieron por vez primera en Alemania en el año 1983 y en España en el año 1988. Se han encontrado en *Enterobacteriaceae*, fundamentalmente en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y excepcionalmente en *P. aeruginosa*. Derivan por mutaciones puntuales en el centro activo del enzima de otras β -lactamasas plasmídicas clásicas, TEM-1, TEM-2 y SHV-1, que modifican el perfil de sustrato y amplían el perfil hidrolítico de sus predecesoras. Se produce la hidrólisis de los β -lactámicos de amplio espectro, cefalosporinas de tercera (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y monobactámicos (aztreonam). Por el contrario no se afectan los carbapenems (imipenem y meropenem) y las cefamicinas (cefoxitina).

Las β IPEA son inhibidas por el ácido clavulánico y resto de los inhibidores de β -lactamasa (sulbactam y tazobactam), característica que fue aprovechada en 1988 por Jarlier et al en la prueba de doble difusión con discos para la detección de estas enzimas. Este método consiste en la realización de un antibiograma convencional situando un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g) a una

distancia aproximada de 30 mm de discos con carga estándar (30 µg) de cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. La ampliación del halo de inhibición de estos últimos en las proximidades del disco de amoxicilina/ácido clavulánico indica la presencia de una βIPEA (Figura1).



Figura 1. Prueba de doble difusión con discos. Ampliación de los halos de inhibición de la cefotaxima, ceftazidima y el aztreonam debido a la inhibición de la β-lactamasa plasmídica de espectro ampliado por la acción del ácido clavulánico contenido en el disco de amoxicilina/ácido clavulánico (en el centro del antibiograma).

El NCCLS (NCCLS, 2000) recomienda un método de cribado en todos aquellos aislamientos de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* que presenten valores de CMI de cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima o cualquier otra cefalosporina de tercera o cuarta generación o aztreonam superiores a los habituales (>1 µg/ml). Establece inicialmente la utilización de placas de Mueller-Hinton agar ajustado con cationes que contengan 1 µg/ml de cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona. Las colonias que crezcan en estas placas deberán someterse a confirmación posterior de la presencia de βIPEA. Asimismo, recomienda el estudio cuantitativo de los valores de CMI de cefotaxima o ceftazidima en presencia y ausencia de 4 µg/ml de ácido clavulánico (prueba de confirmación fenotípica). La disminución en 3 o más diluciones cuando se añade el ácido clavulánico sería compatible con la producción de estas enzimas. En ambos casos el NCCLS

recomienda la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 como cepa de control. Aunque no se pronuncia para *Salmonella* spp. y *Proteus mirabilis*, estas recomendaciones serían igualmente válidas en estas dos especies. Por el contrario estarían limitadas en otras enterobacterias, sobre todo las que producen β-lactamasas cromosómicas de tipo AmpC (ver limitaciones detalladas a continuación).

Los métodos de detección de βIPEA por doble difusión con discos y sistemas de cribado tienen algunas limitaciones, entre las que destacan:

- Determinadas enzimas cromosómicas, como la cefuroximasas de *P. vulgaris* y la K1 de *Klebsiella oxytoca*, y la hiperproducción de la β-lactamasa plasmídica SHV-1 en *E. coli* y *K. pneumoniae* producen sinergia entre alguno de los discos de las cefalosporinas o el aztreonam y el ácido clavulánico. Asimismo, en *Stenotrophomonas maltophilia* puede observarse sinergia entre el ácido clavulánico y la ceftazidima o el aztreonam, ofreciendo falsas imágenes compatibles con la presencia de una βIPEA.
- La codificación simultánea de la βIPEA en un aislamiento con una β-lactamasas plasmídica clásica, TEM-1, TEM-2 y SHV-2, puede disminuir el efecto sinérgico. Asimismo, la presencia de estas enzimas en aislamientos de *Enterobacteriaceae* con hiperproducción de β-lactamasa cromosómica de clase I (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Morganella*) puede anular el efecto sinérgico esperado. En este caso es necesario recurrir a las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima), menos afectadas por la β-lactamasa cromosómica hiperproducida, para observar la sinergia. La presencia de promotores eficaces, duplicación de genes o cualquier mecanismo que aumente la cantidad del enzima y su presencia en mutantes de permeabilidad puede disminuir el efecto sinérgico. La reducción de la distancia entre los discos de 30 mm a 20-25 mm en la prueba de doble difusión incremental, en estos casos, la posibilidad de observar un efecto

sinérgico.

- La hiperproducción constitutiva de AmpC en *E. coli* puede elevar los valores de CMI de ceftazidima por encima de 1 µg/ml, por lo que no sería útil en este caso las placas de cribado con este antibiótico.
- Determinadas mutaciones en el centro activo del enzima pueden ocasionar baja eficiencia hidrolítica de alguna de las cefalosporinas de tercera generación o del aztreonam. Los halos de inhibición para estos antibióticos son cercanos a los observados en los aislamientos sensibles y es difícil apreciar la sinergia. La utilización de un disco de cefuroxima o cefpodoxima, cefalosporinas generalmente más lábiles a estas enzimas, puede contribuir a una mejor detección de la β IPEA.

Existen otros sistemas de detección de β IPEA que también aprovechan la sinergia que se produce entre las cefalosporinas de tercera generación o el aztreonam y los inhibidores de β -lactamasas. Así, la ampliación de los halos de inhibición cuando se añade sobre discos de estos antibióticos, una vez dispuestos sobre la superficie del agar, una solución de inhibidor de β -lactamasa (generalmente ácido clavulánico, 5 ó 10 mg). También puede realizarse interponiendo el inhibidor en el agar (5-10 µg). Estos sistemas tienen el inconveniente de la necesidad de disponer de soluciones de inhibidores, en general poco estables y que requieren una conservación a – 70 °C. Otra variante es superponer el disco de amoxicilina/clavulánico al de la cefalosporina de tercera generación.

El sistema alternativo a la prueba de doble difusión con discos que mayor utilidad tiene, por su sencillez y fácil realización es la prueba del E-test para detección de β IPEA. Consiste en una tira de E-test que en un extremo presenta un gradiente de concentraciones de ceftazidima de 0,5 a 32 µg/ml y en el otro extremo un gradiente de ceftazidima de 0,125 a 8 µg/ml y ácido clavulánico a una

concentración fija de 4 µg. La diferencia de los tamaños de las elipses de inhibición (valor de la CMI) está en relación con la presencia de la posible β IPEA (Figura 2). Este método tiene como limitaciones la presencia de β IPEA que no afectan sustancialmente a la ceftazidima (generalmente las denominadas CTX-M). En este caso se puede utilizar las tiras de cefotaxima y cefotaxima con ácido clavulánico, recientemente comercializadas.

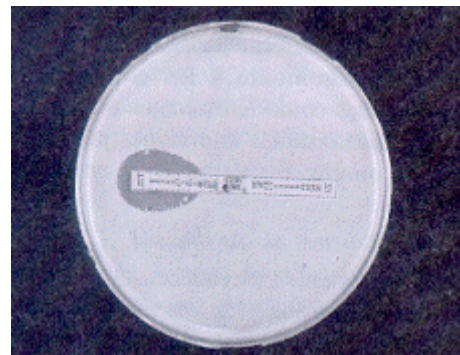
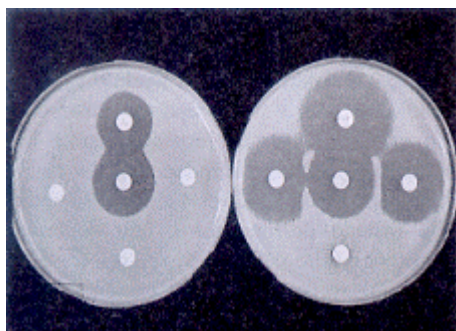


Figura 2. Detección de β -lactamasas plasmídicas de espectro ampliado con la técnica del E-Test.

C.1.2.2. β -lactamasas cromosómicas inducibles. Prueba de aproximación de discos. El carácter inducible de la expresión enzimática es característico de un gran número de β -lactamasas cromosómicas. Destacan las de clase C del grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (AmpC) presentes en *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* y *Proteus rettgeri* y las de clase A del grupo 2e descritas en *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* y *Citrobacter diversus*. Estas enzimas tienen la particularidad de expresarse habitualmente a niveles bajos (estado inducible) e incrementar su síntesis en presencia de determinados antibióticos β -lactámicos (fenómeno de inducción). La expresión permanente de niveles elevados de enzima (estado desreprimido), que determina resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, se produce por mutaciones en los genes reguladores. Estas mutantes pueden seleccionarse durante el tratamiento con determinados antibióticos β -lactámicos.

La presencia de estas β -lactamasas, al menos en su estado inducible, puede detectarse con una prueba de aproximación con discos. Fue descrita por Sanders en 1979. Se realiza un antibiograma convencional (Protocolo nº 11 de la SEIMC) y se coloca un disco de cefoxitina u otro antibiótico inductor (Tabla 4) en las proximidades de un disco de cefamandol, cefuroxima o cefotaxima (antibiótico testigo). El microorganismo producirá una β -lactamasa inducible si se observa un halo de



inhibición truncado del antibiótico testigo en la zona adyacente del disco del antibiótico inductor (Figura 3).

Figura 3. Prueba de aproximación de discos: Efecto inductor del imipenem (en el centro del antibiograma), objetivado por el achatamiento de los halos de inhibición de la ticarcilina, cefotaxima y ceftazidima, en un aislamiento de *Enterobacter cloacae* productor de β -lactamasa cromosómica AmpC en su estado inducible (izquierda de la figura) y su correspondiente mutante establemente desreprimido (derecha de la figura).

