



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

Tesis

***ACINETOBACTER BAUMANNII Y PSEUDOMONAS
AERUGINOSA RESISTENTES A COLISTIN, PROBLEMAS
EN EL DIAGNOSTICO CLINICO Y NUEVOS METODOS
PARA EL ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD***

POR

FRANCISCO EDUARDO SEITZ OSSES

Plan de trabajo de tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la Universidad
de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor Patrocinante: Dr. Andrés Opazo C.
Laboratorio de investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA)
Departamento de Microbiología - Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Abril, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, Francisco Seitz Osses

Contenido

Índice de Figuras	6
1. Abstract	7
2. Resumen	8
3. Introducción	9
3.1. Aspectos generales.	9
3.2. Patógenos resistentes a antimicrobianos	12
3.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (CRAB, del inglés carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>):	14
3.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos (CRPA, del inglés carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>):	15
3.3 Polimixinas	17
3.4 Situación en Latinoamérica y Chile	21
4 Problema	24
5 Objetivos	25
5.1 Objetivo General	25
5.2 Objetivo específico 1	25
5.3 Objetivo específico 2	25

5.4	Objetivo específico 3.....	25
6	Método	26
7	Resultados	27
	Objetivo I: Mecanismos de resistencia a colistín.....	27
7.1	Mecanismos de resistencia intrínseca.....	27
7.2	Modificación del LPS.....	28
7.2.1	Modificación del LPS en <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
7.2.2	Modificación del LPS en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
7.3	Gen <i>mcr</i> mediado por plásmidos.....	31
	Objetivo II: problemas y limitaciones experimentales para la detección de la resistencia a colistín en laboratorios clínicos.....	33
8	Métodos para pruebas de susceptibilidad	33
8.1	Métodos rutinarios de pruebas de susceptibilidad.....	35
8.1.1	Tiras reactivas de Epsilometría	35
8.1.2	Difusión en disco (DD).....	37
8.2	Métodos de dilución en caldo	39
8.3	Micro dilución en caldo	40
8.4	Macro dilución en caldo	41

8.5 Método de dilución en agar	42
Objetivo III: Nuevos métodos para detección de resistencia a colistín en laboratorios clínicos.....	44
9 Nuevos métodos para la detección de resistencia a colistín	45
9.1 Test rápido polymixin <i>Acinetobacter</i> , rapid polymyxin <i>Pseudomonas</i> y Rapid resapolymyxin np.	45
9.2 CHROMagar™ COL-APSE.....	47
9.3 Medio LBJMR.....	48
9.4 Rapid flow cytometry method (FASTinov®)	49
9.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	50
9.6 Test de elución en disco.....	52
10 Discusión.....	54
11 Conclusiones.....	56
12 Anexos	58
13 Referencias	62

Índice de Figuras

1. Estructura de colistín y polimixina B.....	20
2. Mecanismos de resistencia a colistín.....	29
3. Mecanismos de acción gen <i>mcr</i>	33
4. Tiras reactivas para Epsilometría.....	37
5. Agar MH con disco de difusión.....	39
6. Método de dilución en agar.....	44
7. Interpretación de resultados test de elución en disco.....	54

1. Abstract

Due to the excessive use and misuse of antibiotics to treat MDR infections, global reports of multidrug-resistant bacteria such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* have also been on the rise. A recent estimate suggests that the continuing rise in infections by antimicrobial-resistant microorganisms. In this sense, it has been estimated that antibiotic resistant bacteria will cause 10 million deaths per year in 2050, that is, it will be the leading cause of death worldwide, even above diabetes and cancer; Due to the above, this review focuses on describing the mechanisms of resistance to colistin, a last resort drug to treat serious resistant infections, both intrinsic and extrinsic in the aforementioned bacteria, in addition to investigating new methods of susceptibility to colistin in clinical laboratories, these tests have high levels of reliability and limited waiting times, which are intended to displace the broth microdilution method (BMD), which is the reference method authorized by the *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* and the *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, however, it has disadvantages such as high time consumption for the analyst and delay in obtaining results.

2.Resumen

Debido al excesivo y mal uso de los antibióticos para tratar infecciones, causadas por bacterias multidrogo-resistentes (MDR), los reportes de bacterias multiresistentes a nivel global tales como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* también ha ido en aumento, Una estimación reciente sugiere que el continuo aumento de las infecciones por microorganismos resistentes a los antimicrobianos, siguiendo las tendencias actuales, provocará 10 millones de muertes por año en 2050, es decir, será la primera causa de muerte a nivel mundial, incluso por sobre la diabetes y el cáncer. Debido a lo anterior, es que el objetivo de este trabajo fue describir los mecanismos de resistencia a colistín, tanto intrínsecos como extrínsecos (adquiridos) en las bacterias antes mencionadas, además se investigó sobre los nuevos métodos de susceptibilidad a colistín en los laboratorios clínicos, los cuales están orientados a reemplazar el método de microdilución en caldo (BMD), esta es la técnica de referencia autorizada por el *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), dónde posee una serie de desventajas, tales como el alto consumo de tiempo para el operador y la demora en la obtención de resultados.

3.Introducción

3.1.Aspectos generales.

