



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Antibiograma rápido en Microbiología Clínica



Gabriel Alberto March Rosselló^{a,*} y Miguel Ángel Bratos Pérez^{a,b}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 25 de junio de 2014

Aceptado el 15 de noviembre de 2014

Palabras clave:

Antibiograma rápido

Antibiograma directo

Sensibilidad

R E S U M E N

Los métodos más frecuentemente utilizados en Microbiología Clínica para la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se basan en un estudio fenotípico, observando el crecimiento bacteriano de la cepa incubada en presencia del antibiótico a estudiar. Estos métodos requieren normalmente un tiempo de unas 24 h para la obtención de resultados. El objetivo de este trabajo es revisar el fundamento y los resultados de las principales técnicas instrumentales que proporcionan un antibiograma rápido. De manera pormenorizada se exponen datos relativos a técnicas moleculares, citometría de flujo, quimioluminiscencia, espectrometría de masas, métodos comerciales utilizados en el trabajo de rutina, métodos colorimétricos, nefelometría, *microarrays*, microfluidos y métodos de lisis bacteriana

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Rapid antibiotic susceptibility test in Clinical Microbiology

A B S T R A C T

The most widely used antibiotic susceptibility testing methods in Clinical Microbiology are based on the phenotypic detection of antibiotic resistance by measuring bacterial growth in the presence of the antibiotic being tested. These conventional methods take typically 24 hours to obtain results. A review is presented here of recently developed techniques for the rapid determination of antibiotic susceptibility. Data obtained with different methods such as molecular techniques, flow cytometry, chemiluminescence, mass spectrometry, commercial methods used in routine work, colorimetric methods, nephelometry, *microarrays*, microfluids, and methods based on cell disruption and sequencing, are analyzed and discussed in detail.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

En los laboratorios de Microbiología Clínica, la identificación microbiana y la determinación de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos son tareas con un gran impacto en el manejo del paciente infectado. Los métodos utilizados para la determinación de la sensibilidad se basan en un estudio fenotípico, observando el crecimiento bacteriano de la cepa incubada en presencia del antibiótico a estudiar. Estos métodos incluyen dilución en agar, macrodilución y microdilución en caldo, tiras con un

gradiente de antibiótico y difusión disco-placa. La microdilución en caldo es la técnica utilizada por los diversos sistemas automatizados comerciales como el MicroScan Walkaway (Siemens, Nueva York, EE. UU.), Phoenix (BD Diagnostics, Sparks, MD, EE. UU.) o VITEK (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)¹. Para la interpretación de los resultados de sensibilidad obtenidos mediante las técnicas anteriormente citadas se siguen las normas del antibiograma publicadas por diversos organismos, como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)² y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)³. En el trabajo de rutina, todas estas técnicas se aplican a partir de las colonias crecidas en las placas de aislamiento; los métodos Phoenix y VITEK, que son los más rápidos, requieren un tiempo medio mínimo de 9 h para obtener los resultados⁴. Dado que las infecciones graves requieren la administración de

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gmr810@hotmail.com (G.A. March Rosselló).

antibióticos con la mayor prontitud posible⁵, el objetivo de este trabajo es revisar las diferentes técnicas instrumentales aplicadas en Microbiología Clínica para la obtención de un antibiograma rápido, tanto a partir de las colonias, como directamente a partir de diferentes muestras.

Para llevar a cabo la determinación de la sensibilidad de forma rápida se han utilizado diversas técnicas instrumentales, como son técnicas moleculares (incluyendo la secuenciación del genoma completo), citometría de flujo, quimioluminiscencia, espectrometría de masas, métodos comerciales utilizados en la rutina de trabajo, métodos colorimétricos, nefelometría, *microarrays*, microfluidos o métodos de lisis bacteriana. El objetivo de esta revisión es exponer el fundamento de cada una de estas técnicas y los principales resultados obtenidos.

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares permiten la detección de material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN). De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la que ha adquirido un mayor valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes infecciosos, además de caracterizar sus genotipos de virulencia y de resistencia⁶. El primer paso de la PCR consiste en una extracción del material genético, seguido de la desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde, el anillamiento de cebadores sintéticos y la extensión catalizada por la ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores. Este proceso de 3 pasos se repite un número determinado de veces (de 25 a 35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN, lo que le confiere una elevada sensibilidad⁷.

Los importantes avances en el conocimiento de las bases genéticas de la resistencia a antibióticos han permitido que distintas PCR puedan detectar, en unas horas, la presencia de genes de resistencia a una gran variedad de antibióticos para un gran número de especies bacterianas⁸. Además, la PCR a tiempo real ha sido utilizada para monitorizar el crecimiento bacteriano mediante la detección de los genes de resistencia cuando las bacterias han sido incubadas en presencia del antibiótico a ensayar^{9,10}.