No se recomienda aplicar de rutina esta prueba, ya que estas β -lactamasas inducibles se asocian con determinadas especies de microorganismos. En general, es suficiente con realizar una identificación correcta (género y especie) para predecir el posible desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

C.2. Mecanismos de resistencia en *Staphylococcus aureus*

S.aureus ha sabido adaptarse con extraordinario éxito a las circunstancias adversas creadas por los antimicrobianos. Los procesos de

adaptación más espectaculares lo constituyen los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, en particular el de la **resistencia a la meticilina**. Recientemente, se han descrito aislamientos con **sensibilidad disminuida a los glicopéptidos**, considerados como fármacos de elección en el tratamiento de las infecciones producidas por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM).

La importante trascendencia clínica de este microorganismo y de sus mecanismos de resistencia hace imprescindible la puesta a punto de técnicas adecuadas de detección e identificación en el laboratorio que faciliten la implantación de medidas de control epidemiológico que impidan su diseminación.

C.2.1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

La infección producida por SARM constituye un grave problema por la limitación de las opciones terapéuticas que conlleva. La naturaleza heterogénea de la expresión del gen *mecA*, determinante genético responsable de la producción de la PBP2a que condiciona la resistencia a la meticilina, implica que la mayoría de los métodos descritos para su detección recurran a modificar las condiciones del cultivo para facilitar la expresión de este mecanismo de resistencia. Se reduce la temperatura de incubación de 37°C a 30-35°C, se aporta CINa a los medios de cultivo o se prolonga de 18 a 24h los tiempos de incubación.

Casi todas las técnicas se aplican a colonias de *S. aureus* previamente aisladas de cultivos convencionales y sólo unos pocos plantean la detección e identificación directa a partir de las muestras obtenidas a los pacientes. En ambas situaciones se utiliza, por su mejor estabilidad, la oxacilina aunque algunos métodos emplean directamente la meticilina. No se recomienda utilizar otros β -lactámicos ya que en ocasiones pueden aparecer, a pesar de presentar el gen *mecA*, como falsamente sensibles a estos antibióticos.

Los métodos de estudio de la resistencia de *S. aureus* a la meticilina pueden clasificarse en: a) técnicas de estudio de la sensibilidad, b) métodos de cribado y c) sistemas de detección directa a partir de las muestras del paciente.

C.2.1.1. Estudio de la sensibilidad a la oxacilina. La técnica de difusión emplea el mismo método que el descrito en el protocolo nº 11 de la SEIMC. Los discos de oxacilina son de 1 µg y deben conservarse congelados hasta su utilización para evitar la inactivación del antibiótico. La adición de NaCl (2%) al medio de cultivo (Mueller-Hinton) o la prolongación de la incubación a 48 h, incrementa la sensibilidad de la técnica pero reduce su especificidad.

Las técnicas de **dilución en agar** y **microdilución** tienen una sensibilidad superior al 95%. En ambos casos se recomienda añadir un 2% de NaCl al medio (Mueller-Hinton) y completar 24 h a 30-35°C el periodo de incubación. Además en la microdilución debe ajustarse la concentración de cationes del medio. El inóculo se prepara a partir una suspensión de colonias obtenidas de un cultivo en placa de 18 h y debe ser el habitual para cada una de estas técnicas (10^4 UFC/depósito y 5×10^5 UFC/ml, respectivamente).

La técnica de **E-test** tiene una buena reproducibilidad. Al igual que con la técnica de difusión se recomienda suplementar el medio de Mueller-Hinton con un 2% de NaCl y realizar la lectura del valor de la CMI a las 24h de incubación a 30-35°C.

Los criterios de sensibilidad y resistencia del NCCLS y del grupo español del antibiograma (MENSURA, Mesa Española de normalización de la susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos) son similares y quedan reflejados en la tabla 5. En aquellos casos en los que existan dudas en la interpretación de los resultados, bien por el crecimiento de colonias en el interior de los halos de inhibición, por el crecimiento en velo en las técnicas de dilución o por la dificultad para establecer el valor

de la CMI, debe recurrirse a la confirmación del resultado mediante la utilización de placas selectivas de oxacilina (apartado C.2.1.2).

Los criterios de sensibilidad utilizados para los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa son diferentes que los recomendados para *S. aureus*. Esto es debido a la demostración de la presencia del determinante *mecA* en la mayoría de los aislamientos que presentan valores de CMI de oxacilina entre 0,5 y 1 µg/ml además de los que tienen valores iguales o superiores a 2 µg/ml. En la actualidad se consideran resistentes a la meticilina todos aquellos aislamientos con valores de CMI de oxacilina iguales o superiores a 0,25 µg/ml.

C.2.1.2. Métodos de cribado. Se utilizan cuando se estudia un gran número de aislamientos o cuando se pretende confirmar resultados dudosos de sensibilidad. El método más utilizado, y recomendado por el NCCLS, emplea placas de Mueller-Hinton agar suplementado con oxacilina (6 µg/ml) y NaCl (4%). Las placas se inoculan en botón con un multi-inoculador con 10^4 UFC/depósito o en estría con una torunda impregnada en una suspensión del aislamiento de *S. aureus* con una turbidez del 0,5 de McFarland. Las placas deben incubarse a 30-35°C durante 24h. La sensibilidad de este método es del 100%. Se detectan tanto los aislamientos con resistencia homogénea (CMI de oxacilina, >16 µg/ml) como los que presentan resistencia heterogénea (CMI de oxacilina 1-16 µg/ml) ya que la presencia de una sola colonia en el depósito o estría es indicativo de resistencia a la meticilina.

En ocasiones se ha recomendado el empleo de meticilina (10 µg/ml) en las placas, si bien su estabilidad es menor a la de la oxacilina por lo que actualmente no se utilizan. Las placas con oxacilina pueden encontrarse comercializadas.

C.2.1.3. Métodos directos de detección. El método más sencillo utiliza el clásico medio selectivo y diferencial de Chapman que contiene manitol (1%) y NaCl (7,5%) y al que se le añade 6 µg/ml de oxacilina. Las cepas de SARM se desarrollan como

colonias amarillas, mientras que las sensibles a la meticilina no crecerán. La sensibilidad de este método también varía con la temperatura y el tiempo de incubación. Su especificidad es menor en muestras contaminadas con flora normal que contengan estafilococos coagulasa negativa (S.C.N.) que fermenten el manitol, esencialmente *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus intermedius*, y sean resistentes a la meticilina. Por ello, las colonias que crezcan en este medio deben identificarse y posteriormente estudiar su sensibilidad. Asimismo, se han descrito métodos directos de detección que consiste en la inoculación directa de las muestras de los pacientes por medio de torundas en tubos con manitol-sal y cloxacilina (6%) y una base de agar blando. Este sistema tiene una alta especificidad y podría utilizarse, tras la lectura a las 24 horas, como método de cribado.

C.2.1.4. Control de calidad y limitaciones de los métodos de detección y cribado de aislamientos de SARM. En la tabla 5 se recogen las cepas para el control de calidad, los valores límites cuando se emplean para el estudio de la sensibilidad a la oxacilina y su resultado en las placas de cribado.

La limitación más importante de estos métodos reside en la existencia de aislamientos de *S. aureus* con otros mecanismos de resistencia, diferentes de la producción de la PBP2a, que afectan la sensibilidad de la oxacilina. Estos aislamientos, denominados de “sensibilidad límite”, “borderline”, o de resistencia de bajo nivel se caracterizan por presentar CMI de oxacilina de 1 a 8 µg/ml. Deben estos valores a la hiperproducción de penicilinasas o a la producción de PBP modificadas, diferentes de la PBP2a, (aislamientos MOD-SA). Es infrecuente que los primeros crezcan en las placas selectivas con 6 µg/ml, mientras que los MOD-SA suelen hacerlo. Un aspecto que puede ayudar a diferenciar los aislamientos con sensibilidad límite de los SARM es que estos últimos suelen ser resistentes a otros antimicrobianos, -aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol, etc,- mientras que los de

sensibilidad límite no (Tabla 6). Además, los hiperproductores pueden también diferenciarse con un antibiograma en el que se coloca en paralelo dos discos de oxacilina de 1 µg y a uno de ellos se le añade ácido clavulánico (4 µg). Si se produce ampliación del halo de inhibición en este último, el mecanismo de resistencia será, presumiblemente, debido a la hiperproducción de penicilinasas.

Otra de las limitaciones es la propia inestabilidad de la oxacilina y, por consiguiente, la pérdida de actividad del antibiótico en las pruebas de sensibilidad, en las placas de cribado o en los métodos directos de detección. Se recomienda que el almacenamiento de las placas se realice a 4°C y no se prolongue más allá de la fecha de caducidad establecida por el fabricante o más de 15 días si han sido preparadas en el propio laboratorio.

En los métodos directos de detección, además de lo señalado en el apartado B2.3. con respecto a las cepas de S.C.N. que fermentan el manitol, pueden existir falsos negativos si el recuento de SARM es muy bajo.

C.2.2. *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a la vancomicina

Recientemente se han detectado en Japón, EEUU y Europa, incluyendo España, aislamientos de SARM que presentan sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA, “vancomycin intermediate *S. aureus*”). Se han asociado a fracasos terapéuticos con el tratamiento con este glicopéptido. Actualmente se prefiere denominar a estos aislamientos como GISA (“glycopeptide intermediate *S. aureus*”).

Los GISA se reconocen por tener valores de CMI de vancomicina de 8 µg/ml (fenotipo GISA homogéneo). En ocasiones, la expresión de este nuevo mecanismo de resistencia no es homogénea y es posible encontrar aislamientos de *S. aureus* con subpoblaciones que tienen valores de CMI entre 1 y 4 µg/ml (fenotipo heterogéneo), valores superpuestos o ligeramente superiores a los que se obtiene durante el estudio rutinario de sensibilidad. El método considerado de referencia para detectar estos

aislamientos consiste en el análisis de poblaciones (PAP, "population analysis profile") aplicado con anterioridad al estudio de los aislamientos de SARM. Este sistema se basa en la selección de subpoblaciones en placas de BHI agar con concentraciones crecientes de vancomicina. Se ha de partir siempre de un inóculo elevado ($\geq 10^9$ ufc/ml) de un crecimiento de *S. aureus*.

