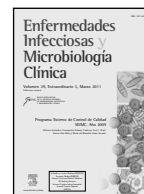




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Contribución del laboratorio de microbiología en la vigilancia y el control de brotes nosocomiales producidos por bacilos gramnegativos no fermentadores

Felipe Fernández-Cuenca^a, Luis E. López-Cortés^a y Jesús Rodríguez-Baño^{a,b,*}

^aUnidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

^bDepartamento de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Palabras clave:

Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumannii
Stenotrophomonas maltophilia
 Bacilos gramnegativos no fermentadores
 Infección nosocomial
 Epidemiología molecular
 Brotes nosocomiales

RESUMEN

Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) de mayor relevancia clínica en los hospitales son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otros. Con frecuencia se trata de microorganismos capaces de causar diversos tipos de infección en pacientes hospitalizados y, sobre todo los dos primeros, de originar brotes clonales extensos y situaciones complejas en las que cepas esporádicas coexisten con cepas epidémicas. Algunas características comunes a todos ellos son su resistencia intrínseca a múltiples antibióticos, su capacidad para desarrollar más resistencias y la posibilidad de existencia de reservorios ambientales. El laboratorio de microbiología tiene un papel fundamental en la detección de posibles brotes causados por estos microorganismos, en la identificación de cepas con mecanismos de resistencia determinados y en la caracterización de la epidemiología local, mediante la detección de portadores y/o de reservorios ambientales, cuando proceda, la adecuada identificación de los aislados, el estudio fenotípico y/o la caracterización genotípica del mecanismo de resistencia, si procede, y, finalmente, mediante la utilización de las distintas técnicas de tipificación molecular de los aislados de BGNNF que se revisan en este artículo. Estas actividades se deben encuadrar dentro de los programas de vigilancia y control de patógenos resistentes en los hospitales y de los grupos multidisciplinares de control de la infección.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumannii
Stenotrophomonas maltophilia
 Nonfermenter bacilli Gram negative
 Nosocomial infection
 Molecular epidemiology
 Nosocomial outbreaks

The microbiology laboratory's contribution to the surveillance and control of outbreaks caused by nonfermentative Gram-negative bacilli

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* are, among others, the most important nonfermentative Gram-negative bacilli within hospitals. These organisms are able to cause different types of nosocomial infections in predisposed patients, and *P. aeruginosa* and *A. baumannii* in particular may cause extensive clonal outbreaks and complex situations in which sporadic isolates may coexist with some epidemic strains. Some common features are their intrinsic resistance to many antimicrobials, their capacity to further develop antimicrobial resistance, and the possibility of environmental reservoirs as sources of these microorganisms in healthcare centers. The microbiology laboratory plays a key role in the detection of potential outbreaks, in the identification of new resistance mechanisms and in the characterization of local epidemiology, by detecting colonized patients and/or environmental reservoirs if needed, appropriately identifying the isolates, phenotypically or genotypically characterizing their mechanisms of resistance, if appropriate, and finally by using different molecular techniques for clonal typing, which are reviewed in this article. Such activities must be performed in the context of the surveillance and control programs of specific institutions and as part of the daily work of multidisciplinary infection control teams.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jesusrb@us.es (J. Rodríguez-Baño).

Introducción

Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) con mayor relevancia clínica son *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y otros, como *Burkholderia cepacia* y *Achromobacter xylosoxidans*¹⁻³. Estos microorganismos son patógenos oportunistas que afectan principalmente a pacientes con enfermedades de base significativas. Entre las características comunes más importantes destacan su gran versatilidad nutricional, que les permite adaptarse eficazmente al ambiente hospitalario, su capacidad para diseminarse desde sus reservorios exógenos (p. ej., soluciones acuosas y superficies inertes) y/o endógenos (principalmente mucosas respiratoria e intestinal de los enfermos), y persistir en el ambiente hospitalario, su resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos y su facilidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos usados con fines terapéuticos⁴⁻⁷. Todas estas características explican, en gran medida, la capacidad que estos patógenos tienen para producir brotes nosocomiales, así como la dificultad para poder controlar dichos brotes y para tratar las infecciones producidas por cepas multi o panresistentes^{6,8,9}.

Entre los BGNNF, el que tradicionalmente ha tenido mayor protagonismo como patógeno nosocomial es *P. aeruginosa*. En datos del sistema de vigilancia de infección nosocomial de Estados Unidos (NHSN), *P. aeruginosa* causó entre 2006 y 2007 el 7,9% de los episodios de infección comunicados, siendo el cuarto en frecuencia tras *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*¹⁰. Su protagonismo es particularmente relevante como causante de infección nosocomial en unidades de pacientes críticos. Así, fue el patógeno más común en las infecciones nosocomiales de las unidades de cuidados intensivos españolas en 2009, en general, y en las neumonías, en particular¹¹. En la bibliografía se han descrito multitud de brotes nosocomiales causados por este microorganismo, con frecuencia asociados a reservorios ambientales húmedos, aunque la transmisión cruzada también juega un importante papel. En los últimos años se describen con frecuencia creciente brotes causados por cepas "extremadamente resistentes", productoras en muchos casos de carbapenemasas^{12,13}. La detección de este mecanismo de resistencia puede ser compleja, así como la detección de la existencia de un brote, ya que son habituales las situaciones mixtas en las que cepas esporádicas coexisten con cepas epidémicas, precisándose de la tipificación molecular para su reconocimiento. El control de estos patógenos tiene un extraordinario interés, dado que es un patógeno virulento presente en los hospitales.