Se han comercializado numerosos ensayos basados en técnicas moleculares para la detección de genes de resistencia a partir del frasco de hemocultivo crecido. Para la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina se puede utilizar el sistema GeneXpert MRSA/SA (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE. UU.) o el Staph ID/R Blood Culture Panel (Great Basin Diagnostics, Salt Lake City, UT, EE. UU.). Estos sistemas requieren una hora para realizar las determinaciones y presentan una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100%^{11–13}. El sistema GeneOhm Staph SR (Becton Dickinson, Maryland, EE. UU.) es otro sistema que permite la detección de *S. aureus* y su resistencia a meticilina, también con una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100%. Sin embargo, este sistema requiere 2 h^{14,15}. En la detección de bacterias grampositivas, el sistema Verigene BC-GP Blood Culture Nucleic Acid Test (Nanosphere, Northbrook, IL, EE. UU.) es capaz de detectar estafilococos, estreptococos, enterococos, micrococcos y *Listeria* spp., así como la resistencia a meticilina en estafilococos y a vancomicina en enterococos. Este sistema requiere 3 h para proporcionar un resultado y muestra una sensibilidad y una especificidad muy cercanas al 100%¹⁶. En la detección de bacterias (grampositivas y gramnegativas) y levaduras, el sistema FilmArray Blood Culture Identification panel (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, EE. UU.) realiza una PCR múltiple que permite detectar, en una hora, 15 géneros bacterianos, 11 especies bacterianas y 5 especies de levaduras, y además

los genes de resistencia *mecA*, *vanA/B* y *bla_{KPC}*. La sensibilidad va del 83 al 100% y la especificidad es >99%, dependiendo del patógeno estudiado¹⁷. Hyplex BloodScreen PCR ELISA (Amplex BioSystems, Giessen, Alemania) es un sistema que detecta varias especies bacterianas grampositivas y gramnegativas, además de la presencia del gen *mecA*. Esta metodología incluye una PCR en la que se amplifica el gen que codifica para el ARNr 16S; seguidamente, el producto de amplificación de la PCR es detectado mediante un ensayo enzimático del tipo del *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Este sistema requiere un tiempo de 6 h y presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92,5 al 100% para la detección de bacterias gramnegativas, una sensibilidad del 96,6 al 100% y una especificidad del 100% para bacterias grampositivas, y una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina¹⁸.

Otra técnica molecular disponible para realizar un antibiograma rápido es la secuenciación del genoma completo. Los avances en la secuenciación del ADN han posibilitado secuenciar un genoma bacteriano completo en horas. Una vez obtenida esta gran cantidad de datos, los programas bioinformáticos se encargan de su procesamiento y análisis. De este modo, esta técnica puede utilizarse para el estudio de determinantes genéticos de resistencias a antibióticos^{19,20}. Además, Zankari et al.²¹ utilizan la secuenciación del genoma completo para caracterizar los perfiles de resistencia de 200 aislados bacterianos pertenecientes a 4 especies bacterianas. Cuando comparan los resultados obtenidos mediante secuenciación con los obtenidos mediante métodos fenotípicos obtienen un 99,74% de concordancia, demostrando así que la sensibilidad obtenida mediante secuenciación puede correlacionar bien con la sensibilidad obtenida mediante métodos fenotípicos.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un proceso que permite que las partículas (generalmente células) pasen en fila dentro de un flujo a través del aparato con una intensidad de 500–4.000 partículas/s. Cuando esto sucede, es posible realizar la medición simultánea de múltiples características de una sola célula, de tal forma que es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto²². A principios de la década de los ochenta aparecen los primeros estudios en los que se demuestra la aplicación de la citometría de flujo fluorescente en la determinación de la sensibilidad de bacterias^{23,24}. Posteriormente se han utilizado otros fluorocromos con el fin de obtener información sobre diversos parámetros bacterianos, como el potencial de membrana, el tamaño celular, la cantidad de ADN o la actividad enzimática²⁵. Ramani y Chaturvedi²⁶ determinan la sensibilidad de distintas especies de levaduras a anfotericina B y fluconazol. Al cabo de unas horas de incubación de las levaduras en presencia de los antifúngicos se añade yoduro de propidio, que solo tiñe los microorganismos con alteraciones en la membrana y, por lo tanto, con deterioro celular. La CMI por citometría de flujo se define como la mínima concentración de antifúngico que proporciona un incremento del 50% de la señal de fluorescencia comparada con la señal obtenida a partir de la disolución control (levadura incubada sin la presencia del antifúngico). Los resultados obtenidos de sensibilidad mediante citometría de flujo son rápidos (6 h como máximo, dependiendo de la cepa a estudiar), reproducibles y estadísticamente comparables con los obtenidos por el método de macrodilución en caldo, que es el método de referencia indicado por el CLSI². Shrestha et al.²⁷ logran diferenciar, en 4 h, entre cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a meticilina mediante histogramas en los que se representa la luz dispersa en un ángulo de 90 grados (SSC) frente a la señal de fluorescencia. Broeren et al.²⁸ calculan la CMI mediante el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i de *Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* frente a amoxicilina, gentamicina y piperacilina. Definen la CMI por citometría de flujo como la mínima concentración de antibiótico que proporciona una reducción del 80% del recuento bacteriano a los 240 min de incubación comparado con el recuento del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo concuerdan en un 100% con los obtenidos mediante los sistemas comerciales VITEK2, E-test y macrodilución en caldo. En micobacterias, Pina-Vaz et al.²⁹ determinan la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol. Después de 3 días de incubación en presencia del antituberculoso en el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.), los microorganismos se tiñen con el fluorocromo SYTO 16, que solo penetra en las células con alteración de la membrana celular y, comparando la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida a partir de estos microorganismos con la obtenida a partir de microorganismos incubados durante el mismo tiempo sin la presencia del antituberculoso, se puede diferenciar entre cepas sensibles, intermedias o resistentes, obteniendo unos resultados que muestran una excelente concordancia con los obtenidos mediante una incubación de unas 3 semanas en el sistema BACTEC MGIT 960. Kirk et al.³⁰ determinan la sensibilidad de *M. tuberculosis* estudiando la habilidad de la micobacteria para hidrolizar, mediante estereras, el sustrato diacetato de fluoresceína que pasa a fluoresceína, compuesto que emite fluorescencia cuando se excita con luz de longitud de onda adecuada. Si la micobacteria es sensible al antituberculoso, la capacidad hidrolítica de la micobacteria disminuye y, por lo tanto, la señal de fluorescencia detectada también disminuye. Comparando la señal de fluorescencia y la luz dispersa a 90 grados detectada mediante citometría de flujo obtenidas a partir de micobacterias sin contacto con el antituberculoso con las señales obtenidas a partir de micobacterias con una incubación de tan solo 24 h con isoniazida, etambutol y rifampicina, obtienen concordancias del 95, del 92 y del 83%, respectivamente, con respecto al antibiograma obtenido mediante el método de las proporciones.