Las bacterias son organismos procariontes unicelulares de unas pocas micras de tamaño, los cuales aparecieron en la tierra hace aproximadamente 3500 millones de años atrás. Sin ellas los humanos no podrían vivir debido que cumplen funciones fundamentales para los ecosistemas del planeta Tierra, tan variadas como la fijación del nitrógeno o ayudar en la digestión humana, entre otras **(Opal y Col., 2009)**. De las miles de especies identificadas, aproximadamente solo un 5% son definidas como patógenas, es decir, capaces de producir algún tipo de daño o enfermedad en el hospedero, tanto animal como vegetal **(Janeway y Col., 2001)**. Solo ese porcentaje tiene la capacidad de producir devastadoras enfermedades o pandemias tales como la peste negra en el siglo XIV, donde se estima que acabó con la vida de más de 100 millones de personas, equivalente al 50% de toda la población europea de aquella época, en donde el agente microbiano causante de esta enfermedad también conocida como peste bubónica, fue la bacteria *Yersinia pestis* la cual se transmite por medio de los roedores **(Perry y Col., 1997)**. Esta pandemia junto con la tercera peste en el siglo XIX y otros hechos históricos asociados a enfermedades causadas por microorganismos produjo la “idea sanitaria” en Estados Unidos e Inglaterra, cuya finalidad era proporcionar una mejor eliminación de desechos, mejor nutrición y mejores condiciones de trabajo, teniendo efectos notoriamente

beneficiosos sobre las tasas de mortalidad, en donde la comunidad científica estaba activamente involucrada **(Goberna y Col., 2004)**. Sin embargo, no fue hasta 1928 cuando Alexander Fleming observó los efectos antibióticos de un compuesto fúngico aislado sobre un cultivo bacteriano, en donde la molécula responsable fue como nombrada penicilina, el cual es un antimicrobiano del grupo de los beta-lactámicos, ampliamente utilizado en medicina humana **(Gaynes y Col., 2017)**. Este descubrimiento le valdría a Fleming la obtención del premio nobel de Fisiología y Medicina en 1945.

Desde el descubrimiento de Fleming, se han aislado y sintetizado un gran número de nuevas moléculas antibióticas, la cual ha sido denominada como la era dorada de los antibióticos, la que comprende desde 1930 hasta 1960, los cuales sin duda han salvado millones de vidas a lo largo de los años **(Lyddiard y Col., 2016)**. Sin embargo, posterior a esta era solo 4 nuevas entidades moleculares antibióticas han sido introducidas en la práctica clínica: las quinolonas, las lincosamidas, las oxazolidinonas y los lipopéptidos, en donde el mercado financiero mundial de antibióticos, estimado en 30 mil millones de dólares, aún está dominado por clases de antibióticos descubiertos hace más de medio siglo **(Aslam y col., 2018)**. El uso reservado de medicamentos novedosos ha limitado los márgenes beneficiosos a la industria farmacéutica, lo que conllevó a que las organizaciones retiren sus fondos e investigaciones vinculadas al descubrimiento de nuevos medicamentos antimicrobianos **(Towse y Col., 2017)**.

Por otra parte, el uso desregulado de los antimicrobianos ha generado una amenaza creciente que deteriora la eficacia de estos fármacos: La resistencia bacteriana a los antibióticos, en donde en estos casos las bacterias infecciosas ya no son susceptibles a los antibióticos que antes eran eficaces para su tratamiento **(De Oliveira y Col., 2020)**. Lamentablemente no existen seguimientos sistemáticos internacionales, pero según reportes de los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC, del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*), al menos 2 millones de personas en los Estados Unidos se infectan con bacterias resistentes a los antibióticos, lo que provoca la muerte de al menos 23,000 personas cada año, mientras que en Europa más de 33 mil muertes anuales se asocian a infecciones causadas por microorganismos resistentes, lo que se transforma en costos asociados a cuidados de salud superiores a \$4,7 billones de dólares **(Laxminarayan y Col., 2022)** ;**(Dadgostar y Col., 2019)**. En ese sentido se estima que para el año 2050 a nivel mundial ocurran aproximadamente 10 millones de muertes, asociadas a la resistencia antimicrobiana, en donde 400 mil casos se producirían en América Latina , siendo la primera causa de muerte en todo el mundo, seguida del cáncer y la diabetes **(<https://amr-review.org>), (Boucher y col., 2009)**.

3.2. Patógenos resistentes a antimicrobianos

Gracias a consensos entre los centros para el control y prevención de enfermedades de Europa y EE.UU, es que existen definiciones asociadas en relación a los perfiles de resistencia a antibióticos que poseen los microorganismos **(Falagas y Col., 2009)**: Las cepas MDR (multi-drogo resistente) se definen como aquellas no susceptibles a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos, mientras que las cepas XDR (extensivamente resistentes) se definen como aquellas no susceptibles a al menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto dos o menos (es decir, los aislados bacterianos siguen siendo susceptibles a solo una o dos categorías) y finalmente, se definen a las cepas PDR (pan resistentes) como no susceptibles a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos **(Magiorakos y Col., 2012)**.

En relación a lo anteriormente expuesto, en el año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen a los 12 grupos de bacterias más peligrosas para la salud humana, debido a su resistencia a antibióticos, donde el grupo de “**prioridad crítica**” incluye las bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos (XDR) los cuales corresponden a una de las principales alternativas terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones graves

causadas por estas bacterias **(Boucher y Col., 2009)**. Dentro de la gran variedad de β -lactámicos diferentes, los carbapenémicos poseen el espectro más amplio de actividad y la mayor potencia contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Como resultado, a menudo se utilizan como "agentes de última línea" **(Papp-Wallace y Col., 2011)**. Por otro lado, los microorganismos MDR, XDR y PDR son especialmente peligrosos en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos **(CDC, 2017)**. Entre tales bacterias se incluye el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*). **Específicamente, la lista de la OMS incluye en el grupo de prioridad crítica a:** *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos.