El segundo de estos patógenos en importancia es *A. baumannii*, que causa problemas en los hospitales españoles desde hace años¹⁴. Se trata probablemente del patógeno humano conocido con mayor capacidad para generar resistencias. *A. baumannii* causa desde brotes circunscritos asociados con un reservorio ambiental específico a complejas situaciones de epidemia o pseudoepidemia en los que la existencia de reservorios múltiples (pacientes colonizados, superficies secas, reservorios húmedos) hace muy complejo el control, que precisa de programas globales que incluyen numerosas medidas¹⁵. Finalmente, *S. maltophilia* raramente causa verdaderos brotes clo-

nales, aunque éstos han sido bien descritos. En la mayoría de los casos las cepas de este patógeno aisladas en un hospital son clonalmente diversas y provienen de distintos orígenes ambientales^{2,6}. Se trata de un patógeno oportunista cuya incidencia se asocia fuertemente al consumo de antimicrobianos de amplio espectro en las unidades¹⁶.

La contribución del laboratorio de microbiología al estudio de brotes nosocomiales causados por BGNNF se centra, fundamentalmente, en actividades que son compartidas con otros servicios o unidades, como integrante de la comisión de infecciones y política de antibióticos del hospital, y del equipo de control de infección nosocomial, y en actividades específicas del laboratorio de microbiología, que son las que se analizarán más detenidamente en este trabajo (tabla 1).

Papel del laboratorio de microbiología en la vigilancia y control general de los patógenos resistentes

El laboratorio de microbiología ejerce un papel de centinela en los programas de vigilancia y control de infección nosocomial, y en particular de los programas específicos referidos a los microorganismos resistentes o de especial interés^{17,18}. La información del laboratorio sobre los microorganismos incluidos en estos programas en cada centro debe suministrarse con rapidez al personal del equipo multidisciplinar de control de infección nosocomial encargado de realizar la recogida de datos epidemiológicos, decidir acerca de la necesidad de medidas específicas (precauciones de contacto, limpiezas, etc.) y, en su caso, aconsejar un tratamiento y manejo clínico concretos. En nuestro centro, en cuanto se finaliza la identificación y sensibilidad a los antimicrobianos que se realiza diariamente, se informa por escrito al personal de enfermería y a los clínicos del equipo de control de infección nosocomial sobre el microorganismo y su fenotipo de resistencia, así como los datos de filiación del paciente.

Adicionalmente se recomienda mantener reuniones periódicas (al menos una a la semana) para discutir aspectos de mutuo interés, como la evolución de brotes, las posibilidades de desarrollar estudios de portadores o ambientales, la conveniencia de realizar técnicas de tipificación molecular en determinadas situaciones, etc. Es importante establecer un protocolo de actuación para los fines de semana y festivos, en los que se especifiquen las áreas de responsabilidad y los mecanismos para poner en marcha las medidas de control de infección nosocomial, especialmente en los centros en los que no se posea personal del equipo de control de infecciones de guardia.

Además de su función de centinela en la vigilancia de la infección nosocomial, el laboratorio de microbiología tiene que suministrar información periódica a la comisión de infecciones y al equipo de control de infección nosocomial sobre las tasas de aislamiento de los principales patógenos nosocomiales así como de los porcentajes de resistencia a los principales antimicrobianos de uso clínico. Es útil proporcionar los datos de manera estratificada, diferenciando los aislamientos "nosocomiales" y "comunitarios" (dado que no es posible conocer esta circunstancia en todos los casos, se pueden clasificar

Tabla 1

Actividades comunes del laboratorio de microbiología para el control de los bacilos gramnegativos no fermentadores en el hospital

Rutina (diaria)	Sospecha de brote
Detección de cepas sometidas a vigilancia rutinaria; habitualmente, aquellas con patrón de sensibilidad no habitual o multiresistentes	Conservar los aislados potencialmente implicados
Detección de cepas con patrón sugestivo de metalo-β-lactamasa	Valorar, conjuntamente con el resto del equipo de control, la realización de cultivos de cribado en pacientes, muestras ambientales y, raramente, sanitarios
Detección de posible agrupación temporoespacial de casos (por frecuencia, antibiograma, etc.)	Localmente o en centro de referencia: caracterización de mecanismos de resistencia específicos y estudios de relación clonal
Comunicación de cualquier sospecha al resto del equipo de control de infecciones	

como presuntamente nosocomiales los obtenidos de pacientes ingresados, y como presuntamente comunitarios, los obtenidos de centros de atención primaria, consultas externas o urgencias), y los de las unidades de críticos del resto del centro. Estos informes se deberían realizar con una periodicidad anual o, en centros de gran tamaño, al menos 2 veces al año. Estos informes permitirán a la comisión de infecciones y política de antimicrobianos establecer protocolos de tratamiento empírico adecuados en función de la epidemiología local de las resistencias.