Tenover et al (1998) han propuesto un método para confirmar la presencia de estos aislamientos, en particular de las poblaciones heterorresistentes. Para ello, debe sembrarse en botón 100 μ l de una suspensión de la cepa de *S. aureus* equivalente al 1.0 de MacFarland sobre placas de BHI suplementado con 6 μ g/ml de vancomicina e incubarse durante 24-48h a 35-37°C. La presencia de una o más colonias en el depósito indicará que la cepa de *S. aureus* puede presentar sensibilidad disminuida a la vancomicina. Como criterios generales una cepa GISA estará definida por una CMI ≥ 8 μ g/ml determinada por microdilución no comercial con Mueller-Hinton como caldo de cultivo o CMI ≥ 6 μ g/ml determinada por E-Test utilizando Mueller-Hinton agar como medio de cultivo. Asimismo, debe obtenerse crecimiento a las 24 h en placas de BHI con 6 μ g/ml de vancomicina. La utilización de la cepa *S. aureus* ATCC 29213 como control negativo puede inducir a errores pues en ocasiones crece en las placas con 6 μ g/ml.

C.3. Mecanismos de resistencia en *Enterococcus* spp.

La infección por enterococo no se asocia con elevadas tasas de mortalidad, aunque constituye la segunda causa más importante de infección nosocomial. El género *Enterococcus* presenta resistencia intrínseca o natural a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, los aminoglicósidos y la clindamicina y ha sido capaz de adquirir determinantes genéticos de resistencia, que afectan a numerosos grupos de antibióticos, -macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol- y en

especial, a la ampicilina, los aminoglicósidos (resistencia de alto nivel) y los glicopéptidos. Estos últimos, solos o en asociación, se utilizan como tratamiento de elección en las infecciones enterocócicas.

C.3.1. Resistencia a la ampicilina

Dos son los mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos en los enterococos, la afectación de las PBPs y la producción de β -lactamasas. El primero, es debido a la baja afinidad y velocidad de acilación de las PBPs por los β -lactámicos, esencialmente las cefalosporinas y penicilinas resistentes a las penicilinasas (meticilina, oxacilina, etc). La hiperproducción de las PBPs, en particular de la PBP3 (para algunos autores PBP 5) determina resistencia a la ampicilina y a los carbapenems y puede afectar, incluso, la sinergia con los aminoglicósidos. Este mecanismo es más frecuente en *Enterococcus faecium* que en *Enterococcus faecalis*. Por el contrario, el segundo mecanismo de resistencia, producción de β -lactamasas, es muy raro y se ha identificado en *E. faecalis*. Las cepas productoras de β -lactamasa se caracterizan por su resistencia a las penicilinas y sensibilidad a las asociaciones de estas con los inhibidores y a los carbapenems. En nuestro país no se han comunicado aislamientos de enterococos que produzcan estas enzimas.

No existen métodos especiales para la detección de la sensibilidad de los enterococos a las penicilinas o los carbapenems. Se recomienda seguir cualquiera de los métodos estándar. La ampicilina tiene generalmente mayor actividad intrínseca que la penicilina, observándose una dilución menor en los valores de CMI de la primera con respecto a la segunda. Especial atención ha de tenerse con los aislamientos resistentes (o menos sensibles a la ampicilina) y en los que se demuestre cierta actividad de los inhibidores de β -lactamasa ya que podrían producir β -lactamasa. Para detectar la producción de estas enzimas es necesario incrementar el inóculo

100 veces del habitual utilizado en las pruebas de dilución (de 10^5 a 10^7 UFC/ml). Esto es debido a que los valores de CMI de la ampicilina en los aislamientos de *E. faecalis* productores de β -lactamasas no suelen estar muy afectados. Debido a estos problemas, se recomienda investigar la presencia de β -lactamasas en todos los aislamientos procedentes de hemocultivos o muestras del sistema nervioso central. La presencia de estas enzimas puede ponerse de manifiesto con nitrocefín tal y como se describió en el apartado C.1.1.3.

C.3.2. Resistencia de alto nivel a los aminoglicósidos (ANRA)

La ausencia de un transporte eficiente de los aminoglicósidos al interior de la bacteria es el mecanismo por el cual los enterococos manifiestan **resistencia intrínseca** o de bajo nivel a estos compuestos. Se caracterizan por presentar valores de CMI que oscilan entre 4 y 64 $\mu\text{g/ml}$ para la gentamicina y entre 16 y 256 para la estreptomina. La **resistencia de alto nivel a los aminoglicósidos (ANRA)**, de mayor trascendencia clínica por suprimir la sinergia con los β -lactámicos, se produce por mutaciones ribosómicas o por la adquisición de genes responsables de la síntesis de enzimas modificantes de aminoglicósidos. Las mutaciones ribosómicas afectan específicamente a la estreptomina, mientras que el perfil de resistencia asociado a la síntesis enzimática varía con el tipo de enzima modificante.

Para predecir clínicamente la respuesta sinérgica de los aminoglicósidos con los β -lactámicos basta con determinar el **alto nivel de resistencia a la gentamicina y la estreptomina**. En general, los aislamientos con alto nivel de resistencia a la gentamicina lo son también a la tobramicina, netilmicina y amikacina. Por el contrario, la resistencia de alto nivel a la estreptomina es independiente del resto de los aminoglicósidos. En *E. faecium* se sintetiza de forma constitutiva la enzima AAC(6') que modifica la amikacina, kanamicina, tobramicina y netilmicina. Aunque no confiere resistencia de alto nivel, su presencia impide el sinergismo con los β -

lactámicos y los glicopéptidos. Por ello, *E. faecium* debe considerarse siempre con ANRA a estos compuestos. En *E. faecalis* la resistencia a la gentamicina se acompaña siempre de resistencia al resto de los aminoglicósidos, excepto la estreptomina, y suele ser debido a la síntesis de la enzima APH(2'')-AAC(6'). Sin embargo, las cepas sensibles de *E. faecalis* a la gentamicina pueden ser resistentes a la amikacina por la síntesis de las enzimas APH(3')-III y ANT(4'). No obstante, no se recomienda su estudio ya que la gentamicina es igual de efectiva que la amikacina. Además, la afinidad de estas enzimas por la amikacina es generalmente baja y el grado de afectación cuando presentan cualquiera de las enzimas que la modifican no es elevado. Con independencia de este nivel, no se produce sinergia con los β -lactámicos o glicopéptidos. Por el contrario, la afectación de la kanamicina por estas enzimas es clara, por lo que se ha propuesto, en el caso de que sea necesario, el estudio de este aminoglicósido en *E. faecalis* para predecir la resistencia a la amikacina.

Recientemente, se han descrito dos nuevas enzimas modificantes de aminoglicósidos en *E. faecalis* y que están codificadas por los genes *aph(2'')-Ic* y *aph(2'')-Id*. La primera confiere un nivel "intermedio" de sensibilidad a la gentamicina (256 $\mu\text{g/ml}$) mientras que con la segunda los valores de CMI son más elevados (>2000 $\mu\text{g/ml}$). En ambos casos, la amikacina no se afecta (32 $\mu\text{g/ml}$). Es importante resaltar que la presencia de estas enzimas impide la sinergia gentamicina- β -lactámico pero, dependiendo del aislamiento, puede producirse sinergia con la amikacina. Asimismo, se han descrito aislamientos de *E. faecalis* que presentan la enzima bifuncional APH(2'')-AAC(6') en los que los valores de CMI a la gentamicina son inferiores a los esperados (256 $\mu\text{g/ml}$) y existe documentación clínica del fracaso terapéutico cuando se asocia gentamicina y ampicilina. Además, estos aislamientos pueden pasar desapercibidos con los métodos habituales de estudio del alto nivel de resistencia. Por ello, cada caso debe ser considerado de manera individual cuando se

requiera la asociación del aminoglicósido con el β -lactámico o glicopéptido.

Las curvas de letalidad se consideran el método de referencia para el estudio de la sinergia entre β -lactámicos y aminoglicósidos. Su realización rutinaria no es práctica, por lo que se recurre a otros métodos más sencillos: a) método de cribado en placa; b) estudio en medios líquidos y c) método de difusión con discos con alto contenido en aminoglicósidos.

C.3.2.1. Detección de ANRA en placas de cribado. Se recomienda utilizar placas de BHI agar con 500 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina o 2.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Su inoculación se realiza depositando 10 μl de una suspensión del enterococo con una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland preparada a partir de un crecimiento en placa de 18-24 horas. El inóculo final debe ser de 10^6 UFC/depósito. Las placas se incuban 24h completas a 35-37°C y, si es necesario, otras 24h más cuando se estudia la estreptomina. La presencia de una o más colonias en el botón o de crecimiento en velo debe interpretarse como ANRA y por tanto ausencia de sinergia con los β -lactámicos. Se prefiere el medio de BHI al de otros, -MH suplementado y sin suplementar con sangre de carnero o dextrosa-, por el mejor crecimiento observado.

En el caso de estudiar el alto nivel de resistencia a la kanamicina se recomienda utilizar una concentración en la placa de 2.000 $\mu\text{g/ml}$.