3.2.1 *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB)

Es un coccobacilo Gram negativo, aerobio estricto, cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30° y 35° C. Esta especie forma colonias lisas de color amarillo pálido en agar sangre **(Almasaudi y Col., 2018)**. Las infecciones por este agente ocurren típicamente en pacientes hospitalizados o con contacto estrecho al sistema de salud **(De Oliveira y Col., 2020)**. Las manifestaciones clínicas pueden ser neumonía asociada a ventilador (NAV), meningitis intrahospitalaria, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones del tracto urinario, infección del torrente sanguíneo, entre otras **(Boucher y Col., 2009)**. Aunque las tasas de infección son menores que otros patógenos del grupo ESKAPE, es importante destacar que el 45% de los aislados globales son MDR, con tasas aún superiores en Estados Unidos, América Latina y Oriente Medio **(Giammanco y Col., 2017)**, En zonas como Turquía y Grecia este porcentaje es alarmante ya que supera el 90% **(Xie y Col., 2018)**. Un aspecto fundamental de *A. baumannii* es su gran capacidad de desarrollar resistencia rápidamente a carbapenémicos (XDR, la cual ha aumentado un 30% a nivel global desde 2011 a 2016 **(Aslam y Col., 2018)**, es por esto que, sin vigilancia epidemiológica apropiada, *A. baumannii* podría generar una pandemia global.

3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (CRPA)

Es un bacilo el cual posee una leve curvatura, con un tamaño aproximado de 2 a 4 micras, Gram negativo, presenta movilidad debido a que posee un flagelo, es aerobio, pero puede desarrollarse en ambientes anaeróbicos en presencia de nitrato, siendo su temperatura optima de crecimiento de 37°C **(Kiska y Col., 2003)**. Este microorganismo está ampliamente presente en ambientes acuáticos, en donde una de sus principales características es la producción de los pigmentos piocianina (color azul verdoso), piorrubina (rojo), pioverdina (verde amarillento) **(Yetkin y Col., 2006)**. En el ambiente clínico su transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con objetos contaminados **(Weiner y Col., 2016)**. En el ámbito sanitario, constituyen una fuente de infección por este microorganismo, el instrumental quirúrgico, los respiradores, los catéteres o las manos del personal sanitario contaminadas, entre otros, debido a la presencia de biopelículas bacterianas, lo que dificulta su erradicación **(De Oliveira y Col., 2020)**. Este patógeno es responsable de al menos un 10% de todas las infecciones intrahospitalarias en el mundo ya que la plasticidad de su genoma, conferido por genes reguladores, le otorgan resistencia intrínseca a múltiples clases de antibióticos, lo cual es clave para persistir en el hospedero y así evadir su sistema inmune **(Weiner y Col., 2016)**.

3.2.3 Enterobacterales resistentes a carbapenémicos (CRE) y productores de B- lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las enterobacterias son patógenos oportunistas que causan infecciones hospitalarias graves **(Han y Col., 2020)**. La propagación de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas ha sido una amenaza mundial para la salud pública. Son bacterias Gram negativas que contienen más de 30 géneros y más de 100 especies con morfología de cocos o bacilos. La mayoría de estas bacterias son anaerobios facultativos, capaces de reducir nitrito a nitrato y la principal característica que las diferencia de las dos primeras categorías es la capacidad de fermentar carbohidratos tales como glucosa y lactosa **(Davin-Regli y Col., 2019)**, es por esto que no entran en la categoría de Bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF)

3.3 Polimixinas

Una característica en común entre *A. baumannii* y *P. aeruginosa* es su capacidad de utilizar múltiples compuestos como fuentes de **carbón** (**Aprameya y Col., 2013**). Tanto *A. baumannii* como *P. aeruginosa* pertenecen al grupo de BGNNF, los cuales se caracterizan por poseer diversos mecanismos de resistencia tanto intrínsecos como extrínsecos a los antibióticos, lo cual los hace resistentes a una gran variedad de drogas, disminuyendo las opciones terapéuticas disponibles (**Aslam y Col., 2018**).

Debido a lo anterior, es que a través de los años se han re-introducido antiguas clases antimicrobianas creadas hace más de medio siglo atrás, tales como las polimixinas, para tratar infecciones producidas por BGNNF, debido a que la gran mayoría de los antibióticos, incluyendo los carbapenémicos, han perdido efectividad contra estos microorganismos (**Srinivas y Col., 2017**).

Las polimixinas son antibióticos del grupo de los lipopéptidos cíclicos que fueron descubiertas a fines de la década de los 40. Estas se clasifican en polimixinas de las clases A, B, C, D y E, en donde solo las polimixinas B y E son utilizadas en clínica humana (**Yahav y Col., 2014**). Colistín (polimixina E) fue aislada de la bacteria Gram positiva *Paenibacillus polymyxa* var. *colistinus* (**Benedict y Col., 1947**), (**Grady y Col., 2016**).

Las polimixinas consisten en un decapeptido cíclico, las que poseen una cadena lateral de tripéptido acilada en el extremo N por una cola de ácido graso **(Baron y Col., 2016)**. Polimixina B y E solo difieren entre sí en la posición 6 (letra Y, Figura 1), en donde se presenta el aminoácido D-fenilalanina o D-leucina respectivamente **(Poirel y Col., 2017)**. Una importante característica es que en su estructura posee residuos de ácido alfa-gamma-di-amino- butírico (Dab) lo cual hace que a pH fisiológico de 7,35 esta molécula sea policationica. **(Aguayo y Col., 2016)**. Sin embargo, este fármaco fue reemplazado por otros antimicrobianos los cuales demostraban menor toxicidad renal **(Landman y Col., 2008)**. Se ha sugerido que la nefrotoxicidad de las polimixinas puede deberse en parte a su contenido de D-aminoácidos y al componente de ácidos grasos resultando en una mayor afluencia de cationes, aniones y agua, lo que lleva a la inflamación y lisis celular **(Falagas y Col., 2006)**.