Cuando el equipo de control de infección nosocomial detecte un brote debe actuar con rapidez para establecer su importancia clínica, los posibles reservorios y mecanismos de transmisión involucrados, e instaurar las medidas de control pertinentes. El laboratorio de microbiología debe participar activamente en esta actividad y dar todo el apoyo necesario durante todo el proceso.

Actividades específicas en caso de brote (o sospecha) causado por bacilos gramnegativos no fermentadores

Las actividades específicas del laboratorio de microbiología en el estudio de brotes nosocomiales causados por BGNNF se centran, principalmente, en los siguientes aspectos: identificación bacteriana a nivel de especie, determinación de la sensibilidad a antimicrobianos, detección de mecanismos de resistencia antimicrobiana y tipificación de los aislados¹⁹⁻²¹.

La correcta identificación bacteriana de especie es necesaria porque tanto los mecanismos de resistencia como el comportamiento epidemiológico de los BGNNF dependen no sólo de la especie bacteriana, sino también de las características de la cepa o del clon bacteriano. El laboratorio de microbiología dispone de las herramientas necesarias para poder realizar una identificación adecuada para algunos BGNNF, mientras que para otros BGNNF es necesario utilizar métodos moleculares.

Los BGNNF poseen, en grado variable, resistencia natural o intrínseca de tipo cromosómica a múltiples antimicrobianos de la misma o diferente familia. Esta resistencia se debe a la baja permeabilidad de la membrana externa, mediada por porinas y bombas de expulsión activa, y a la producción de enzimas, como las β -lactamasas de tipo AmpC que hidrolizan o inactivan algunos β -lactámicos^{7,8,19,20}. Sin duda, la detección de mecanismos de resistencia adquirida constituye una de las actividades más interesantes que se realizan en el laboratorio de microbiología. Muchos de los mecanismos de resistencias en BGNNF se transmiten con relativa facilidad y rapidez entre cepas de una misma especie, así como entre especies bacterianas diferentes. Esta transmisión se debe a que los genes o determinantes genéticos que codifican para estos mecanismos de resistencia están localizados en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones y secuencias de inserción.

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por parte del laboratorio de microbiología tiene una gran relevancia desde el punto de vista del tratamiento terapéutico, y permite inferir o predecir qué fenotipos o mecanismos de resistencia subyacen en una determinada cepa bacteriana²¹. Como se verá posteriormente, dependiendo de la especie de BGNNF, pueden haber ciertos problemas metodológicos para determinar la sensibilidad antimicrobiana y de interpretación de los resultados de sensibilidad.

Tanto la identificación a nivel de especie como el fenotipo de resistencia obtenido en el antibiograma pueden tener relativa utilidad como marcadores epidemiológicos para establecer la relación clonal entre las cepas implicadas en un brote, aunque esto no es lo más frecuente. A veces, la aparición de un fenotipo de (multi)resistencia que aparece o se detecta por primera vez en el laboratorio constituye un indicio o sospecha para pensar en la posibilidad de estar ante el inicio o el comienzo de un brote.

Como ocurre con otros patógenos nosocomiales, los métodos moleculares de genotipado tienen mayor poder de discriminación que

los métodos fenotípicos²². La electroforesis en campo pulsado (ECP) constituye el método de referencia de genotipado de los BGNNF²²⁻²⁴. Esta técnica tiene utilidad sobre todo en el estudio de brotes nosocomiales (estudios epidemiológicos locales), pero también en los estudios epidemiológicos globales, en los que interesa conocer otros aspectos adicionales como la estructura poblacional. Como es conocido, las principales limitaciones de la ECP son su elevado coste económico, la necesidad de personal con conocimientos y entrenamiento en técnicas moleculares, el tiempo que se tarda en obtener resultados (4-7 días dependiendo del número de cepas) y el análisis de los resultados (se puede requerir un *software* específico para analizar los patrones de bandas de ADN o pulsotipos).