C.3.2.2. Detección de ANRA en medios líquidos (microdilución). Al igual que en el caso anterior se elige el BHI como medio de cultivo con una concentración de gentamicina de 500 $\mu\text{g/ml}$ y de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. La concentración de estreptomina es menor que la que se emplea en las placas de cribado (2.000 $\mu\text{g/ml}$) debido a que el inóculo que se utiliza es el estándar para la microdilución (5×10^5 UFC/ml), 20 veces menor que el empleado en las placas de cribado (10^6 UFC/depósito). La equivalencia entre ambos métodos requiere esta disminución de la concentración de

estreptomina. Aunque no existe un criterio uniforme, en el caso de precisar el estudio de la kanamicina en la microdilución, la concentración a utilizar sería también de 1.000 $\mu\text{g/ml}$.

El periodo de incubación debe ser similar que en las placas de cribado: 24h completas y otras 24h, si es necesario, para la estreptomina.

Como técnica alternativa puede emplearse tiras de **E-test** que contengan un rango de concentraciones de gentamicina o estreptomina desde 0,125 a 2.048 $\mu\text{g/ml}$.

C.3.2.3. Detección de ANRA con discos con alto contenido en aminoglicósidos. Se utiliza la misma metodología descrita en el Protocolo n° 11 de la SEIMC, incluido el medio de MH sin suplementos. En este caso, los discos de aminoglicósidos contienen una elevada carga: 120 μg para la gentamicina y 300 μg para la estreptomina. Los halos de inhibición se deben medir a las 18-24h después de incubar las placas a 35-37°C y se interpretan de acuerdo a los criterios expresados en la tabla 7.

En el caso de estudiar el alto nivel de resistencia a la kanamicina, para predecir el de la amikacina, se recomienda utilizar discos de 120 μg .

C.3.2.4. Control de calidad y limitaciones de los métodos de detección del alto nivel de resistencia a los aminoglicósidos. Se recomienda utilizar *E. faecalis* ATCC 29212 como cepa sensible y *E. faecalis* ATCC 51299 como resistente a gentamicina y estreptomina. Los valores que se deben obtener con los diferentes métodos se recogen en la Tabla 7.

Algunas de las **limitaciones** ya han sido comentadas. Además debe tenerse en cuenta que:

- Los inóculos se deben preparar siempre a partir de cultivos recientes (18h) en placa.
- La mayoría de los aislamientos de enterococo con ANRA no dan halos de inhibición utilizando discos de alta carga. Excepcionalmente, existen algunos aislamientos que presentan halos de

inhibición intermedios en los que debe confirmarse el resultado con alguno de los otros dos métodos recomendados.

- Con algunos sistemas automáticos que utilizan paneles de microdilución se han detectado resultados falsos negativos. Con estos sistemas deben extremarse las precauciones y utilizar cepas control de forma rutinaria.

C.3.3. Resistencia a los glicopéptidos

En 1989 se describió por vez primera la resistencia a la vancomicina en el género *Enterococcus*. Desde entonces se ha producido un incremento de este tipo de aislamientos, particularmente en las unidades de cuidados intensivos en EEUU. Este aumento representa un grave problema clínico ya que la mayoría de los aislamientos de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos (ERG) lo son también a otros antimicrobianos de elección en el tratamiento de las infecciones enterocócicas, como ampicilina y aminoglicósidos. Su estudio en el laboratorio de microbiología ha de incluir métodos adecuados de determinación de la sensibilidad y sistemas eficientes de detección de los pacientes e individuos infectados o colonizados que alerten de su presencia y limiten su diseminación.

Dependiendo del nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina y los genes que la determinan se diferencian dos tipos de resistencia: a) adquirida, habitualmente de alto nivel y b) intrínseca o de bajo nivel. La primera afecta a la vancomicina y teicoplanina, mientras que la segunda, sólo a la vancomicina. En la tabla 8 se resumen los distintos fenotipos de ERG y sus características más importantes. Con la excepción del fenotipo VanA, existen algunos problemas para su detección, asociados, en la mayoría de las ocasiones, con el nivel de expresión de la resistencia y el método elegido.

C.3.3.1. Estudio de la sensibilidad a vancomicina y teicoplanina. Los métodos descritos

en el protocolo nº 11 de la SEIMC, cuando se aplican a los glicopéptidos tienen algunos problemas y limitaciones (ver apartado C.3.3.4.). Se recomienda MH sin suplementos como medio de cultivo y cuidar al máximo la estandarización del inóculo en cada técnica.

La difusión con discos tiene un bajo poder de discriminación en la detección de ERG, particularmente los que presentan valores intermedios de CMI (8-16 µg/ml). La carga de los discos de vancomicina y teicoplanina que se recomiendan es la habitual de 30 µg, aunque algunos autores han propuesto discos de 5 µg por la mejor caracterización de los aislamientos resistentes. El inóculo ha de prepararse a partir de una suspensión de enterococo equivalente al 0,5 de MacFarland preparada de un crecimiento en placa de 18h. La lectura después de 24h de incubación a 35-37°C se debe realizar con transiluminación. El aumento del tiempo de incubación a 48h se relaciona con la detección de falsos resistentes. En caso de duda se debe recurrir a la determinación del valor de la CMI. Las técnicas de **microdilución y dilución en agar**, utilizando Mueller-Hinton ajustado en cationes, están consideradas como referencia de otros métodos. Se han descritos fallos en la detección de ERG por algunos sistemas automáticos que emplean la microdilución. Si bien la microdilución tiende a dar unos valores de CMI ligeramente más bajos que la dilución en agar, la concordancia entre ambas técnicas es buena. El inóculo que se recomienda es el estandar (5×10^5 UFC/ml y 10^4 UFC/depósito) y la incubación debe ser 24h a 35-37°C.

La técnica del E-test tiende a ofrecer valores de CMI ligeramente superiores a los de la microdilución o dilución en agar, sin que se produzcan falsas resistencias.

C.3.3.2. Métodos de cribado. El método adoptado por el NCCLS emplea placas de BHI agar suplementado con 6 µg/ml de vancomicina en el que se deposita en botón con multi-inoculadores el inóculo bacteriano. En este caso, y debido a la utilización de

6 µg/ml en vez de 4 µg/ml, como recomiendan otros autores, el inóculo que se utiliza debe ser entre 10^5 y 10^6 UFC/depósito, ligeramente superior al de la dilución en agar (10^4 UFC/depósito). Tras 24 h de incubación a 35-37°C se debe inspeccionar el posible crecimiento en velo o la presencia de colonias en el depósito. Una sola colonia indica que el aislamiento es un ERG.

C.3.3.3. Métodos directos de detección.

Existen diferentes métodos propuestos para la detección directa de aislamientos de ERG en las muestras clínicas, en particular para detectar el estado de portador intestinal. La mayoría de los estudios recomienda la utilización de un medio selectivo específico para enterococo suplementado con antibióticos que inhiban el crecimiento de posible microflora acompañante. Entre los recomendados destacan los medios comerciales que incorporan azida y al que se le añaden indicadores de crecimiento (esculina), antibióticos (kanamicina, clindamicina, o aztreonam, etc.) y antifúngicos (anfotericina, nistatina). La concentración de vancomicina elegida suele ser de 6 µg/ml. En algunos casos se recomienda emplear previamente un caldo selectivo de enriquecimiento para aumentar el nivel de detección.

C.3.3.4. Control de calidad y limitaciones de los métodos de detección y cribado

de aislamientos de enterococos resistentes a los glicopéptidos. Se recomienda utilizar *E. faecalis* ATCC 29212, sensible a la vancomicina, y *E. faecalis* ATCC 51299, con resistencia de bajo nivel a la

vancomicina, como cepas control. Además han de emplearse las cepas de *S. aureus* ATCC 25213 y ATCC 29213 para controlar, respectivamente los discos y los sistemas de determinación de la CMI. Los valores que se deben obtener en los diferentes métodos se recogen la Tabla 9

Entre los aspectos que limitan el estudio o detección de la resistencia a los glicopéptidos en enterococo destaca su propio nivel de expresión. La detección de aislamientos con fenotipo VanA no suele tener dificultad. Por el contrario, determinados aislamientos con fenotipo VanB o VanC pueden ser clasificados falsamente como sensibles. Igualmente, algunos aislamientos sensibles pueden ser clasificados como resistentes tanto si utiliza la difusión con discos, las placas de cribado o los aparatos automáticos de determinación de las CMI. El ajuste del inóculo y la lectura con transiluminación limita estas desviaciones.

Los glicopéptidos son moléculas de gran tamaño que difunden mal en el agar, por lo que tendrá que controlarse el grado de humedad del agar al realizar los antibiogramas y la distribución homogénea del antibiótico al preparar las placas de cribado o las diferentes placas para determinación de la CMI por el método de dilución en agar.

TABLA 3. Utilidad de las pruebas rápidas de detección de β -lactamasas y su significado (modificado de Leitch, 1992)

Microorganismo	Método			Resistencia a
	Acidimétrico	Yodométrico	Cromogénico	
<i>Staphylococcus</i> spp.	X	X	X	
<i>Enterococcus faecalis</i>			X	
<i>Haemophilus</i> spp.	X		X	Penicilina Ampicilina Amoxicilina
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	X	X	X	Piperacilina Ticarcilina
<i>Moraxella catharralis</i>			X	
<i>Bacteroides</i> spp.			X	

Tabla 4. Antibióticos inductores de la síntesis de β -lactamasas cromosómicas inducibles

Antibiótico	β -lactamasa					
	Grupo 1 (AmpC)					Grupo 2be
	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>C. freundii</i>	<i>Serratia</i> spp.	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>
Aminopenicilinas	+++	++	+++	+++	+++	+++
Acido clavulánico	+++	+++	+++	+++	+++	-
Ureidopenicilinas	+	+	+	+	+	+
Carboxipenicilinas	+	+	+	+	+	+
Cef 1 ^a / 2 ^a gen.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cef 3 ^a gen.	+	+	+	+	+	+
Cefoxitina	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Carbapenems	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Efecto inductor: elevado, +++; moderado, ++; debil, +; nulo, -.