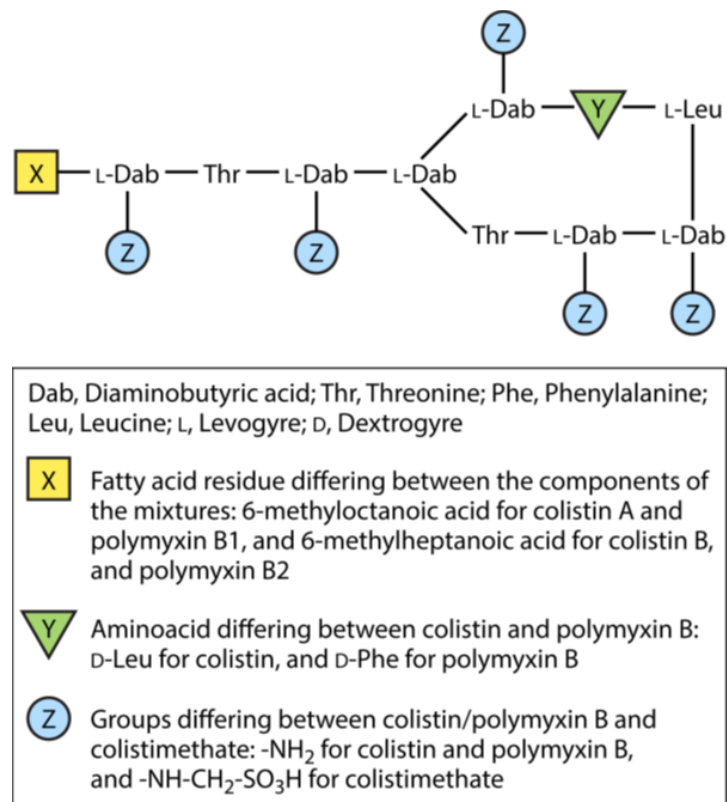


FIGURA 1: ESTRUCTURA DE COLISTIN Y POLIMIXINA B (POIREL Y COL., 2017)

El sitio blanco de las polimixinas es la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Kaye y Col., 2016). En primer lugar, debido a la interacción electroestática que ocurre entre el grupo Dab de la molécula de polimixina y los grupos fosfatos del lípido A del lipopolisacárido (LPS) los cuales poseen carga negativa, la molécula de colistín se une a la superficie bacteriana (Baron y Col., 2016). Luego el LPS es desestabilizado y consecuentemente la permeabilidad de la membrana bacteriana se ve comprometida, liberando el contenido

citoplasmático lo que finalmente produce la lisis bacteriana **(Trimble y Col., 2016)**. Aunque el LPS es el sitio blanco inicial, el mecanismo completo de acción de las polimixinas aún sigue sin ser esclarecido **(Aguayo y Col., 2016)**. Existen especies bacterianas naturalmente resistentes a la acción de estos agentes antibacterianos, tales como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia* y *Edwardsiella* spp. **(Olaitan y Col., 2014)**. De manera relevante, estos antibióticos poseen gran efectividad frente a infecciones provocadas por miembros del grupo ESKAPE, incluyendo a *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, pero debido al aumento del uso de fármacos para combatir bacterias XDR, ya se han reportado cepas resistentes a colistín alrededor del mundo **(Bradford y Col., 2017), (Cai y Col., 2012), (Giamarellou y Col, 2017), (Sader y Col., 2014), (Walkty y Col 2017)**.

3.4 Grupo ESKAPE en Latinoamérica y Chile

En México, en el año 2019, se reportaron 489 casos de IAAS (infecciones asociadas a la atención en salud) producidos por *A. baumannii*, de los cuales 131 casos fueron catalogados como MDR **(Sosa y Col., 2019)**, siendo éste el agente más frecuente de las bacterias del grupo ESKAPE. Asimismo, se encontraron 280 casos de IAAS por *P. aeruginosa* de los cuales 64 se catalogaron como MDR. No se reportaron los resultados de susceptibilidad a carbapenémicos ni colistín **(Sosa y Col., 2019)**.

En Brasil, en el año 2020, se obtuvo que, respecto a la colonización de microorganismos, hubo predominancia de *P. aeruginosa* (26,3%) **(Santos y Col., 2020)**. En relación a la resistencia a antimicrobianos, 4 cepas aisladas de pacientes, presentaron resistencia a ertapenem e imipenem, sin embargo, no se realizaron estudios de susceptibilidad a colistín. Respecto a la colonización por *A. baumannii*, ésta correspondió al 5,3% del total de casos, sin embargo, no se realizaron test de susceptibilidad a ninguna clase de antibióticos **(Santos y Col., 2020)**.

En Chile, desde el año 2007 se constituyó el grupo colaborativo de Resistencia Bacteriana, el cual incluye diversos centros de salud de varias regiones, el que ha generado información respecto a la frecuencia de resistencia antimicrobiana de distintas especies bacterianas. En un artículo publicado por

este grupo, se presentaron los resultados de la vigilancia de patógenos bacterianos resistentes del año 2009, con énfasis en su interpretación, limitaciones y perspectivas a futuro **(Silva y Col., 2011)**. Los resultados obtenidos fueron: La susceptibilidad a colistín en cepas de *P. aeruginosa* en unidad de pacientes críticos era de un 93,6% (N=716). Por otro lado, la susceptibilidad a colistín en cepas de *A. baumannii* fue del 100% en unidad de pacientes críticos (N=454), es decir, hasta esa fecha no existía registro en Chile sobre cepas de *A. baumannii* resistentes a este antimicrobiano. Adicionalmente, en el informe de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias del MINSAL el año 2017 y 2018 **(MINSAL, 2018)** no se incluyó colistín en el análisis de susceptibilidad en *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