Cohen y Sahar³¹ diseñan un procedimiento, mediante citometría de flujo, para la detección bacteriana y el estudio de la sensibilidad a amikacina a partir de 43 muestras clínicas y obtienen, en menos de 2 h, una sensibilidad del 74% y una especificidad del 88% para la detección de bacterias y una concordancia del 92% en la sensibilidad a amikacina. Por otra parte, Gauthier et al.³² realizan un antibiograma mediante citometría de flujo a partir de muestras de orina. Para ello, usan 2 fluorocromos, el yoduro de propidio y el bis-(1,3-dibutilbarbiturato) trimetilnaoxonol o DiBAC4(3); este último penetra en las células que presentan la membrana despolarizada, y ambos aumentan la señal cuando la célula no es viable. Analizan 114 muestras de orina y realizan las mediciones de la señal fluorescente tras una incubación de 2 h en la presencia de los diferentes antibióticos. De este modo obtienen un 2% de discrepancias con respecto a la sensibilidad determinada mediante microdilución en caldo.

Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia es un proceso de relajación radiante que tiene lugar cuando en una reacción química se genera una especie excitada electrónicamente. La bioluminiscencia es una forma de quimioluminiscencia que aparece como consecuencia de una reacción química que tiene lugar en los organismos vivos, como por ejemplo luciérnagas (insectos de la familia *Lampyridae*). En esta reacción química, la sustancia luminiscente luciferina es oxidada, en presencia de adenosín trifosfato (ATP), por la acción catalítica de la enzima luciferasa. El sistema bioluminiscente de las luciérnagas tiene muchas aplicaciones analíticas, dado que la enzima

luciferasa posee una gran especificidad por determinados sustratos y, además, la cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP de la reacción³³. Los trabajos realizados sobre la determinación de la sensibilidad bacteriana mediante bioluminiscencia se fundamentan en la medida de los niveles de ATP bacteriano de origen intracelular, extracelular o total. Para calcular la CMI mediante bioluminiscencia se compara la señal de ATP obtenida a partir de microorganismos incubados sin la presencia de antibiótico (grupo control) con la señal obtenida a partir de microorganismos incubados en presencia de antibiótico a diferentes tiempos, formulando así diferentes criterios de sensibilidad^{34,35}. Con respecto al grupo control, si se mide el ATP intracelular las cepas sensibles al antibiótico estudiado van a proporcionar una disminución de la señal de bioluminiscencia³⁶; si se mide el ATP extracelular las cepas sensibles van a producir un aumento de la señal³⁷, y si se mide el ATP total la cepas sensibles van a proporcionar una disminución de la señal de ATP^{34,35}. En cambio, si el microorganismo es resistente al antibiótico las medidas del grupo control serán prácticamente iguales que las obtenidas a partir de las cepas a estudiar. Para determinar la sensibilidad en bacterias se requieren unas 4 h y se obtienen unas CMI muy similares a las obtenidas a partir de la dilución en medio sólido^{34,35,37}. En el caso de micobacterias, en un tiempo mínimo de 5 días se obtiene una concordancia prácticamente del 100% con respecto al método de las proporciones y a los métodos radiométricos^{33,38,39}. En la literatura se encuentran escasos trabajos de determinación de la sensibilidad en levaduras mediante bioluminiscencia. En estos se apunta que con una incubación de aproximadamente 5 h se obtiene un acuerdo del 100% con respecto a la CMI obtenida mediante macrodilución⁴⁰. También se ha demostrado que, mediante bioluminiscencia, es posible determinar la sensibilidad a antibióticos monitorizando la actividad de la enzima adenilato quinasa. Para ello se añade adenosín difosfato (ADP) a los cultivos bacterianos incubados con y sin antibiótico durante 6 h; el ADP se transforma en ATP por acción de la enzima adenilato quinasa, y finalmente este se mide mediante bioluminiscencia. Si la cepa es sensible al antibiótico, la actividad de la enzima se verá disminuida y la señal obtenida a partir del ATP será menor que la obtenida a partir de las cepas incubadas sin antibiótico; si la cepa es resistente, la señal obtenida a partir del ATP será muy similar, tanto en las cepas incubadas con antibiótico como en las que no⁴¹.