Hay otros métodos moleculares de genotipado que se pueden utilizar como alternativa o complemento a la ECP y que se fundamentan en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR^{22,23}. Estos métodos son especialmente útiles cuando se quiere obtener información rápida y fiable sobre los posibles focos o reservorio/s de un brote nosocomial, las vías de transmisión y la eficacia de las medidas preventivas puestas en marcha para controlar el brote. Estas técnicas se diferencian de la ECP en que son más rápidas (24-48 h), no se requiere material o metodología específica (la gran mayoría de los laboratorios disponen de un termociclador y de los reactivos necesarios para realizar una PCR y detectar los productos de la PCR) y mayor facilidad para interpretar los patrones de bandas de ADN (menor número de bandas de ADN y con mayor resolución entre bandas). Además, suelen tener un poder de discriminación similar o ligeramente inferior al de la ECP. Los métodos de PCR más usados para realizar la tipificación de BGNNF se basan en la amplificación al azar de regiones cromosómicas (AP-PCR y RAPD-PCR). Esta metodología suele presentar problemas con la reproducibilidad, particularmente con la intensidad de las bandas de ADN, lo que obliga a tener que determinar en cada laboratorio las condiciones metodológicas más óptimas. Otras técnicas de PCR muy utilizadas para tipificar cepas de BGNNF se basan en la amplificación de las regiones separadoras que hay entre determinados elementos genéticos móviles repetidos que se encuentran dispersos por el cromosoma bacteriano. Los elementos repetitivos con mayor utilidad para este propósito son los elementos o secuencias repetitivas palindrómicas extragenéticas (secuencias REP) y las secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (secuencias ERIC). La PCR de estas dianas (REP-PCR y ERIC-PCR) tiene prácticamente las mismas ventajas que la AP-PCR y la RAPD-PCR, aunque a diferencia de éstas presentan menos problemas de reproducibilidad y están además disponibles en formatos semiautomatizados.

Los estudios epidemiológicos globales (multicéntricos, multinacionales) persiguen otros objetivos más complejos, como el conocimiento de la estructura poblacional del patógeno y la modificación de ésta en el tiempo y el espacio. Los métodos moleculares de tipificación usados en este tipo de estudios incluyen la ECP, así como otros métodos, como el AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) o el MLST (*multi locus sequencing typing*), que son mucho más caros y complejos, pero tienen la ventaja de la facilidad para manejar e interpretar los resultados de tipificación y de permitir establecer relaciones clonales en situaciones espaciotemporales más amplias.

Respecto a los cultivos bacteriológicos realizados en la vigilancia ambiental o en portadores entre el personal sanitario, no se deben realizar de manera rutinaria sino exclusivamente cuando haya sospecha o evidencia de que pueden estar involucrados en la transmisión de un patógeno nosocomial. La mayoría de estos estudios son laboriosos, no están estandarizados y son difíciles de interpretar. Las muestras más rentables en los estudios ambientales son las superficies inertes (instrumental y equipos médicos) y las soluciones desinfectantes, entre otras. Para el estudio de la transmisión cruzada en un brote son muy rentables los cultivos de la piel de las manos del personal y los cultivos de superficies húmedas del enfermo (axilas, recto, faringe, etc.).

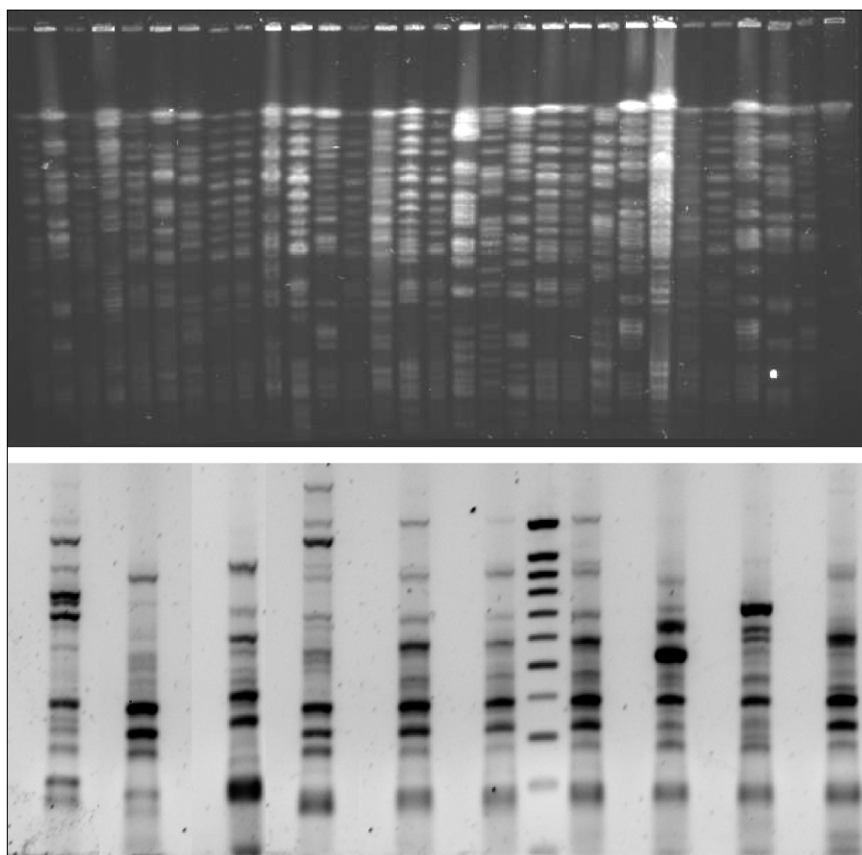


Figura 1. Perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante ECP (A) y REP-PCR (B) en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa

La identificación de la especie de las cepas de *P. aeruginosa* usando los sistemas fenotípicos y bioquímicos convencionales (p. ej., API 20 NE) o los sistemas semiautomatizados de identificación bacteriana (p. ej., Wider, MicroScan, Vitek, etc.) es relativamente sencilla y no suele plantear problemas, excepto cuando las cepas son muy mucosas o cuando crecen muy lentamente.