Un estudio realizado por **Mendes y Col. en el año 2019**, reportaron que el país con el número más alto reportado de cepas resistentes a colistín y portadoras del gen de resistencia *mcr* fue Brasil con 246 casos (246/550; 44.7%). Bolivia en segundo lugar con 174 casos (174/550; 31.6%), seguidos de Argentina (101/550; 18.4%), Colombia (13/550; 2.4%), Perú (7/550; 1.2%), Venezuela (3/550; 0.5%) y Uruguay (2/550; 3.6%). Los países con el número más bajo de casos fueron Ecuador, Chile, Paraguay y México, con un solo reporte cada uno (1/550; 0.2%). La concentración mínima inhibitoria (CMI) más alta para colistín se encontró en Argentina (≥ 32 mg/L) y el más bajo en Brasil (0.25 mg/L). Por otro lado, solo Colombia (*mcr-5*) y Brasil (*mcr-3*) presentaron genes *mcr* distintos al

tipo 1, con Argentina mostrando el gen *mcr-1.5*, una variante del gen *mcr-1* (Mendes y Col., 2019).

4 Problema

La resistencia a los antimicrobianos representa una grave amenaza mundial de creciente preocupación para la salud humana, animal y ambiental. Esto se debe a la aparición, propagación, y la persistencia de bacterias altamente resistentes a los antibióticos o “super bacterias”. En Latinoamérica y Chile, en particular, no existe suficiente información y estudios relacionados con la resistencia a colistín, ya que los hospitales no realizan estas pruebas de manera rutinaria debido a múltiples factores, principalmente por la falta de un método de referencia rápido y confiable **(Poirel y Col., 2017)**.

Debido a lo anterior, es que es de suma importancia investigar la susceptibilidad a colistín y los mecanismos de resistencia presentes en las cepas no susceptibles, incluyendo aquellos plasmídicos y cromosomales en bacilos Gram negativos no fermentadores resistentes a carbapenémicos (*A. baumannii* y *P. aeruginosa*), catalogados por la OMS como patógenos de prioridad crítica. Además, es necesario examinar posibles metodologías en laboratorios clínicos para la detección de susceptibilidad a colistín de manera rápida y confiable.

5 Objetivos

5.1 Objetivo General

Comprender la relevancia clínica que representa la resistencia a colistín en bacilos Gram negativos no fermentadores resistentes a carbapenémicos, además de conocer cuáles son los mecanismos de resistencia y las nuevas metodologías propuestas para la detección de la resistencia a colistín.

5.2 Objetivo específico 1

Comprender en bibliografía actualizada sobre los mecanismos de resistencia a colistín en *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo aquellos de tipo cromosomal y plasmídicos.

5.3 Objetivo específico 2

Analizar los problemas y limitaciones experimentales para la detección de la resistencia a colistín en laboratorios clínicos.

5.4 Objetivo específico 3

Indagar sobre nuevas técnicas de estudio de la susceptibilidad a colistín en el laboratorio clínico.

6 Método

En esta revisión bibliográfica se realizó una búsqueda descriptiva y detallada en diversas bases de datos disponibles en la Web. Específicamente se procedió con el estudio selectivo de artículos científicos, revisiones restringidas utilizando la red de la Universidad de Concepción (UDEC) y publicaciones de acceso libre, consultando distintas bases de datos, tales como Pubmed, SciELO, Web of Science (WOS), Google Académico, además de otras fuentes bibliográficas como revistas de investigación científicas y repositorios de diversas entidades universitarias; todo esto con restricciones de fecha desde los últimos 5 años, solo en los idiomas inglés y español.

En cuanto a los criterios usados para limitar la búsqueda se usarán palabras claves: “*colistin resistance*” “*Acinetobacter baumannii*” “*Pseudomonas aeruginosa*” “*mcr*” “*colistin testing method*” entre otras. Además, para añadir o eliminar términos de búsqueda en el formulario, se utilizaron los operadores lógicos booleanos, tales como AND para combinar, OR para sumar y NOT para excluir, así de este modo se permitió relacionar de forma lógica los conceptos.

7 Resultados

Objetivo I: Mecanismos de resistencia a colistín.

7.1 Mecanismos de resistencia intrínseca

Las polimixinas no tienen actividad contra bacterias anaerobias, sin embargo, no existe información bibliográfica del porqué de esta resistencia intrínseca. Por otro lado, no son activas contra organismos Gram positivos, ya que estos carecen de LPS el cual es parte de la membrana celular externa de bacterias Gram negativas (**Srinivas y Col., 2017**). Un gran número de organismos son naturalmente resistentes a las polimixinas, incluyendo *Brucella* spp., *Edwardsiella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Serratia* spp. (**Baron y Col., 2016**). Se hipotetiza que el mecanismo de resistencia natural o intrínseca en estas especies, se debe a factores de expresión génica que resulta en la adición de moléculas catiónicas al LPS, lo que conduce a la disminución de la afinidad entre la molécula de polimixina y el LPS (**Srinivas y Col., 2017**).

7.2 Modificación del LPS

Al igual que en los patógenos Gram negativos naturalmente resistentes, los organismos que son susceptibles a las polimixinas *in vitro* pueden adquirir mutaciones en los genes que regulan las vías celulares que median diversas modificaciones del LPS (**Baron y Col., 2016**). La principal modificación del LPS se produce mediante la adición de moléculas catiónicas (**Fig.2**) tales como 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N), y fosfoetanolamina (FETN) al lípido A. (**Olaitan y Col., 2014**).