Ivancic et al.⁴² realizan un antibiograma directamente a partir de muestras de orina mediante bioluminiscencia en el que ensayan 85 muestras monobacterianas y estudian los antibióticos ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina, nitrofurantoína, trimetropima-sulfametoxazol y vancomicina. Para la realización del antibiograma primero es preciso eliminar el ATP presente en la orina de origen no bacteriano y después realizar la extracción del ATP bacteriano intracelular. Para estudiar la sensibilidad comparan la señal de ATP procedente de una alícuota de orina con cultivo positivo sin antibiótico con la señal de ATP procedente de otra alícuota de la misma orina que ha estado incubada durante 2 h con antibiótico. De esta manera logran un 91% de concordancia con la CMI obtenida a partir de la colonia mediante dilución en caldo.

A diferencia de la bioluminiscencia, la quimioluminiscencia solo requiere la adición de menadiona al cultivo del microorganismo, pudiendo prescindir de la rotura celular. La membrana bacteriana es permeable a esta molécula, y en el interior del microorganismo la menadiona es reducida, generándose diversos compuestos que difunden al medio extracelular, donde se autooxidan y emiten fotones de luz^{43,44}. A finales de la década de los ochenta aparecen diversas publicaciones en las que se apunta que la quimioluminiscencia es una herramienta útil para el estudio de la viabilidad de células y microorganismos^{45,46}. La viabilidad de los microorganismos se predice comparando la señal quimioluminiscente de

cepas incubadas con antibióticos con la de cepas incubadas sin antibióticos a diferentes tiempos, proponiendo así diferentes criterios de sensibilidad^{47–50}. Lógicamente, si la cepa es sensible al antibiótico estudiado, se detectará una señal mucho menor que la obtenida a partir del cultivo sin antibiótico. A partir del año 2000 aparecen numerosos trabajos en los que se realiza un antibiograma rápido mediante quimioluminiscencia. Para bacterias, con una incubación de unas 4 h se obtiene desde un 88% hasta un 100% de acuerdo entre la CMI obtenida mediante quimioluminiscencia y la obtenida mediante macrodilución o microdilución en caldo^{47,48,50}. Mediante quimioluminiscencia también es posible, con un tiempo de 8 h, detectar cepas de *S. aureus* intermedias y heterorresistentes a vancomicina⁴⁹. De igual forma, con esta metodología se ha observado que linezolid disminuye, a las 4 h de incubación, la intensidad de la señal de quimioluminiscencia por igual en cepas sensibles a linezolid que presentan diferentes sensibilidades a vancomicina⁵¹. Finalmente, en micobacterias se ha observado que se necesitan como mínimo 4 días para poder llevar a cabo la determinación de la sensibilidad⁵².

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una herramienta basada en espectrometría de masas que permite obtener en unos minutos la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos filamentosos. La denominación «MALDI» proviene de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, y «TOF» alude al analizador de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (*time of flight*)⁵³. Para realizar el análisis mediante MALDI-TOF es necesario que las proteínas de los microorganismos se ionicen. Para ello, las colonias de microorganismos se depositan sobre la placa portamuestras, y a continuación sobre esa muestra se deposita una disolución matriz. A continuación, la placa es introducida en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de un láser de longitud de onda en la zona ultravioleta del espectro, con lo que la matriz absorbe la energía del láser produciéndose la sublimación del analito y de la matriz. Ya en fase gaseosa, la estabilización de la matriz tiene lugar mediante la liberación de protones que, en parte, son captados por las proteínas de las bacterias, generándose fragmentos de proteínas con carga positiva. Mediante un electrodo se genera un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas. De esta forma, los iones entran en un tubo (de 1 a 4 m de longitud) con la misma energía cinética y siguiendo una trayectoria lineal. Así, el tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a la relación masa/carga (m/z) de los mismos. En última instancia está el detector de los iones previamente separados. Si la carga (z) es igual a uno, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI-TOF, el espectro de masas es la representación de la intensidad frente a la masa de los iones formados^{54,55}. El sistema MALDI-TOF realiza la identificación rápida de microorganismos mediante el método de la «huella peptídica». En este método, las proteínas del microorganismo a identificar son hidrolizadas en pequeños péptidos y se obtiene el correspondiente espectro de masas del hidrolizado, que se conoce con el nombre de huella peptídica. Esta huella, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos, de tal forma que la huella problema se puede asociar con la huella más semejante y obtener así la identificación del microorganismo^{56,57}.

En referencia al antibiograma rápido, el sistema MALDI-TOF permite predecir en unas horas si las bacterias poseen enzimas que degradan los antibióticos. Para ello, los microorganismos

previamente aislados en las placas de cultivo deben ser incubados durante un tiempo con el antibiótico. Posteriormente, con el análisis realizado mediante el sistema MALDI-TOF se observa, en caso de que el microorganismo posea la enzima responsable de la degradación del antibiótico, la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la rotura del antibiótico. En caso de que la bacteria no hidrolice el antibiótico, se observa únicamente el pico correspondiente al antibiótico. Mediante este procedimiento ha sido posible detectar diferentes carbapenemasas^{58–61}. Esta misma metodología también ha sido aplicada directamente a partir de frascos de hemocultivo crecidos preparados artificialmente con cepas previamente caracterizadas⁶². También es posible predecir la resistencia a cloranfenicol y clindamicina mediante la detección de la metilación del ARNr 16S llevada a cabo por metiltransferasas⁶³. Por otra parte, se ha observado que tanto las cepas de *S. aureus* sensibles a metilicina como las resistentes proporcionan unos picos de identificación específicos⁶⁴. De esta forma, a partir de una base de datos, normalmente elaborada en el propio laboratorio, es posible diferenciar entre cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a metilicina⁶⁵. De la misma manera, el sistema MALDI-TOF también permite discriminar entre cepas de enterococos resistentes y sensibles a vancomicina⁶⁶. Finalmente, es posible estudiar la sensibilidad mediante la incubación de microorganismos con antibiótico en un medio con isótopos marcados. Si el microorganismo es resistente, este incorporará el isótopo que posteriormente podrá ser detectado mediante el sistema MALDI-TOF⁶⁷.