Tabla 5. Detección de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus*: criterios de sensibilidad de oxacilina y valores límites de las cepas del control de calidad y su resultado en las placas de cribado

Técnica de estudio	Criterios de sensibilidad			<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (sensible a meticilina, β -lactamasa -)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (sensible a meticilina, β -lactamasa +)	<i>S. aureus</i> ATCC 33591* (resistente a meticilina)
	S	I	R			
Difusión con disco (halos, mm) oxacilina de 1 μ g	≥ 13	11-12	≤ 10	18-24	---	6
Dilución en agar, microdilución, E-test (CMI, μ g/ml)	≤ 2	---	≥ 4	0,06-0,5	0,12-0,5	---
Placas de cribado MH + oxacilina (6 μ g/ml) + CINa (4%)	---	---	---	Crecimiento negativo	Crecimiento negativo	Crecimiento positivo

* el NCCLS recomienda en las placas de cribado la utilización de la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 que presenta resistencia heterogénea a la meticilina (CMI de oxacilina, 32 μ g/ml) (NCCLS, 2000)

Tabla 6. Fenotipos de sensibilidad y mecanismos de resistencia a la meticilina (oxacilina) en *Staphylococcus aureus*

Fenotipo	Mecanismo de resistencia	CMI oxacilina (μ g/ml)	Efecto de los inhibidores	Resistencia cruzada a β -lactámicos	Multiresistencia a antibióticos no β -lactámicos	Crecimiento en placas de cribado
Sensible	---	$\leq 0,1-0,5$	-	---	---	-
Penicilinasas	β -lactamasa	0,1-0,5	+	No	No	-
"Borderline"	Hiperproducción de β -lactamasa	1-8	+	No	No	- ^a
"Borderline" (MOD-SA)	Modificación de PBP2a (1,2, y 4)	1-8	-	No	No	-/+
Resistencia heterogénea a la meticilina (SARM)	<i>mecA</i> (PBP2a)	1-16	-	Si	Si ^b	+
Resistencia homogénea a la meticilina (SARM)	<i>mecA</i> (PBP2a)	>16	-	Si	Si ^b	+

a: pueden existir excepciones

Tabla 7. Detección de la resistencia de alto nivel a los aminoglicósidos en *Enterococcus*: criterios de sensibilidad y valores límites de las cepas control de calidad y su resultado en placas de cribado.

Técnica de estudio	Criterios de sensibilidad			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (sensible a aminoglicósidos)	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (alto nivel resistencia a gentamicina y estreptomycin)
	Sensible a la sinergia	Indeterminado	Resistente a la sinergia		
Disco de alto contenido (halos, mm):					
Gentamicina (120 µg)	≥10	9-7	6	16-22	6
Estreptomycin (300 µg)	≥10	9-7	6	14-19	6
Microdilución (CMI, µg/ml):					
Gentamicina (500 µg/ml)	<500	----	≥500	<500	≥500
Estreptomycin (1000 µg/ml)	<1000	----	≥1000	<1000	≥1000
Placas de cribado					
BHI agar + gentamicina (500 µg/ml)	Crecimiento negativo	----	Crecimiento positivo	Crecimiento negativo	Crecimiento positivo
BHI agar+estreptomycin (2000 µg/ml)	Crecimiento negativo	----	Crecimiento positivo	Crecimiento negativo	Crecimiento positivo

* el NCCLS recomienda en las placas de cribado la utilización de la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 resistente a la metilicina (NCCLS, 2000)

Tabla 8. Fenotipos de resistencia a los glicopéptidos en *Enterococcus* spp.

Fenotipo	Resistencia adquirida				Resistencia intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanC
CMI vancomicina (µg/ml)	64->1024	4-1024	16-64	16	2-32
CMI teicoplanina (µg/ml)	16-512	0,25-2	2-4	0,5	0,12-2
Expresión de la resistencia	Inducible	Inducible	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Resistencia transferible	Sí	Sí	No	No	No
Gen responsable de la resistencia (ligasa)	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanC-1, vanC-2, vanC-3</i>
Especies de enterococo en las que se ha detectado	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>) <i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC-2</i>) <i>E. flavescens</i> (<i>vanC-3</i>)

Tabla 9. Detección de la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus*: criterios de sensibilidad y valores límites de las cepas del control de calidad y su resultado en las placas de cribado

Técnica de estudio	Criterios de sensibilidad			<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (sensible a glicopéptidos)	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (resistente a glicopéptidos)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (sensible a glicopéptidos)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (sensible a glicopéptidos)
	S	I	R				
Difusión con discos (halos, mm)							
Vancomicina (30 µg)	≥17	16-15	≤14	---	---	17-21	---
Teicoplanina (30 µg)	≥14	13-11	≤10	---	---	15-21	---
Dilución en agar, microdilución, E-test (CMI, µg/ml)*							
Vancomicina	≤4	8-16	≥32	1-4	---	---	0,5-2
Teicoplanina	≤4	8-16	≥32	0,06-0,25	---	---	0,25-1
Placas de cribado BHI agar+vancomicina (6µg/ml)	---	---	---	Crecimiento negativo	Crecimiento positivo	---	---

* puntos de corte del grupo MENSURA; los del NCCLS son iguales para la vancomicina y para la teicoplanina: sensible, ≤8 µg/ml; intermedio: 16 µg/ml; resistente: ≥32 µg/ml

D. Estudios farmacodinámicos

Desde hace unos años, la investigación de los parámetros farmacodinámicos está teniendo cada vez más importancia en el diseño de nuevos regímenes de dosificación. Hasta hace pocos años, la dosificación de los antimicrobianos se basaba sobre todo en parámetros farmacocinéticos, y las dosis se administraban para mantener el mayor tiempo posible las concentraciones del antimicrobiano por encima de la óptima e impedir que los microorganismos recuperaran el crecimiento.

El estudio estandarizado de los parámetros farmacodinámicos (efecto postantibiótico [EPA], efectos de concentraciones subinhibitorias, etc.) ha comenzado hace poco tiempo, aunque las primeras observaciones se hicieron hace muchos años. Algunos de estos fenómenos se estudian de forma relacionada y sus implicaciones y mecanismos de acción no se conocen con detalle.

D.1. Efecto postantibiótico (EPA)

Al mismo tiempo que las primeras sustancias antimicrobianas empezaban a aplicarse en la terapéutica y en estudios en laboratorio, algunos investigadores ya notaron que existía un visible retraso en el crecimiento de los microorganismos que habían sido expuestos a algunos antibióticos durante cortos espacios de tiempo. Sin embargo, no fue hasta los años 70 cuando estas observaciones y estudios preliminares fueron aplicados de manera sistemática al estudio de los antimicrobianos. Desde entonces se ha tratado de estandarizar las técnicas empleadas tanto "in vitro" como "in vivo" y a definirse de una forma aceptable el verdadero significado de este efecto.

Mc Donald definió el EPA como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano. Es tal vez la definición más aceptada, ya que enfatiza el hecho de que no se debe a la acción de antimicrobiano residual, sino a una previa exposición a este.

D.1.1. Determinación del EPA "in vitro"

Se han utilizado una gran variedad de técnicas para el cálculo del EPA "in vitro", pero casi todas ellas se basan en los mismos pasos: cuantificar el crecimiento tras la eliminación del antimicrobiano .

La cuantificación del EPA se realiza mediante los siguientes pasos:

1º- a dos matraces con 50 ml de caldo (M-H, TSB, etc.) cada uno se les añade el microorganismo (en fase logarítmica de crecimiento) hasta alcanzar una concentración de 10^7 UFC/ml (absorbancia de 0.06 a 580 nm). La concentración exacta se halla mediante recuento en placas.

2º- uno de estos dos cultivos se expone a la acción del antimicrobiano (1 a 10 veces la CMI) durante un periodo de 1- 2 horas a 37 °C en baño con agitación. El otro cultivo se mantiene como control en las mismas condiciones.

3º- al final de este periodo se halla de nuevo en número de microorganismos en los dos cultivos (control y tratado) mediante un recuento en placa, tras lo cual se procede a retirar el antimicrobiano. Para este proceso, se utilizan principalmente tres métodos:

■ **Eliminación del antimicrobiano mediante**

centrifugación: ésta se realiza a 1.200 x g durante unos 5-10 minutos, eliminando luego el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en medio fresco. La mayoría de los investigadores realizan al menos dos centrifugaciones para asegurar una total supresión del antimicrobiano. La mayor desventaja de este método es que las bacterias pueden mostrar un retraso en el crecimiento debido a efectos mecánicos de la centrifugación.

■ **Inactivación del antimicrobiano por medio**

de enzimas: es un método más simple y rápido que los otros dos, pero con el inconveniente de que es casi exclusivo de los β -lactámicos .

■ **Dilución del cultivo:** este método es

bastante simple y es él más empleado. Consiste en diluir el cultivo con los microorganismos y el antimicrobiano en medio fresco. La dilución

depende de la concentración de antimicrobiano, utilizándose normalmente 10^{-3} . Para ello tomamos 50 μ l de cada cultivo (control y tratado) añadiéndoselos a 50 ml de caldo fresco. El cultivo debe tener al menos 10^5 - 10^6 UFC/ml para que, tras diluir, se pueda cuantificar su crecimiento. Se puede aplicar a cualquier antimicrobiano, aunque se corre el riesgo de no poder detectar crecimiento si éste tiene un alto poder bactericida.

El mismo procedimiento se utiliza para el cultivo control, con lo que al final de este proceso tenemos 4 cultivos (los dos iniciales más los dos que obtenemos tras este proceso). Si el método de eliminación del antimicrobiano no ha sido por dilución, es conveniente realizar un recuento de microorganismos en placa para saber su número exacto.