Las aminopenicilinas, amoxicilina más ácido clavulánico, las cefalosporinas de primera, segunda y algunas de tercera generación (cefotaxima) no necesitan ser probadas en el laboratorio, debido a que las cepas de *P. aeruginosa* son intrínsecamente resistentes a estos β -lactámicos^{7,8,19,20}. En las pruebas de sensibilidad antimicrobiana deben incluirse las penicilinas con actividad frente a *Pseudomonas* (piperacilina sola o asociada a tazobactam), ceftazidima y cefepime, carbapenems, aztreonam, aminoglucósidos (sobre todo tobramicina y amikacina), fluoroquinolonas y colistina.

La adquisición de las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE) en *P. aeruginosa* es relativamente infrecuente, sin llegar a constituir de momento un problema importante en España, por lo que no es necesaria su detección rutinaria o sistemática en el laboratorio. Además, las pruebas fenotípicas de detección de BLEE no están consensuadas o estandarizadas en *P. aeruginosa*.

Estas enzimas son, además, diferentes a las descritas en enterobacterias (no derivan de las de tipo TEM, ni SHV ni CTX).

La pérdida de OprD es quizás el mecanismo de resistencia a carbapenems más prevalente o frecuente en *P. aeruginosa*, aunque tiene mucha menor relevancia clínica, terapéutica y epidemiológica que otros mecanismos de resistencia a carbapenems, como es la adquisición de carbapenemasas de clase B o metalo- β -lactamasas (MBL), particularmente las de tipo VIM e IMP¹³. La importancia de las MBL reside en que: a) hidrolizan con mucha eficacia todos los β -lactámicos, incluido carbapenems, excepto el aztreonam; b) se inhiben en pre-

sencia de agentes quelantes de cationes divalentes, como el EDTA y algunos compuestos derivados de tiol, mientras que los inhibidores clásicos, como el ácido clavulánico y el tazobactam, no afectan la actividad enzimática; c) los genes que codifican estas enzimas pueden movilizarse, sobre todo en integrones, asociados a otros genes de resistencia a antimicrobianos (enzimas modificadoras de aminoglucósidos) y antisépticos (derivados de amonio cuaternario).

Como regla general, siempre hay que confirmar o comprobar los resultados de resistencia a carbapenems usando métodos alternativos o complementarios basados en la difusión en agar, como los discos de antibióticos o las tiras de E-test, debido a los potenciales problemas clinicoepidemiológicos que pueden generarse y a que se han descrito problemas relacionados con la inactivación de los carbapenems (falsos positivos) o con la preparación de suspensiones bacterianas con cepas mucosas²⁵.

La detección fenotípica de resistencia a carbapenems mediada por MBL suele realizarse con discos o tiras que contienen EDTA²⁶. Cuando se utiliza esta metodología hay que ser muy precavidos porque el EDTA tiene actividad intrínseca sobre algunas cepas de *P. aeruginosa* y puede conducir erróneamente a la interpretación de resultados falsos positivos en cuanto a la producción de MBL. Por ello, es muy importante que los resultados fenotípicos positivos se confirmen con métodos moleculares, como los basados en la PCR (p. ej., formato multiplex) o la secuenciación de ácidos nucleicos.

Como se ha comentado anteriormente, la ECP es el método de referencia para determinar la relación clonal entre cepas de *P. aeruginosa* en el contexto de un brote nosocomial²⁷. De los métodos de tipificación molecular basados en la PCR los más usados son la AP-PCR y la REP-PCR (fig. 1)²⁷⁻³³. Estos métodos, además de rápidos, económicos y discriminativos, generan patrones de bandas que son de fácil interpretación. Como principal limitación cabe destacar la necesidad de optimizar estos métodos en cada laboratorio puesto que puede haber problemas de reproducibilidad, sobre todo con la AP-PCR.

Acinetobacter baumannii

La identificación de *A. baumannii* es mucho más compleja que la de *P. aeruginosa*. De las especies de *Acinetobacter* la de mayor importancia clínica y epidemiológica es *A. baumannii*^{5,9}. La diferenciación fenotípica de *A. baumannii* de otras genoespecies pertenecientes al complejo *A. baumannii-A. calcoaceticus* complex resulta prácticamente imposible con los métodos fenotípicos convencionales de identificación bacteriana. Para poder diferenciar las genoespecies de este complejo se requiere el uso de métodos moleculares de identificación bacteriana, como el ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*)³⁴ o la secuenciación del rRNA-16S³⁵.

En términos de resistencia natural, las cepas de *A. baumannii* pueden presentar un patrón de resistencias similar o superior al observado en cepas de *P. aeruginosa*. Respecto a la resistencia adquirida, hay mecanismos comunes a los de *P. aeruginosa* (hiperproducción de AmpC, adquisición de carbapenemasas de tipo MBL, sobreexpresión de bombas, pérdida de porinas, etc.)^{5,7,20}.