Métodos comerciales

También se han empleado diferentes métodos comerciales utilizados en la rutina de trabajo del laboratorio de Microbiología Clínica para llevar a cabo un antibiograma directamente a partir de diferentes muestras clínicas. Las tiras comerciales con un gradiente de antibiótico se han utilizado para realizar un antibiograma a partir de muestras respiratorias. Para ello las muestras se siembran en placas de agar Mueller Hinton y seguidamente se depositan las tiras con antibiótico. Las placas son incubadas durante 24 h y, una vez crecidas las colonias, la CMI puede ser calculada. Para expresar los resultados del antibiograma directo, estos se clasifican de acuerdo a la *Food and Drug Administration* (FDA)⁶⁸ como *agreements*, *minor errors*, *major errors* y *very major errors*. Tomando como *gold standard* los resultados de sensibilidad obtenidos mediante microdilución en caldo, Boyer et al.⁶⁹ obtienen un 88,9% de *agreements*, un 1,5% de *very major errors* y un 9,6% de *major errors*, y Bouza et al.⁷⁰ obtienen un 96,44% de *agreements*, un 1,98% de *major errors* y un 1,56% de *minor errors*.

Los métodos de microdilución en caldo estandarizados permiten llevar a cabo la identificación bacteriana y la obtención del antibiograma a partir del frasco de hemocultivo crecido. Los resultados obtenidos se muestran en la [tabla 1](#). Para la identificación bacteriana se requieren 3 h, con pobres resultados en bacterias grampositivas y aceptables en gramnegativas; sin embargo, para obtener el antibiograma se precisan 14 h, obteniendo buenos resultados en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas^{71–78}.

Finalmente, las pruebas inmunocromatográficas han sido aplicadas a partir del frasco de hemocultivo crecido. El test BinaxNOW PBP2a (Alere, Waltham, MA, EE.UU.), utilizado para la determinación de sensibilidad de *S. aureus* a metilicina, requiere unos 30 min y muestra una sensibilidad del 95,4% y una especificidad del 100%⁷⁹. El test KeyPath MRSA/MSSA Blood Culture Test (MicroPhage, Longmont, CO, EE.UU.) permite la detección de *S. aureus* y del gen *mecA*. Requiere unas 5 h y presenta una sensibilidad y una especificidad del 84 al 100%¹⁶.

Tabla 1
Resultados de la identificación directa y de la determinación de la susceptibilidad a partir de frasco de hemocultivo crecido mediante sistemas comerciales

Autores y referencia	Equipo utilizado	Grupo bacteriano estudiado	% identificación	% susceptibilidad	Tiempo requerido para la identificación (horas)	Tiempo requerido para la susceptibilidad (horas)
Bruins et al. ⁷¹	VITEK 2	Enterobacterias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	99,2	3	19
Funke y Funke-Kissling ⁷³	Phoenix	Bacilos gramnegativos	92,9	99	No reflejado	No reflejado
Ling et al. ⁷⁵	VITEK 2	Bacilos gramnegativos	82,2	97,6	3,3	17,5
Quesada et al. ⁷⁷	VITEK 2	Bacilos gramnegativos	96,5	99,2	6	8,2
Lupetti et al. ⁷⁶	MicroScan	Cocos grampositivos	93,8	99,5	12	12
	Phoenix	Bacilos grampositivos	82	77	24	24
Wimmer et al. ⁷⁸	MALDI-TOF, Phoenix	Bacilos gramnegativos	98	98,1	35,1	35,1
Chen et al. ⁷²	VITEK 2	Grampositivos	33,3	89,7	3	16,3
		Gramnegativos	87,9	94,6	2,5	11,3
Gherardi et al. ⁷⁴	VITEK 2	Grampositivos	75	96,2	7,7	13,8
		Gramnegativos	100	98,7	7,2	12,1
	Phoenix	Grampositivos	43,8	99,5	15,3	15,3
		Gramnegativos	92,3	99	14,9	14,9