4º - los 4 cultivos se incuban de nuevo de 7 a 20 horas a 37 C en baño con agitación, realizando cada hora un recuento de microorganismos de los 4 cultivos.

5º - las curvas de EPA se elaboran a partir de los recuentos bacterianos que se hicieron cada hora desde el tiempo 0 (adición del antimicrobiano) hasta el final del experimento.

6º - para el cálculo de la duración del EPA se utiliza generalmente la fórmula descrita por Mc. Donald :

$$EPA = T - C$$

T = tiempo (en horas) que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0 (dilución del antimicrobiano).

C= tiempo (en horas) que tarda el cultivo control en incrementar 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

Este proceso se debe repetir tres veces con cada antimicrobiano y cada microorganismo que se ensaye, hallando posteriormente la media y el error

estándar. La duración del EPA se considera generalmente significativa si es mayor de 30 minutos.

En este modelo experimental se utiliza el **recuento de UFC/ml en placa** para seguir la cinética de crecimiento. Sin embargo, han aparecido otros métodos de seguimiento de la curva de crecimiento, como los que se enumeran a continuación:

- **medida de cambios en la conductancia eléctrica.** Se utiliza un aparato que mide continuamente los cambios de conductancia eléctrica en el medio de crecimiento, calculando la concentración de microorganismos casi instantáneamente.
- **ensayo de bioluminiscencia del ATP.** Se basa en la reacción entre luciferasa fluorescente y luciferina reducida, que en presencia de ATP y magnesio, produce un complejo luciferina-AMP.
- otros métodos utilizados son la **espectrofotometría, recuento electrónico de partículas** o **cambios en la morfología**. En éste último se define el **EPA morfológico** como el tiempo necesario para que una población de filamentos Gram-negativos alcance la proporción de un 10% de filamentos y un 90% de bacilos, lo cual indicaría el final del EPA.

D.1.2. Otros modelos "in vitro" para la determinación del EPA

Otros modelos para el cálculo del EPA simulan las condiciones "in vivo", variando la concentración del antimicrobiano al igual que ésta varía en el hombre. Tienen el inconveniente de no poder separar el EPA de los efectos de las concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano.

- **Modelos de dilución repetida:** consiste básicamente en realizar continuas diluciones de un frasco de cultivo con antibiótico, añadiendo un volumen de medio fresco igual al extraído.
- **Modelos de diálisis:** se establece una diálisis entre un sistema cerrado que contiene el microorganismo y que está separado de otro, que contiene medio fresco, por una membrana

semipermeable. El antimicrobiano puede añadirse a un sistema u otro, según el modelo de absorción IV o IM. La ventaja sobre el método anterior es que no se diluyen los microorganismos.

D.1.3. Modelos experimentales en el estudio del EPA "in vivo"

En teoría, se podría evaluar "in vivo" el EPA en cualquier tejido o fluido corporal en el que fuera posible un recuento de UFC y una medición de la concentración de antimicrobiano. Desde los primeros estudios que se realizaron, sólo cinco modelos en animales han sido mayoritariamente usados para cuantificar este efecto:

D.1.3.1. Modelo de infección en muslo de ratón: es tal vez el más utilizado. Ya Eagle y cols. lo emplearon para ver el efecto de la penicilina G sobre los estreptococos "in vivo". Otros investigadores lo utilizaron también con nuevas penicilinas sobre Gram-negativos. Estos experimentos se realizaban sobre ratones inmunológicamente sanos, hasta que Vogelman, Craig y cols. lo modificaron inmunodeprimiendo a los ratones, con lo que el efecto del sistema inmune quedaba anulado.

Este modelo tiene muchas ventajas; primero es relativamente barato, el sistema inmune no interfiere, el muslo del ratón puede extraerse fácilmente, y cuantificar el número de UFC en el homogeneizado no presenta dificultades. Los pasos son los siguientes :

1º- Inmunodepresión: los ratones se inmunodeprimen con dos dosis de 150 y 100 mg/kg de ciclofosfamida (vía intraperitoneal) en los días 0 y 3 respectivamente.

2º- Infección en el muslo: la infección en el muslo se lleva a cabo por vía intramuscular, inyectando un volumen de 0,1 ml de medio líquido con microorganismos en fase de crecimiento exponencial; el número total de UFC que se inyecta suele ser de 10^6 - 10^7 UFC/ml. El número de ratones infectados es de 45, siendo cada uno infectado en los

dos muslos por la misma bacteria. Este tiempo se toma como el T₂.

3º- Tratamiento antimicrobiano: al cabo de 2 horas de la infección en el muslo, los ratones se separan en 2 grupos:

- tratados: a 27 ratones se les inyecta por vía subcutánea en el muslo un volumen de 0,2 ml de solución salina y antimicrobiano con la concentración deseada. La elección de las dosificaciones se hace teniendo en cuenta las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del antimicrobiano, así como su poder bactericida "in vitro".

- controles: 18 ratones a los que se les inyecta un volumen igual (0,2 ml) de solución salina.

Este punto se toma como tiempo 0 del experimento.

4º- Sacrificio de los animales y extracción de los muslos: se sacrifican 3 ratones (por dislocación cervical bajo anestesia) por cada tiempo que se indica a continuación:

- grupo control: en las horas 0 (administración del antimicrobiano), 2, 4, 6, 8 y 10.

- grupo de tratados: desde la 1ª hasta la 10ª hora.

Después del sacrificio de cada animal y con ayuda de material quirúrgico (pinzas, bisturí y tijeras) se extraen los muslos del ratón, separando la piel y cortando el músculo en pequeños trozos que se llevan a un mortero de porcelana estéril, añadiéndole 9 ml de solución salina (dilución 1:10 del número de bacterias en el muslo) y homogeneizando durante 3-5 minutos con arena de mar estéril. A continuación se toma el sobrenadante del mortero y se procede al recuento de microorganismos.

5º - Recuento del número de UFC en el muslo del ratón: a partir del homogeneizado (que se considera como dilución 1:10 del número real de UFC en el muslo) se procede a realizar el recuento de UFC por el método (ya descrito en los estudios "in vitro") de banco de diluciones y recuento en placa. Se

obtienen así las concentraciones de microorganismos en los distintos tiempos y se elabora una gráfica con los datos.

6º - Cálculo del tiempo en el que las concentraciones séricas de antimicrobiano están por encima de la CMI y de otros parámetros farmacocinéticos: las concentraciones de antimicrobiano en suero se pueden determinar mediante varias técnicas. Las más utilizadas son las siguientes:

■ por **cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**: es el método más fiable para determinar la concentración exacta de antimicrobiano en el muslo.

■ por la técnica de **bioensayo**: se puede utilizar el método de difusión en agar de Grove y Randall, aunque se debe modificar según el microorganismo y antimicrobiano que se utilice. Los pasos son básicamente los siguientes:

- elaboración de la recta estándar: se utilizan placas Petri de 15 cm de diámetro con 70 ml de agar adecuado al microorganismo que se va a usar. El microorganismo patrón se siembra en masa con una concentración de 10^5 - 10^6 UFC/ml. Éste microorganismo debe tener una CMI más baja que el que se haya utilizado para el estudio del EPA. Una vez solidificado el agar, se procede a hacer pocillos y cada pocillo se rellena con 300 µl de una solución de PBS y antibiótico a distintas concentraciones al duplo, realizándose el ensayo por triplicado.

Se incuban las placas a 37°C y, transcurridas 24 horas, se miden los halos de inhibición con un calibre, realizándose con los datos una regresión lineal y una recta de mínimos cuadrados (recta estándar) que relaciona el logaritmo de la carga y el diámetro del halo en milímetros.

- Cálculo de las concentraciones de antimicrobiano en las muestras de suero de ratones neutropénicos: las muestras de suero se obtienen por centrifugación (3.500 rpm durante 10 minutos) de sangre de ratones neutropénicos

extraída por el seno retroorbital. Los ratones fueron tratados con las mismas dosis que en el apartado de tratamiento antimicrobiano del estudio de EPA.

La obtención de sangre se realiza a partir de la administración del antimicrobiano y durante 4-6 horas, dependiendo del antimicrobiano: la 1ª media hora cada 15 minutos y posteriormente cada 30 minutos hasta la última. Se utilizan 3 ratones por cada tiempo de extracción de sangre, haciendo un total de 30 ratones por cada ensayo de antimicrobiano-microorganismo (3 controles sin antimicrobiano y 27 tratados).

Una vez obtenidos los sueros se procede a llenar, por cada tiempo de extracción, 3-4 pocillos en placas Petri preparadas de igual forma que la explicada para la recta estándar. Tras una incubación a 37°C durante 24 horas, se miden los halos de inhibición y se calcula la concentración de antimicrobiano correspondiente mediante la recta estándar y la ecuación de regresión lineal. Con estos datos se prepara una gráfica de niveles de concentración de antimicrobiano en suero (mg/l) frente al tiempo (h.) por cada antimicrobiano y dosis. El cálculo del tiempo en el que los niveles de antimicrobiano superan a la CMI se realiza interpolando la CMI en los datos obtenidos en los tiempos de extracción del suero.

7º - Cálculo del EPA: una vez obtenido el tiempo que el antimicrobiano supera la CMI en suero, se calcula el tiempo de efecto postantibiótico mediante la fórmula :

$$EPA = T - C - M$$

T = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones tratados aumente 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero descienden de la CMI.

C = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones controles

aumente 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

M = tiempo en el que los niveles de antimicrobiano en suero están por encima de la CMI.

Se considera EPA significativo si es mayor de 30 minutos.