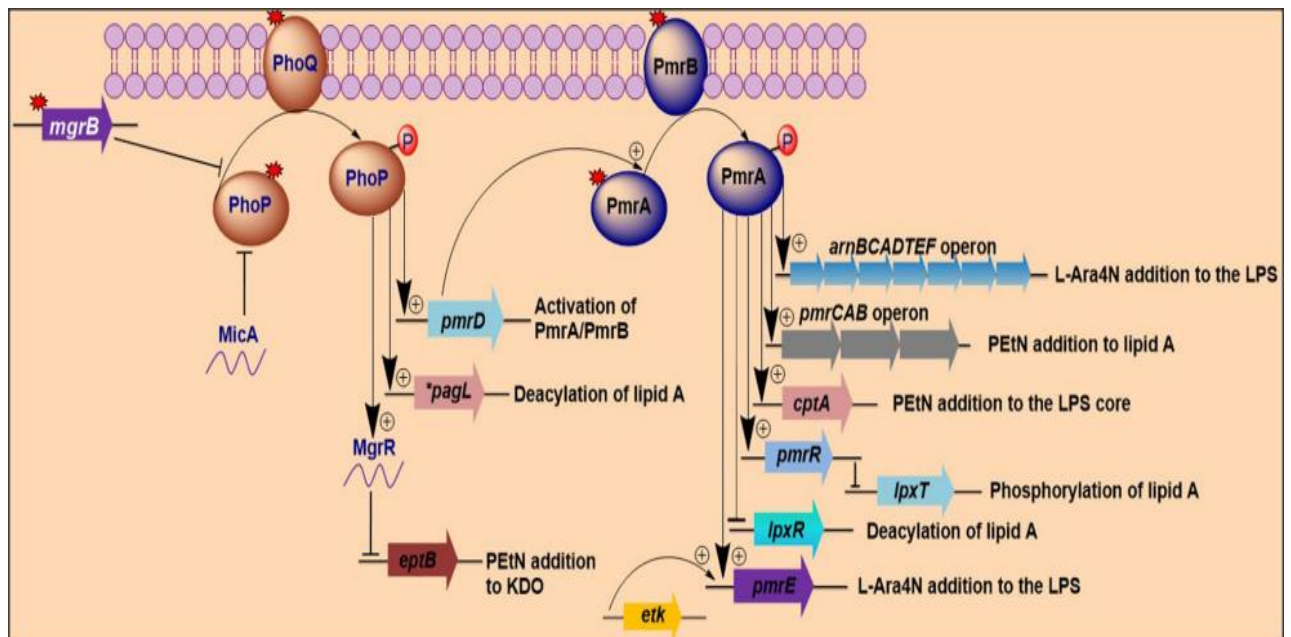


FIGURA 2: MECANISMOS DE RESISTENCIA A COLISTÍN (**OLAITAN Y COL., 2014**).

7.2.1 Modificación del LPS en *Acinetobacter baumannii*

El principal mecanismo de resistencia a colistín en *A. baumannii* corresponde a la adición de grupos catiónicos al LPS **(Poirel y Col., 2017)**. La adición de grupos catiónicos en *A. baumannii* está mediada por mutaciones en el sistema PmrAB **(Choi y Col., 2013) (Adams y Col., 2009)**. Se ha demostrado que las mutaciones en los genes *pmrA* y *pmrB* causan resistencia a colistín a través de la regulación positiva del operón *pmrCAB*, lo que conduce a la síntesis de pEtN. pero no la síntesis de L-Ara4N. (Fig.2)

El segundo mecanismo de resistencia a colistín en *A. baumannii* corresponde a la pérdida completa de LPS causada por alteraciones de los genes de biosíntesis del lípido A, llamados genes *lpxA*, *lpxC* y *lpxD* **(Moffatt y Col., 2010)**.

7.2.2 Modificación del LPS en *Pseudomonas aeruginosa*

La modificación de LPS que más comúnmente conduce a la resistencia de colistín en *P. aeruginosa* implica la adición de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) al grupo fosfato en el lípido A (**Çağlan y Col., 2018**). Esta modificación suele estar controlada por el operón *arnBCADTEF* (también llamado *arnHFIJKLM*, el cual está presente en *Salmonella spp.*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* pero está ausente en *A. baumannii*), el cual está regulado por los sistemas de 2 componentes (TCS, del inglés *two-component systems*) *PmrA/PmrB* y *PhoP/PhoQ* (**Lescat y Col., 2019**). Estos sistemas también pueden activarse por cambios en el entorno, como por ejemplo cambios en la concentración de Fe^{3+} , concentraciones bajas de Mg^{2+} o Ca^{2+} y pH bajo (**Sekyere y Col., 2018**). *PmrB* y *PhoQ* son sensores quinasas unidas a la membrana citoplasmática que fosforilan sus respectivas proteínas reguladoras *PmrA* y *PhoP* al activarse. Una vez fosforilados, *PmrA* y *PhoP* promueven la regulación positiva del operón *arnBCADETF* lo que produce la adición de L-Ara4N a los grupos fosfato del lípido A (**Poirel y Col, 2017**). La resistencia a colistín puede desarrollarse cuando ocurren mutaciones en *PmrA/PmrB* y *PhoP/PhoQ*. Finalmente, la adición de fosfoetanolamina (FETN) al lípido A, disminuye la carga negativa, lo cual corresponde a un mecanismo de modificación del LPS en *P. aeruginosa* resistente a colistín (Fig.2) (**Sekyere y Col., 2018**).