La resistencia a carbapenems es también un problema relevante desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Los mecanismos implicados no están tan bien caracterizados como en *P. aeruginosa*, y se han relacionado principalmente con la producción de oxacilinasas^{5,13,20,36,37}. Estas enzimas poseen una discreta actividad carbapenemasa que puede incrementarse por la presencia de promotores fuertes presentes en secuencias de inserción de tipo *ISAbA*. Hasta el momento, la detección de estas carbapenemasas no puede realizarse por métodos fenotípicos fiables y se requiere la utilización de métodos moleculares basados en la PCR múltiple y la secuenciación.

Aunque se han descrito otros mecanismos de resistencia a carbapenems en *A. baumannii* (pérdida de porinas, sobreexpresión de bombas de expulsión activa y alteraciones en proteínas fijadoras de penicilina)³⁸, aún se desconoce su contribución específica en la resistencia a carbapenems y su relevancia clínica.

Los problemas metodológicos más importantes para determinar la sensibilidad antimicrobiana en *A. baumannii* son la elevada tasa de errores mayores que se producen con la difusión con discos en comparación con los métodos de microdilución en caldo y el crecimiento en forma de cola de cometa cuando se usa la microdilución³⁹. En el caso concreto de los carbapenems se han descrito otros problemas adicionales, como la detección fenotípica de cepas productoras de carbapenemasas del tipo MBL^{40,41} o la detección de cepas con fenotipo de resistencia heterogénea a carbapenems⁴².

La detección de MBL con métodos fenotípicos, particularmente los basados en el efecto inhibitorio del EDTA, no es fiable y no se recomienda debido a los problemas que esta técnica tiene por la actividad intrínseca del EDTA y por la interacción del EDTA con las carbapenemasas de tipo oxacilinasas^{40,41}. Por lo tanto, la detección de MBL sólo debería realizarse con métodos moleculares rápidos, como la PCR múltiple, similares a los descritos en *P. aeruginosa*.

El fenotipo de resistencia heterogénea a carbapenems es relativamente frecuente en España y sólo puede ponerse de manifiesto utilizando métodos de difusión en agar y discos o tiras de E-test cargados con carbapenems⁴². Este fenotipo se detecta por la visualización de colonias que crecen en el interior de los halos de inhibición.

Como sucede con otros BGNMF, el ECP es el método de referencia para tipificar o diferenciar clones de *A. baumannii*^{43,44}. Con la AP-PCR hay menos experiencia que con *P. aeruginosa* y plantea los mismos problemas de reproducibilidad. La REP-PCR es posiblemente el método de genotipado más rápido con utilidad en estudios epidemiológicos moleculares en los que está implicado *A. baumannii*. Los patrones de bandas de ADN son también relativamente fáciles de interpretar (fig. 2)⁴⁴. La automatización posiblemente facilite este tipo de estudios, sobre todo cuando está implicado un número importante de cepas, a costa de incrementar el coste económico de la prueba⁴⁵.

Independientemente del método usado para tipificar *A. baumannii*, en la mayoría de los brotes se ha implicado un escaso número de

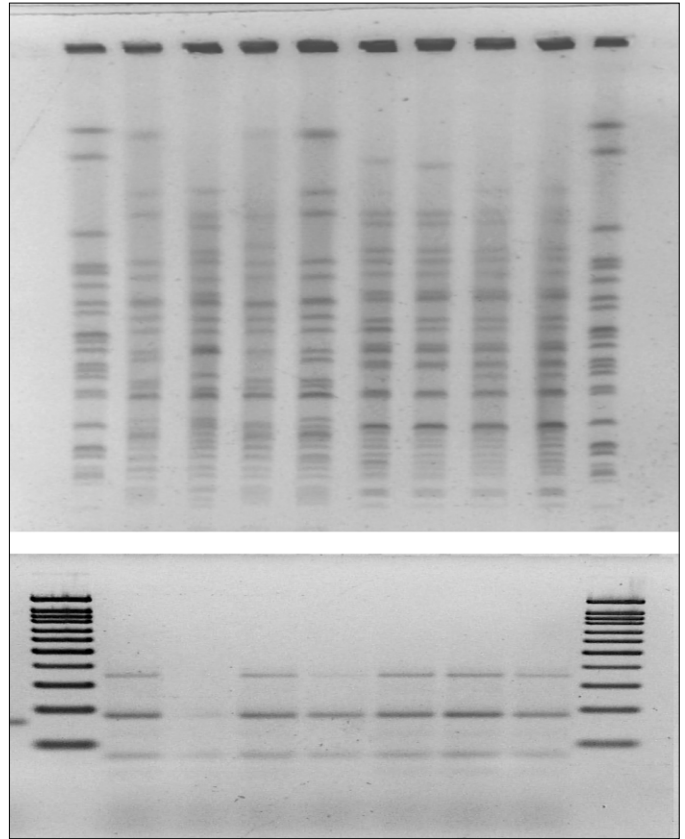


Figura 2. Perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante ECP (A) y REP-PCR (B) en cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*.

cepas (clones europeos I, II y III) con comportamiento epidémico, aunque se han descrito brotes policlonales en los que coexisten cepas epidémicas y cepas esporádicas⁴⁶⁻⁴⁹.