8º- Control del posible efecto de las concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano en el muslo:

para demostrar que el retraso en el crecimiento bacteriano no se debe a la acción de antimicrobiano residual (sub-CMI, metabolitos, etc.) se procede a infectar el muslo de ratones inmunodeprimidos con microorganismos en fase logarítmica de crecimiento, justo en el momento en que los niveles de antimicrobiano en suero descienden de la CMI. Si las curvas de los grupos tratados y controles no tienen diferencias de crecimiento, se considerará que el efecto subinhibitorio del antimicrobiano no es activo, con lo que el EPA sería en realidad el efecto de la exposición anterior.

D.1.3.2. Modelo de meningitis en conejos.

Autores como Sande y cols., utilizaron este modelo puesto en práctica por ellos para estudiar el efecto de una sola dosis de ampicilina sobre *S. pneumoniae*. Básicamente se trata de provocar una meningitis en conejos y administrar posteriormente el antimicrobiano, determinando para cada tiempo de curva la concentración de éste y el número de microorganismos en el líquido cefalorraquídeo. Este modelo tiene grandes ventajas, como por ejemplo que el EPA puede determinarse para cada animal separado. Sin embargo, cuando en posteriores estudios se inyectó penicilinasas en el líquido cerebroespinal, los microorganismos crecieron normalmente, lo que demostraba que los niveles sub-CMI eran activos. La falta de EPA con penicilina G y neumococo en este modelo es consistente con los datos encontrados con otros modelos.

D.1.3.3. Modelo de endocarditis en ratas.

En este modelo, utilizado también por varios autores, se produce una endocarditis en las válvulas aórtica o tricúspide mediante la introducción de un catéter en la arteria carótida o vena yugular, por el que se inoculan, 24 horas después, 10^7 UFC del microorganismo que se vaya a utilizar. El 100% de las ratas desarrollan endocarditis en pocas horas. Un día más tarde, se administra el antimicrobiano por vía intramuscular, y posteriormente se determinan el número de UFC y concentración de antimicrobiano en las vegetaciones producidas en las válvulas mediante técnicas estándar (bioensayo, RIA).

D.1.3.4. Otros modelos. Utilizan bacterias pretratadas "in vitro" que luego son inoculadas o expuestas "in vivo":

Modelo de cámaras en conejos: este modelo es tal vez el menos utilizado de todos. Se utilizan unas cámaras de acero en forma de red (llamadas TCF o Tissue Cage Fluid) que contienen unos 4 ml de un buffer, y que son implantadas cuatro semanas antes del experimento en la espalda de conejos sanos. En estas cuatro semanas, las cámaras se rodean de tejido conectivo y se establece un equilibrio entre los líquidos intersticiales y de la cámara. En el día del experimento se introducen en las cámaras 0,4 ml de suspensión con microorganismos que previamente han sido expuestos a la acción de antimicrobiano "in vitro". Cada tiempo de muestra se extrae una parte del líquido y se hallan las UFC y concentración del antimicrobiano, determinando la duración del EPA. En realidad, es una determinación del EPA ex-"in vivo", y lo que podemos observar es el efecto de las defensas del huésped frente al microorganismo, ya que los animales son inmunológicamente sanos y nosotros medimos las diferencias con microorganismos en fase normal de crecimiento.

Modelo de piezas de algodón en ratones: Renneberg y Walder han puesto a punto este modelo que junto con el de infección en muslo son probablemente los mejor estandarizados. Se

implantan subcutáneamente piezas de algodón empapadas de una solución con bacterias en la espalda de ratones normales, administrándose dos horas más tarde el antibiótico v.i. Posee grandes ventajas: extrayendo las piezas puede determinarse la concentración de antibiótico en el sitio de infección, posibilidad de controlar la acción de las concentraciones subinhibitorias por intercambio de dichas piezas con los de ratones sin tratar, y por último que permite trabajar con diferentes bacterias a la vez.

Los autores de este modelo aplicaron una modificación a la fórmula que hemos empleado anteriormente para calcular el EPA:

$$EPA = T - C$$

T = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones tratados aumente 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo en que los niveles de antimicrobiano en suero descienden de la CMI.

C = tiempo necesario para que el número de UFC en los muslos de ratones controles aumente 1 logaritmo₁₀ su concentración a partir del tiempo 0.

D.1.4. Factores que afectan al EPA

Son muchos los factores pertenecientes al microorganismo, antimicrobiano y técnica utilizada que pueden afectar la duración del EPA tanto "in vitro" como "in vivo". Algunos están bien estudiados, pero otros están por investigar. A continuación se enumeran algunos de ellos:

- **Tipo de antimicrobiano y microorganismo:** generalmente, este efecto se puede encontrar en casi todos los microorganismos y antimicrobianos, aunque hay diferencias apreciables entre ellos. Los Gram-positivos frecuentemente exhiben EPA con casi todos los antimicrobianos, si bien los β -lactámicos lo inducen en menor cuantía que otros grupos

como los aminoglicósidos. Con bacilos Gram-negativos, el EPA no se suele observar con β -lactámicos, aunque si lo producen con casi todos los demás antimicrobianos

- **Concentración de antimicrobiano:** normalmente se suele utilizar "in vitro" una concentración de 1-10 veces la CMI. El EPA parece ser proporcional a la concentración, aunque hay otros parámetros que también influyen (nivel máximo en suero, dosis total, etc.).
- **Duración de la exposición:** al igual que el anterior, este factor también aumenta la duración del EPA en algunos antimicrobianos (como β -lactámicos), aunque otros (aminoglicósidos) parecen depender de otros parámetros (área bajo la curva de concentración, dosis total administrada).
- **Efecto del tamaño del inóculo:** sólo se ha examinado este efecto con *S. aureus*. Eagle y cols. observaron que frente a altas concentraciones de microorganismos, la penicilina G no inducía EPA sobre *S. aureus*. También se ha observado este efecto con eritromicina sobre la misma cepa.
- **Fase de crecimiento del microorganismo:** normalmente se utilizan en todas las técnicas bacterias en fase logarítmica de crecimiento.
- **Agitación:** tampoco parece haber diferencias entre el uso de agitación mecánica en la determinación del EPA "in vitro", aunque ha habido algún caso en el que se han encontrado diferencias, como ampicilina frente a *E. coli*, donde la agitación disminuyó el EPA de 1.4 a - 0.6 horas.
- **Tipo de medio y pH:** se ha dado algún caso en el que el medio ha afectado la duración del EPA. Bundtzen examinó el efecto de suero humano, encontrando una significativa reducción con *E. coli* y tetraciclina o rifampicina con o sin suero al 90%. El pH parece influir en algunas familias de antimicrobianos más que en otras; en

quinolonas y aminoglicósidos, el pH ligeramente ácido (5,5) redujo el EPA.

D.2. Efecto de las concentraciones subinhibitorias

Otra serie de factores farmacodinámicos son los efectos que ejercen las concentraciones subinhibitorias sobre las bacterias. Su importancia es de gran relevancia ya que siempre se encuentran concentraciones residuales de antimicrobiano tras la administración a los pacientes de dosis terapéuticas.

Los efectos de las concentraciones sub-CMI incluyen desde cambios en la morfología y ultraestructura de las bacterias, hasta los producidos en la virulencia o fagocitosis de estas. Algunos de estos fenómenos han sido mejor estudiados que otros, por lo que sus mecanismos están mejor comprendidos. La mayoría de estos trabajos de investigación ha sido llevada a cabo "in vitro", aunque también ha habido algunos realizados "in vivo" que parecen confirmar los datos obtenidos hasta ahora.

D.2.1. Efectos sobre la morfología bacteriana

Los cambios en la morfología de las bacterias se han estudiado con microscopio de luz y electrónico. Este segundo permite la observación de alteraciones en la ultraestructura de las células.

Se ha definido la **Concentración Mínima de Antimicrobiano** (CMA, término definido por Lorian y cols.) como la cantidad de antibiótico que produce modificaciones en la estructura celular de una bacteria, y su valor suele estar entre un tercio a un octavo de la CMI, dependiendo del antimicrobiano. En determinadas combinaciones antimicrobiano-bacteria puede encontrarse CMA de $1/20 \times$ CMI.

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo "in vitro", aunque los obtenidos "in vivo" han corroborado significativamente estos datos.

Los métodos utilizados "in vitro" se pueden dividir en dos categorías:

a) **estudios en medio líquido;** llevados a cabo en medios como caldo TSB o MH. El **procedimiento** es el siguiente: a cuatro matraces con 50 ml de medio se

le añaden microorganismos en fase de crecimiento logarítmico (de un cultivo del día anterior) hasta alcanzar una concentración de 10^4 - 10^5 UFC/ml. A tres de ellos se les añade posteriormente el antimicrobiano en concentraciones de 1/2, 1/4 y 1/8 x CMI, mientras que el cuarto se utiliza como control. A continuación se incuban todos los matraces a 37°C con agitación durante 7 a 10 h., realizándose observaciones para cada uno de esos tiempos. Las tinciones pueden ser de Gram o más específicas para el microorganismo que se utilice.

b) estudios sobre superficies sólidas o semisólidas. Existen principalmente dos métodos:

- mediante la utilización de placas con agar (M-H u otro más específico) **en las que se siembra en masa el microorganismo** a estudiar según las especificaciones para los test de susceptibilidad. Posteriormente, se colocan uno o dos discos con el antimicrobiano que se quiere ensayar sobre la superficie de la placa, incubando a 37°C durante un tiempo de 4 a 5 h. Se pueden ensayar varias concentraciones de antimicrobiano en varias placas, dejando una como control (con disco impregnado en solución salina). Cuando el crecimiento sea visible, se retiran los discos de la placa y se coloca un porta sobre la superficie de ésta, de manera que cruce los bordes de la zona donde estaba el disco. Después de fijar al aire, se hace una tinción Gram y se observa al microscopio. Los microorganismos expuestos a concentraciones sub-CMI se encontrarán en el borde de la zona de inhibición.