7.3 Gen *mcr* mediado por plásmidos

Las modificaciones de los componentes del lípido A en organismos Gram negativos a través de PhoP/PhoQ, tales como *P. aeruginosa*, son mediados por modificaciones a nivel cromosómico **(Park y Col., 2015)**. Sin embargo, en 2016 se publicaron diversos reportes que han identificado un gen de resistencia a colistín hasta ese momento desconocido ***mcr-1***, presente en plásmidos, el cual codifica una enzima FETN transferasa, la cual transfiere enzimáticamente FetN al lípido A **(Baron y Col. 2016)**. El primer gen *mcr-1*, fue identificado en aislados de *E. coli* comensales de animales en China **(Liu y Col., 2016)**, Sin embargo, en pocos meses, fue reportada la diseminación de este gen en cepas aisladas de animales y humanos **(Wang y Col., 2020)**, **(Castanheira y Col., 2016)**, **(Legarraga y Col., 2018)**. En Latinoamérica se ha reportado el gen *mcr* en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp. *Enterobacter* spp. Y *P. aeruginosa*, pero no han sido descritas aun en cepas de *A. baumannii* en América latina.

Alarmanamente para este gen de resistencia contenido en plásmidos transferibles, se han descrito a nivel global diversas variantes alélicas de *mcr-1* tales como *mcr 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 y 1.8* y *mcr 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10* **(Hussein y Col., 2021)**. Estos genes conducen a una disminución en las cargas aniónicas del lípido A, previniendo las interacciones electrostáticas con moléculas

de polipéptidos catiónicos tales como polimixinas (colistín y polimixina B), lo que conduce finalmente a la resistencia a colistín (**Esposito y Col., 2017**). La adición de PEtN a la posición 4' del lípido A da como resultado un compuesto llamado PEtN-4'-lípido A (PEA-4'-lípido A) (Fig.3)

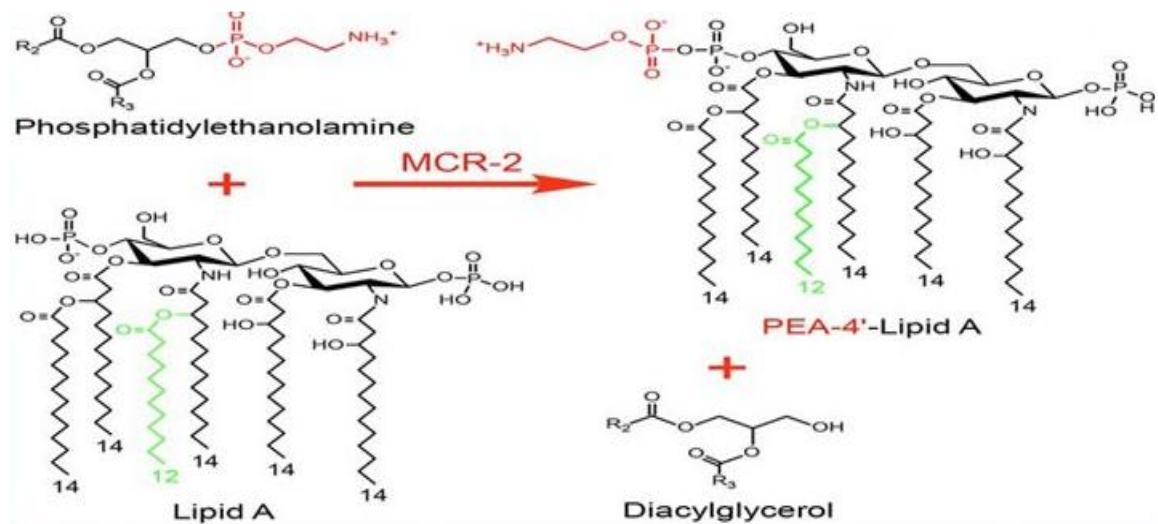


FIGURA 3: MECANISMO DE ACCIÓN GEN MCR (**OSEI Y COL., 2018**).

Objetivo II: problemas y limitaciones experimentales para la detección de la resistencia a colistín en laboratorios clínicos.

8 Métodos para pruebas de susceptibilidad

A pesar de su uso clínico prolongado (décadas), el método óptimo para las pruebas de susceptibilidad de colistín en laboratorios clínicos aún no está definido claramente **(Poirel y Col., 2017)**. Sin embargo, la reciente aparición de cepas MDR y el aumento del uso de colistín impulsaron a la comunidad científica para investigar y desarrollar métodos rápidos como a su vez confiables, para determinar la susceptibilidad de cepas a polimixinas, ya que ahora es una necesidad urgente en los laboratorios clínicos **(Leshaba y Col., 2022)**. Las pruebas de susceptibilidad a colistín y a polimixinas en general, son ahora un gran desafío, ya que las infecciones humanas de bacterias Gram negativas resistentes a colistín se asocian con una mayor mortalidad de los pacientes **(Capone y Col., 2013)**. Las dificultades en las pruebas de susceptibilidad a las polimixinas son diversas, incluida la mala difusión de las polimixinas en agar nutritivo, las propiedades catiónicas inherentes de las polimixinas y la falta de un

método de referencia confiable que pueda permitir comparaciones fiables de pruebas comerciales (**Hindler y Col., 2018**).