Métodos colorimétricos

Las diferentes metodologías basadas en procedimientos colorimétricos requieren unas 6 h para poder informar la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos y han mostrado muy buenos resultados. La resazurina es un compuesto que, cuando se añade a un cultivo bacteriano en medio líquido resistente al antibiótico con el que es incubado, es reducida por la actividad metabólica de la bacteria. En cambio, si la bacteria es sensible al antibiótico se detiene su metabolismo, con lo que la resazurina permanece en su forma oxidada. Dado que la forma reducida de resazurina es estable y de color azul, y fotométricamente distinguible de la forma oxidada, que es de color rojo, la viabilidad celular puede ser monitorizada mediante espectrofotometría, colorimetría o fluorometría. Utilizando este compuesto se ha determinado la sensibilidad de *S. aureus* a metilicina y vancomicina^{80,81}. Asimismo ha permitido estudiar el carácter bactericida o bacteriostático de diferentes antibióticos frente *S. aureus*⁸². Otro método colorimétrico consiste en la medición de la actividad de la enzima bacteriana nitrato reductasa. Cuando se incuba la bacteria en presencia de iones NO_3^- y antibiótico, si la bacteria es resistente al antibiótico se van a generar iones NO_2^- que, con los reactivos de Gries, originan un compuesto de color rojo. Con este método se ha determinado la sensibilidad de *S. aureus* a metilicina y vancomicina^{80,81}. Del mismo modo, la resazurina y el ensayo de la nitrato reductasa ha sido aplicado a micobacterias. Dixit et al.⁸³ estudian la sensibilidad de *M. tuberculosis* a rifampicina, isoniazida, estreptomycin y etambutol, y obtienen, en un tiempo de 8 a 14 días, una sensibilidad y una especificidad que van del 83,6 al 100% respecto al método de las proporciones.

Nefelometría

La nefelometría es otra técnica analítica basada en la dispersión de luz que permite realizar un antibiograma rápido. El sistema UroQuick o HBandLTM (Alifax, Padua, Italia), diseñado para realizar un cribado de muestras de orina, detecta la presencia de microorganismos en un tubo que contiene un medio de enriquecimiento dado que el crecimiento de estos causa una desviación de la luz medible mediante los correspondientes detectores. Las señales obtenidas son procesadas por un software que monitoriza las curvas de crecimiento. De este modo, este sistema es capaz de informar

la concentración microbiana de la muestra⁸⁴. Este equipo ha sido aplicado con éxito para realizar la detección fenotípica de diversos mecanismos de resistencia de cepas caracterizadas genéticamente o fenotípicamente, requiriendo 24 h para bacterias grampositivas y 8 h para bacterias gramnegativas⁸⁵.

La nefelometría también ha sido aplicada para la realización de un antibiograma directo a partir de muestra de orina. Ilki et al.⁸⁴ centrifugan los tubos del sistema UroQuick o HBandLTM que contienen las orinas incubadas que han sido marcadas como positivos. A partir del sedimento obtenido se realiza la identificación y la determinación de la sensibilidad mediante el sistema VITEK2. Tomando como *gold standard* de identificación la obtenida a partir de la colonia mediante el sistema VITEK2, y como *gold standard* de sensibilidad la obtenida mediante difusión en disco-placa, obtienen, con un tiempo de 11 h, una concordancia >90%. Por otra parte, Roveta et al.⁸⁶ introducen, de forma manual en el sistema UroQuick o HBandLTM, una alícuota de la orina con cultivo positivo positiva junto con el antibiótico en los diferentes tubos que contienen un caldo de enriquecimiento. En 5 h predicen la sensibilidad del microorganismo presente en la orina con un acuerdo >90% con respecto a los resultados de sensibilidad obtenidos mediante difusión en disco-placa.

Microarrays

La metodología de los *microarrays* consiste en el uso de un sustrato sólido que contiene un gran número de moléculas de ácido nucleico de una sola cadena ensambladas. A estos fragmentos de ácido nucleico se les denomina normalmente sondas, y suelen ir marcadas mediante diversos métodos (enzimáticos, fluorocromos, etc.). Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se incuban en contacto con las sondas, permitiendo así la hibridación a las sondas complementarias. Finalmente, mediante las herramientas informáticas es posible determinar en las muestras la secuencia de los ácidos nucleicos, detectar pequeñas variaciones en la secuencia de los genes o estudiar la expresión de genes⁸⁷. De este modo, para el estudio de la sensibilidad, los *microarrays* permiten la detección de un gran número de genes de resistencia en un solo ensayo, caso contrario de lo que ocurre en las PCR. En bacterias gramnegativas es posible detectar, en unas horas, un gran número de genes que codifican para diferentes β -lactamasas⁸⁸⁻⁹⁰.

Microfluidos

Los avances en nanotecnología han posibilitado la miniaturización de los diferentes ensayos usados para la detección de las resistencias a los antibióticos desarrollando plataformas o chips que utilizan volúmenes muy pequeños de muestra y de reactivos, y que además pueden albergar múltiples ensayos como cultivo bacteriano, hibridación y amplificación de ácidos nucleicos y rotura celular, entre otros. De este modo, los métodos de detección varían ampliamente, dependiendo del ensayo realizado⁸. Tang et al.⁹¹ desarrollan una plataforma que incorpora un sensor de pH mediante el cual, midiendo los cambios de pH que ocurren como consecuencia de la acumulación de productos metabólicos, es posible detectar el crecimiento bacteriano en 2 h. Choi et al.⁹² utilizan un sistema de microfluidos con cámaras de cultivo que contienen agarosa. Este compuesto es capaz de inmovilizar las bacterias individualmente, y mediante microscopía se monitoriza el crecimiento bacteriano. Esta metodología permite obtener la CMI en 3–4 h. Finalmente, Mach et al.⁹³ realizan un antibiograma directamente a partir de muestras de orina utilizando un sistema de microfluidos que incorpora un sensor electroquímico para la cuantificación del ARN ribosómico 16S. Este grupo obtiene, en 3 h y media, un 94% de concordancia con la sensibilidad obtenida mediante microdilución en caldo.