- por **colocación de membranas (discos) con microorganismos** sobre placas con agar al que se le ha añadido antimicrobiano hasta alcanzar una concentración de 1/2, 1/4 o 1/8 x CMI. Se incuban a 37°C durante un tiempo de 4 a 5 h, tras el cual se retiran los discos y se colocan entre dos portas, apretándolos suavemente. Estos portas se secan al aire y se fijan y tiñen para su observación. Los discos que se utilizan

deben de tener un poro de aproximadamente 0,3 μ m.

También se pueden observar los microorganismos al microscopio electrónico para ver los cambios en su estructura celular.

El estudio "in vivo" es más complicado, y sus resultados coinciden más con los métodos "in vitro" en medio sólido que líquido. Las principales técnicas son: observación directa de muestras de pacientes, modelo de infección intraperitoneal en ratones, y modelo de endocarditis en conejos.

Muchos grupos de antimicrobianos inducen cambios en la forma de las bacterias. Las quinolonas inducen la formación de **filamentos** en bacterias Gram-negativas. Algunos macrólidos parecen inhibir la separación de células en *S. aureus*, aunque los septos son de 2 a 3 veces más finos que con β -lactámicos. Sin embargo, el grupo mejor y más estudiado es el de los β -lactámicos, que alteran de forma más significativa la forma de los microorganismos. Su acción sobre la morfología de las bacterias es grande debido a su mecanismo de acción. Producen filamentación o formación de esferoplastos (células con la pared muy fina) en bacterias Gram-negativas, según sobre que PBP tenga más afinidad el antimicrobiano.

En las bacterias Gram-positivas, la morfología más comúnmente encontrada es la de formas anormalmente grandes con hasta 32 células que no se han separado, denominadas en inglés "**clusters**".

D.2.2. Efectos sobre el crecimiento de los microorganismos

Los efectos de las concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento de los microorganismos es un tema de la máxima actualidad. Estas concentraciones, sin embargo, actúan de distinta manera sobre las bacterias en fase de crecimiento logarítmico, fase estacionaria o microorganismos previamente expuestos a la acción del antimicrobiano. Esta diferencia ha llevado a la definición de dos términos que definen estas

circunstancias: el efecto de las concentraciones subinhibitorias (**ECS**) y el efecto de sub-CMI sobre bacterias en fase de EPA (**ECS-EPA**). Estos efectos han sido estudiados en un buen número de antimicrobianos y se ha demostrado que el segundo es significativamente más largo.

D.2.2.1. Concentraciones subinhibitorias en microorganismos en fase de EPA. se utilizan dos cultivos en fase logarítmica del microorganismo que va a ser estudiado, exponiéndose uno de ellos a la acción del antimicrobiano durante un periodo de tiempo y concentraciones similares a los empleados en el estudio del EPA "in vitro" y dejando el otro como control sin tratamiento. Generalmente suelen utilizarse de 1-10 veces la CMI durante un tiempo de 1-2 horas. La exposición se realiza al igual que en el EPA "in vitro" en matraces con caldo M-H o TSB, a 37°C y con agitación.

Transcurrido ese tiempo, el antimicrobiano se elimina de cultivo tratado mediante centrifugación (10 min. x 2000 g) y posterior eliminación del sobrenadante, añadiendo medio fresco para resuspender las bacterias. Se suele utilizar este método en vez de la dilución para que el número de microorganismos sea el mayor posible, teniendo en cuenta que van a ser reexpuestos a la acción de concentraciones sub-CMI. El cultivo control (no tratado) también se centrifuga.

El cultivo con el antimicrobiano eliminado se divide en 5 alícuotas. En cada una de ella se añaden las concentraciones de antimicrobiano necesarias para alcanzar 1/8 x CMI, 1/4 x CMI, 1/2 x CMI y 1 x CMI, dejando un cultivo sin antimicrobiano. A continuación se incuban todos cultivos en baño a 37°C y con agitación, incluyendo al control (no pre-expuesto y centrifugado). Cada una o dos horas a partir de la eliminación del antibiótico se hace un recuento bacteriano hasta el periodo que consideremos necesario (generalmente, hasta 24 h).

El ECS EPA se calcula según la fórmula :

$$\text{ECS EPA} = T_{PA} - C$$

donde T_{PA} es el tiempo que tardan los cultivos expuestos a las sub-CMI en incrementar 1 \log_{10} de crecimiento a partir del número presente en el tiempo en que se eliminó el antimicrobiano. C es el mismo tiempo pero para el cultivo control, no expuesto a antimicrobiano.

D.2.2.2. Concentraciones subinhibitorias en microorganismos en fase logarítmica de crecimiento: el proceso es igual que en el apartado anterior, pero con la diferencia de que los cultivos no se exponen previamente a la acción del antimicrobiano, sino que se incuban directamente con las sub-CMI. La fórmula empleada es :

$$\text{ECS} = T_S - C$$

donde T_S es el tiempo que tardan los cultivos expuestos a las sub-CMI en incrementar 1 \log_{10} de crecimiento a partir del número presente al principio del experimento. C es el mismo tiempo pero para el cultivo control, no expuesto a sub-CMI.

Mediante los datos obtenidos en estos dos ensayos se puede calcular el EPA "in vitro" y el efecto de las sub-CMI sobre las bacterias en fase de EPA o logarítmica, así como la diferencia entre los retrasos inducidos sobre los dos tipos de microorganismos.

D.2.3. Otros efectos de las concentraciones subinhibitorias

Algunos ejemplos de otros efectos que las concentraciones sub-CMI producen en las bacterias son:

- **Efectos sobre la adhesión a superficies:** algunos estudios han demostrado una disminución significativa de la adherencia de *P. aeruginosa* o *E. coli* al ser tratado con sub-CMI de ciprofloxacino o gentamicina. Otros antimicrobianos como imipenem, tobramicina, metilicina o cefalotina tuvieron también efectos sobre la adhesión.
- **Efectos sobre la actividad del suero y fagocitos:** cepas de *E. coli* y *S. aureus* (resistentes al suero) han demostrado una mayor sensibilidad al éste después de ser tratadas con sub-CMI de algunos antimicrobianos.

- **Efectos sobre la producción de factores de virulencia:** se ha observado la supresión por parte de eritromicina en concentraciones sub-CMI de la producción "in vitro" de exotoxina A, elastasa y fosforilasa de *P. aeruginosa*.

Bibliografía

- Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 4ª edición. Williams & Wilkins. Baltimore, 1996. pp. 52-111.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
- Cahen P, Le Bourgeois M, Delacourt C, Coustere C, Nicaise P, De Blic J, Veron M, Schinmann P, Gaillard JL. Serum bactericidal test as a prognostic indicator in acute pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Paediatrics 91: 451-455, 1993.
- Craig WA, Gudmundsson S. The postantibiotic effect. En: Lorian V (ed). Antibiotics in laboratory medicine, 4ª edición. Williams and Wilkins, Baltimore. 1996. pp. 4296-329.
- Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. En: Lorian V (ed). Antibiotics in laboratory medicine, 4ª edición. Williams and Wilkins, Baltimore, 1996. pp. 330-396.
- Griffin J. Serum inhibitory and bactericidal titers. En: Isenberg HD (ed) Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington, 1992. pp. 5.17.1-5.17.19.
- Hart L. The serum bactericidal test. CME Bull Med Microbiol 1997; 1: 13-15.
- Knapp C, Moody JA. Test to assess bactericidal activity. En: Isenberg HD (ed) Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington. 1992. pp. 5.16.1-5.16.33.
- Leich C, Boonlayangoor S. β -lactamases tests. En: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington. 1992. pp. 5.3.1-5.3.8.
- Leich C, Boonlayangoor S. Tests to detect high-level aminoglycoside resistance in Enterococci. En: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington. 1992. pp. 5.4.1-5.4.9.
- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-584.
- Lorian V, Gemmell CG. Effects of low concentrations of antibiotics on bacterial ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefenses: clinical significance. En: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 4ª edición. Williams & Wilkins. Baltimore, 1996. pp. 397-452.
- Mesa Española de Normalización de la Susceptibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. Rev Esp Quimioter 2000; 13:73-86.
- Murray B. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med 2000; 342:710-721.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 1998. Methodology for the serum bactericidal test. Document M 21-A.. NCCLS, Wayne PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Document M 26-A. NCCLS, Wayne PA.1998.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Document M7-A5. NCCLS, Wayne, PA, 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Document M2-A/. NCCLS, Wayne, PA, 2000.

Odenholt-Tornqvist I, Lowding E, Cars O. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1834-39.

Peterson LR, Schanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents. Technical performance and clinical relevance. *Clin Microb Rev* 5: 420-432, 1992.

Reimer LG, Stratton CW, Reller LB. Minimum inhibitory and bactericidal concentration of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 1050-1055, 1981.

Ryan DM. Studies on the morphology of bacteria in vivo: techniques and chemotherapeutic implications. En: *The influence of antibiotics on the host-parasite III*, Eds. G. Gillissen, W. Opferkuch, G. Peters, G. Pulverer. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989. pp. 55-70.

Schoenknecht FD, Sabath LD, Thornsberry C. Susceptibility tests: Special tests. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WH Jr, Shadomy HJ eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology: 1000-1008, 1985.

Stratton CW . Serum bactericidal test. *Clin Microbiol Rev* 1: 19-26, 1988.

Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. En: Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington: 1563-1577, 1999.

Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, McAllister SK, Clark NC, Hiramatsu K Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36:1020-1027.

Weinbren MJ, Johnson AP, Woodford N. Defining high-level gentamicin resistance in enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:404-405.