Stenotrophomonas maltophilia y otros bacilos gramnegativos no fermentadores

La identificación de este patógeno con los métodos fenotípicos convencionales no suele plantear problemas. De hecho, el patrón de resistencia a carbapenems y sensibilidad a cotrimoxazol es relativamente característico y específico de esta especie bacteriana, por lo que suele usarse para su identificación preliminar.

La resistencia intrínseca es muy superior a la de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, aunque los mecanismos generales de resistencia son muy similares a los de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*^{7,50,51}. Las cepas de *S. maltophilia*, a diferencia de las cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, son resistentes a los aminoglucósidos por la presencia de una enzima modificadora de aminoglucósidos que se expresa de forma constitutiva. Además, *S. maltophilia* posee 2 β -lactamasas inducibles, 1 carbapenemasa de tipo MBL, y 1 cefalosporinasa de clase A, tipo TEM.

Los principales problemas relacionados con los métodos de determinación de la sensibilidad antimicrobiana son: a) la baja reproducibilidad de los métodos de difusión con discos; b) el fenómeno de la resistencia mediada por temperatura (la sensibilidad a los aminoglucósidos, las quinolonas y la colistina se reduce cuando la prueba se realiza a 30 °C), y c) la presencia de cationes divalentes también afecta la sensibilidad a los β -lactámicos, generando valores de CMI más elevados^{21,52,53}. Se recomienda determinar la sensibilidad a piperacilina/tazobactam, ceftazidima y levofloxacino, dado que algunas cepas pueden presentar sensibilidad a estos antimicrobianos^{52,53}.

Respecto a los estudios de brotes nosocomiales, los métodos de genotipado más rentables son muy similares a los usados con *P. aeru-*

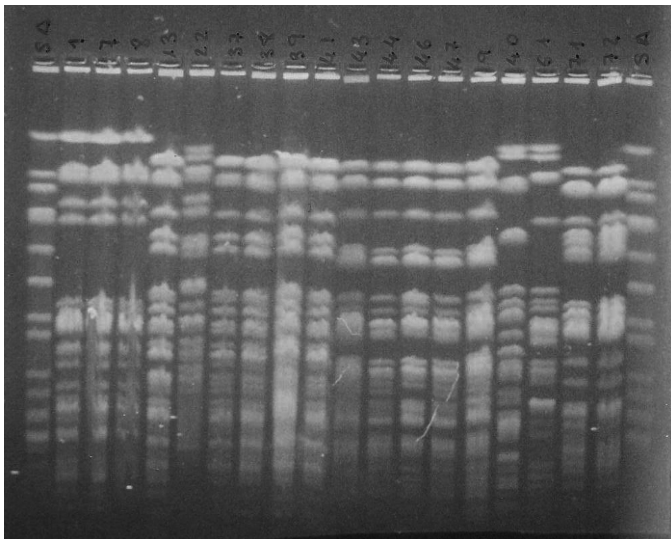


Figura 3. Perfiles de bandas de ADN obtenidos mediante ECP en cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*.

ginosa y *A. baumannii*⁵⁴⁻⁵⁷. La RAPD-PCR y la REP-PCR son alternativas útiles y prácticas a la ECP (fig. 3), con las mismas ventajas y limitaciones que las descritas para otros BGNNF.

Otros BGNNF asociados o implicados en brotes nosocomiales son *B. cepacia*, *Pseudomonas putida*, *A. xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis*, especies todas ellas ambientales que sirven como reservorios de genes de resistencia antimicrobiana y que tienen la capacidad para producir brotes nosocomiales^{32,58-61}. La identificación fenotípica de estas especies, particularmente las del complejo *B. cepacia*, puede ser compleja⁶². Respecto a los métodos de tipificación molecular, no dicho anteriormente para *S. maltophilia* es aplicable a estos BGNNF.

Agradecimientos

Agradecemos la cesión de las imágenes a José Manuel Rodríguez, Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla (fig. 1); Carmen Velasco, Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla (fig. 2), y María Dolores del Toro, Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen Macarena (fig. 3).

Financiación

Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III - cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RDO6/0008).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi drug resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect.* 2006;64:7-15.
2. Paez JI, Costa SF. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect.* 2008;70:101-8.
3. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros.* 2007;6:75-8.
4. Veessenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med.* 2009;37:1777-86.
5. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:538-82.