Métodos de lisis bacteriana

Otra metodología para la determinación de la sensibilidad consiste en la detección de la lisis bacteriana. Para ello, la bacteria es incubada con la presencia del antibiótico a la concentración deseada; seguidamente la bacteria se inmoviliza en un microgel de agarosa y es expuesta a una solución de lisis que produce la liberación del ADN⁸. Posteriormente, la preparación es incubada con el fluorocromo SYBR Gold y mediante observación al microscopio de fluorescencia es posible estudiar la integridad del ADN. Esta metodología requiere menos de 2 h y ha sido aplicada tanto a bacterias gramnegativas como grampositivas^{94–96}.

Conclusión

A modo de conclusión podemos señalar que las metodologías descritas en este trabajo permiten acortar el tiempo necesario para obtener la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos respecto a los métodos habituales. Para la interpretación del antibiograma es indispensable conocer la especie bacteriana que se está estudiando. En este sentido, la identificación rápida proporcionada por el sistema MALDI-TOF permite la implementación de las metodologías que realizan un antibiograma rápido. Sin embargo, para determinar si estas técnicas proporcionan una sensibilidad y una especificidad aceptables para la práctica clínica, es necesario ampliar el número de cepas bacterianas estudiadas. Además, en los ensayos en los que se detecta la presencia de ciertos determinantes de resistencia, como las técnicas moleculares y el sistema MALDI-TOF, es importante establecer la concordancia que existe entre la sensibilidad obtenida mediante métodos fenotípicos y la presencia de los determinantes de resistencia. Dados los importantes beneficios de proporcionar un resultado rápido de sensibilidad (aumento de la supervivencia, reducción de gastos y retraso de la selección de cepas bacterianas resistentes)^{28,97}, el antibiograma en Microbiología Clínica, lejos de estar definitivamente establecido, es un campo de continuo avance.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:141–60.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Information Supplement. 2012. M100-S22. Vol 32. No 3.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints. 2014 [consultado 15 Jun 2014]. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- Eigner U, Schmid A, Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3829–34.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34:1589–96.
- Mendez-Alvarez S, Perez-Roth E. [Multiplex PCR in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:183–91, quiz 92.
- Prats G. Técnicas genéticas. En: Prats G, editor. *Microbiología Clínica*. 1.ª ed Madrid: Médica Panamericana; 2005. p. 187–202.
- Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Pena R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2710–7.
- Bartels MD, Boye K, Rohde SM, Larsen AR, Torfs H, Bouchy P, et al. A common variant of staphylococcal cassette chromosome mec type IVa in isolates from Copenhagen, Denmark, is not detected by the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assay. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1524–7.
- Boyle-Vavra S, Daum RS. Reliability of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay in detecting MRSA isolates with a variety of genotypes from the United States and Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4546–51.
- Parta M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, Musher DM. Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1609–10.
- Spencer DH, Sellenriek P, Burnham CA. Validation and implementation of the GeneXpert MRSA/SA blood culture assay in a pediatric setting. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:690–4.
- Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: Multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J Clin Microbiol.* 2009;47:823–6.
- Grobner S, Dion M, Plante M, Kempf VA. Evaluation of the BD GeneOhm StaphSR assay for detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from spiked positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1689–94.
- Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, Carroll KC. Clinical validation of the molecular BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2191–6.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med.* 2013;33:651–84.
- Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:349–55.
- Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3147–52.
- Huang H, Yang ZL, Wu XM, Wang Y, Liu YJ, Luo H, et al. Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ and insights into its mechanism of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2825–32.
- O'Neill CE, Seth-Smith HM, van der Pol B, Harris SR, Thomson NR, Cutcliffe LT, et al. *Chlamydia trachomatis* clinical isolates identified as tetracycline resistant do not exhibit resistance in vitro: Whole-genome sequencing reveals a mutation in porB but no evidence for tetracycline resistance genes. *Microbiology.* 2013;159:748–56.
- Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agero Y, Lund O, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:771–7.
- Parks DR, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting: Theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods Enzymol.* 1984;108:197–241.
- Martinez OV, Gratzner HG, Malinin TI, Ingram M. The effect of some beta-lactam antibiotics on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry.* 1982;3:129–33.
- Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa S. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry.* 1982;2:249–57.
- Pore RS. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J Antimicrob Chemother.* 1994;34:613–27.

26. Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2752–8.
27. Shrestha NK, Scalera NM, Wilson DA, Procop GW. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by flow cytometry after brief antibiotic exposure. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2116–20.
28. Broeren MA, Maas Y, Retera E, Arents NL. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:286–91.
29. Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. *J Med Microbiol.* 2005;54:77–81.
30. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1568–73.
31. Cohen CY, Sahar E. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1250–6.
32. Gauthier C, St-Pierre Y, Villemur R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *J Med Microbiol.* 2002;51:192–200.
33. Limb DI, Wheat PF, Spencer RC, Harris GS, Rayner AB, Watt B. Comparison of techniques for antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *J Clin Pathol.* 1993;46:403–7.
34. Wheat PF, Hastings JG, Spencer RC. Rapid antibiotic susceptibility tests on *Enterobacteriaceae* by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1988;25:95–9.
35. Wheat PF, Spencer RC, Hastings JG. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1989;29:277–82.
36. Thore A, Nilsson L, Hojer H, Ansehn S, Brote L. Effects of ampicillin on intracellular levels of adenosine triphosphate in bacterial cultures related to antibiotic susceptibility. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1977;85:161–6.
37. Barton AP. A rapid bioluminescent method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies. *J Antimicrob Chemother.* 1985;15:61–7.
38. Beckers B, Lang HR, Schimke D, Lammers A. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol.* 1985;4:556–61.
39. Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:1208–12.
40. Kretschmar M, Nichterlein T, Kuntz P, Hof H. Rapid detection of susceptibility to fluconazole in *Candida* species by a bioluminescence assay of intracellular ATP. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;25:117–21.
41. Lafond M, Vidal N, Letourneux Y, Brunel JM. A comparison of three rapid and accurate bioluminescent antibiotic susceptibility tests. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61:16–9.
42. Ivancic V, Mastali M, Percy N, Gornbein J, Babbitt JT, Li Y, et al. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1213–9.
43. Yamashoji S. Characterization of extracellular menadione-catalyzed H₂O₂ production by NIH/3T3 cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;44:555–63.
44. Yamashoji S, Ikeda T, Yamashoji K. Extracellular generation of active oxygen species catalyzed by exogenous menadione in yeast cell suspension. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1059:99–105.
45. Yamashoji S, Ikeda T, Yamashoji K. Chemiluminescent assay for determination of viable cell density of yeast, mammalian, and plant cells. *Anal Biochem.* 1989;181:149–52.
46. Campbell AK, Hallett MB, Weeks I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods Biochem Anal.* 1985;31:317–416.
47. Manome I, Ikeda M, Saito Y, Ishii KK, Kaku M. Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2003;41:279–84.
48. Nagasawa Z, Manome I, Nagayama A. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Chemother.* 2004;10:220–6.
49. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, Hiramatsu K. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. *J Microbiol Methods.* 2007;70:434–41.
50. Yamashoji S, Takeda M. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for the viability of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Microbiol Immunol.* 2001;45:737–41.
51. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Use of a sensitive chemiluminescence-based assay to evaluate the metabolic suppression activity of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing reduced susceptibility to vancomycin. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19:734–42.
52. Yamashoji S. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for viability of *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol.* 2002;46:571–3.
53. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010;71:149–84.
54. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:380–407.
55. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20:157–71.
56. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999;71:2732–8.
57. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004;4:221–42.
58. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321–4.
59. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222–7.
60. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7:e31676.
61. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441–3.
62. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012;50:927–37.
63. Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:5420–31.
64. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2000;49:295–300.
65. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74:5487–91.
66. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2918–31.
67. Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;24:1194–201.
68. Food and Drug Administration (FDA). Guidance on Review Criteria for Assessment of Antimicrobial Susceptibility Devices. 1991 [consultado 18 Feb 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/000109gd.pdf>
69. Boyer A, Medrano J, Mzali F, Balick-Weber CC, Bessede E, Picard W, et al. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73:107–10.
70. Bouza E, Torres MV, Radice C, Cercenado E, de Diego R, Sanchez-Carrillo C, et al. Direct E-test (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2007;44:382–7.
71. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolfhagen MJ. Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol.* 2004;42:7–11.
72. Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008;41:259–64.
73. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1466–70.
74. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72:20–31.
75. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4705–7.
76. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria AL, Nibbering PH. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:89–95.
77. Quesada MD, Gimenez M, Molinos S, Fernandez G, Sanchez MD, Rivelto R, et al. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:137–40.
78. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2452–4.
79. Romero-Gomez MP, Quiles-Melero I, Navarro C, Pano-Pardo JR, Gomez-Gil R, Mingorance J. Evaluation of the BinaxNOW PBP2a assay for the direct detection

- of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72:282–4.
80. Coban AY. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2191–3.
 81. Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC, Cetinkaya E, Bilgin K, Darka O, et al. Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:580–2.
 82. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Time-suppression test using a colorimetric probe (AlamarBlue) that measures bacterial metabolic activity. *Biomed Res.* 2008;29:171–3.
 83. Dixit P, Singh U, Sharma P, Jain A. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of *M. tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2012;88:122–6.
 84. Ilki A, Bekdemir P, Ulger N, Soyletir G. Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system. *New Microbiol.* 2010;33:147–53.
 85. Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Evaluation of the Uro-Quick, a new rapid automated system, for the detection of well-characterized antibiotic-resistant bacteria. *J Chemother.* 2004;16:107–18.
 86. Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. *J Chemother.* 2006;18:12–9.
 87. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:611–33.
 88. Cohen Stuart J, Dierikx C, al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH, Vos P, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1377–81.
 89. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1608–13.
 90. Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K, et al. Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3990–8.
 91. Tang Y, Zhen L, Liu J, Wu J. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem.* 2013;85:2787–94.
 92. Choi J, Jung YG, Kim J, Kim S, Jung Y, Na H, et al. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab Chip.* 2013;13:280–7.
 93. Mach KE, Mohan R, Baron EJ, Shih MC, Gau V, Wong PK, et al. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples. *J Urol.* 2011;185:148–53.
 94. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Bou G, Fernandez MC, Fernandez JL. A rapid in situ procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. *BMC Microbiol.* 2011;11:191.
 95. Tamayo M, Santiso R, Gosalvez J, Bou G, Fernandez JL. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. *BMC Microbiol.* 2009;9:69.
 96. Bou G, Otero FM, Santiso R, Tamayo M, Fernandez MC, Tomas M, et al. Fast assessment of resistance to carbapenems and ciprofloxacin of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3609–13.
 97. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1415–8.