6. Del Toro MD, Rodríguez-Baño J, Herrero M, Rivero A, García-Ordóñez MA, Corzo J, et al. Clinical epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* colonization and infection: a multicenter study. *Medicine (Baltimore).* 2002;81:228-39.
7. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control.* 2006;34 5 Suppl 1:S29-37.
8. El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:229-38.
9. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:751-62.
10. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. Antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centres for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:996-1011.
11. Sociedad Española de Medicina Intensiva crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC). Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de Medicina Intensiva [consultado, 25-6-2010]. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/Helo/ENVIN-UCI%20Informe%202009.pdf>.
12. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, et al. Controlling the spread of carbapenem producing Gram negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:102-11.
13. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.
14. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, et al. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25:819-24.
15. Rodríguez-Baño J, García L, Ramírez E, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Fernández-Cuenca F, et al. Long term control of hospital wide endemic multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. *Am J Infect Control.* 2009;37:715-22.
16. Safdar A, Rolston KV. *Stenotrophomonas maltophilia*: changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2007; 45:1602-9.
17. Cantón R. Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:3-8.
18. Struelens MJ, Denis O, Rodríguez-Villalobos H. Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes Infect.* 2004;6:1043-8.
19. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:582-610.
20. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2006;43 Suppl 2:S49-56.
21. Vila J, Marco F. Interpretative reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:304-10.
22. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:512-30.
23. Fernández-Cuenca F. Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355-60.
24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18:426-39.
25. Carmeli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, DeGirolami P, et al. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1998;36:595-7.
26. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3139-44.
27. Kayabas U, Bayraktar M, Otlu B, Ugras M, Ersoy Y, Bayindir Y, et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed field gel electrophoresis-based epidemiologic study. *Am J Infect Control.* 2008;36:33-8.
28. Blanc DS, Francioli P, Zanetti G. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care units - A review. *Open Microbiol J.* 2007;1:8-11.
29. Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med.* 2002;162:1483-92.
30. Mateos I, Valencia R, Torres MJ, Cantos A, Conde M, Aznar J. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* endophthalmitis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27:1249-51.
31. Srinivasan A, Wolfenden LL, Song X, Mackie K, Hartsell TL, Jones HD, et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with flexible bronchoscopes. *N Engl J Med.* 2003;348:221-7.
32. Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology paediatric unit. *J Hosp Infect.* 2007;65:47-53.
33. Adachi JA, Perego C, Graviss L, Dvorak T, Hachem R, Chemaly RF, et al. The role of interventional molecular epidemiology in controlling clonal clusters of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill cancer patients. *Am J Infect Control.* 2009;37:442-6.
34. Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vanechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol.* 1998;21:33-9.
35. Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vanechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*

- complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1632-9.
36. Poiré L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:826-36.
 37. Poiré L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:24-38.
 38. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1210-5.
 39. Swenson JM, Killgore GE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5102-8.
 40. Loli A, Tzouveleki LS, Gianneli D, Tzelepi E, Miriagou V. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1894-6.
 41. Segal H, Elisha BG. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:598.
 42. Fernández-Cuenca F, Egea P, López-Cerero L, Díaz-De Alba P, Vila J, Pascual A. Comparison of 3 methods for determining sensitivity to imipenem and meropenem in *Acinetobacter baumannii* with a carbapenem heteroresistant phenotype. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:485-8.
 43. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Van der Reijden T, Van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4328-35.
 44. Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:635-43.
 45. Carretto E, Barbarini D, Farina C, Grosini A, Nicoletti P, Manso E, et al. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive sequence based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60:1-7.
 46. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:233-8.
 47. Van den Broek PJ, Van der Reijden TJ, Van Strijen E, Helmig-Schurter AV, Bernards AT, Dijkshoorn L. Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8 year survey. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3593-9.
 48. Rodríguez-Baño J, García L, Ramírez E, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Fernández-Cuenca F, et al. Long term control of hospital wide, endemic multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. *Am J Infect Control.* 2009;37:715-22.
 49. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, Van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2007;45:453-60.
 50. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:57-80.
 51. Li XZ, Zhang L, Poole K, SmeC, an outer membrane multidrug efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:333-43.
 52. Krueger TS, Clark EA, Nix DE. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001;41:71-8.
 53. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquera F, Cantón R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1581-4.
 54. Yao JD, Conly JM, Kraiden M. Molecular typing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2195-8.
 55. Marty N. Epidemiological typing of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Hosp Infect.* 1997;36:261-6.
 56. Labarca JA, Leber AL, Kern VL, Territo MC, Brankovic LE, Bruckner DA, et al. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogeneic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. *Clin Infect Dis.* 2000;30:195-7.
 57. Souza Dias MB, Habert AB, Borrasca V, Stempliuk V, Ciolli A, Araujo MR, et al. Salvage of long term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated heparin catheter lock solution. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:125-30.
 58. Almuzara M, Matteo M, Cittadini R, Bertona E, Armitano R, Catalano M, et al. Outbreak of *Alcaligenes faecalis* pseudobacteremia in neonatology and paediatric units. *J Hosp Infect.* 2010;74:397-9.
 59. Lin YH, Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Comparison of polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in a burn unit. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1997;28:173-8.
 60. Molina-Cabrillana J, Santana-Reyes C, González-García A, Bordes-Benítez A, Horcajada I. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:435-7.
 61. Tena D, Carranza R, Barberá JR, Valdezate S, Garrancho JM, Arranz M, et al. Outbreak of long term intravascular catheter related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:727-32.
 62. Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3427-36.