8.1 Métodos rutinarios de pruebas de susceptibilidad

8.1.1 Tiras reactivas E-test (Epsilometría)

Consisten en tiras reactivas de plástico impregnadas con concentraciones crecientes de antibióticos (**Fig.4**). A partir de estas tiras, se pueden obtener los valores de CMI del antibiótico, las cuales se leen con la escala de concentración marcada en la cara superior del test (**Poirel y Col., 2017**). Según las recomendaciones del fabricante, este método es realizado aplicando un inóculo bacteriano de aproximadamente 10^8 UFC/ml (0,5 McFarland) en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (MH) mediante el uso de un hisopo estéril. Luego las tiras que contienen el gradiente de concentración de colistín (que van desde 0.016 a 256 $\mu\text{g/ml}$) se colocan en la superficie del agar, donde posteriormente la concentración mínima inhibitoria es determinada después de una incubación durante 16 a 24 h $35\pm 2^\circ\text{C}$ (**Wang y Col., 2020**). El valor de la CMI se define por la intersección de la parte inferior del área de crecimiento en forma de elipse con la tira reactiva. Diversos estudios encontraron una excelente correlación entre las técnicas epsilométricas (ej: E-test) y las técnicas de referencia (**Poirel y Col., 2017**); (**Sherman y Col., 2019**); (**Simar y Col., 2017**). Sin embargo, los estudios que incluyeron un mayor número de aislados resistentes reportaron altas tasas de falsa susceptibilidad de bacilos Gram

negativos en comparación con otros métodos **(Çağlan y Col., 2020); (Javed y Col., 2020)** Este método es fácil de realizar, requiere una espera de 24 h, pero es relativamente caro **(Poirel y Col., 2017)**.



FIGURA 4: TIRAS REACTIVAS PARA EPSILOMETRÍA (IMAGEN OBTENIDA DESDE [HTTPS://WWW.BIOMERIEUX-USA.COM/CLINICAL/ETEST](https://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest)).

8.1.2 Difusión en disco (DD)

También conocidos como sensidiscos, es una prueba de rutina semicuantitativa, la cual se realiza en los laboratorios clínicos para determinar resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos (Fig.5), la cual consiste en la difusión de una concentración determinada de polimixina en el agar MH que ha sido sembrado con un inóculo bacteriano definido **(Gwozdzinski y Col., 2018)**. Según el CLSi y el EUCAST, la prueba de difusión en disco se realiza aplicando un inóculo bacteriano correspondiente a un estándar de 0,5 McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/ml) en toda la superficie de una placa de agar MH mediante el uso de una tórula estéril. Luego se colocan los sensidiscos (10µg de antibiótico) impregnados con polimixina E sobre la superficie del agar. La zona de inhibición del crecimiento es medida luego de una incubación de 16 a 24 h 35 ± 2 ° C. El diámetro de la zona de inhibición es proporcional a la susceptibilidad bacteriana a colistín y se correlaciona inversamente con la CMI de la cepa bacteriana. La prueba DD es fácil y barata y no requiere equipo específico. Estas ventajas explican por qué este método se utiliza comúnmente como método de prueba principal para medir sensibilidad a un gran número de aislados. Sin embargo, la escasa y lenta difusión de las polimixinas a través del agar da pequeñas zonas de inhibición y limita la precisión de la prueba DD, dando un resultado inaceptable y elevada tasa de falsa susceptibilidad (hasta un 35%), en comparación con el método de referencia microdilución en caldo (BMD) **(Poirel**

y Col.,2017). El EUCAST recomienda medir la CMI como primer análisis antes de otras pruebas de susceptibilidad. Por tanto, este método no es confiable y debe abandonarse.



FIGURA 5: AGAR MH CON DISCOS DE DIFUSIÓN (IMAGEN OBTENIDA DESDE WWW.BIOSER.COM)

8.2 Métodos de dilución en caldo

El objetivo de los métodos de dilución es determinar la CMI, correspondiente a la menor concentración de polimixina que inhibe el crecimiento bacteriano visible después de una incubación de 16 a 24 h, a 35°C **(Poirel y Col., 2017)**. La dilución en caldo es una técnica en la que una suspensión bacteriana a una concentración predeterminada se prueba contra varias concentraciones de agente antimicrobiano en medio líquido (caldo de cultivo) con una formulación predeterminada. Se encuentran disponibles dos métodos de dilución.

8.3 Micro dilución en caldo

La microdilución en caldo (BMD, por sus siglas en inglés *broth microdilution*) es el método de prueba de susceptibilidad de referencia **aprobado por el CLSI**. Para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a colistín, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI, la BMD se realiza con caldo MH ajustado en cationes (CA-MHB), utilizando el rango de concentraciones desde 0,12 a 512 µg/ml y un inóculo bacteriano final de 5×10^5 UFC/ml en cada pocillo (**CLSI, 2014**). La técnica BMD se considera el método óptimo y actualmente se recomienda para pruebas de susceptibilidad en el documento propuesto por el conjunto CLSI-EUCAST en el año 2016 (**Anexo 1**).

Sin embargo, la BMD es bastante laboriosa y la preparación manual de las soluciones antibióticas puede dar lugar a errores importantes. Esta técnica, por lo tanto, no se adapta a la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica de forma rutinaria. Además, se han reportado resultados de CMI no reproducibles debido a saltos de pocillos (es decir, pocillos que no muestran crecimiento, mientras que el crecimiento se observa en pocillos con concentraciones de antibiótico más altas) en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (**Chew y Col., 2017**). Cabe destacar que se recomienda su uso para pruebas en *Enterobacterales* y *P. aeruginosa* pero **no** en *A. baumannii* (**CLSI., 2020**).

8.4 Macro dilución en caldo

También conocido como método de dilución en tubo. El medio de crecimiento (CA-MHB), la suspensión bacteriana del inóculo, la preparación de diluciones al doble de polimixinas, las condiciones de incubación y la lectura de la placa son idénticas a los del método de micro dilución en caldo. La mayor diferencia es el volumen de crecimiento y el uso de tubos de ensayo de vidrio en lugar de microplacas plásticas. Cuando se evalúa contra los resultados de la BMD, los resultados del método de macro dilución en caldo mostraron mayor concordancia (83%) en comparación con otros métodos disponibles, y no se observó falsa susceptibilidad **(Hindler y Col., 2018)**.

8.5 Método de dilución en agar

Otro método **aprobado recientemente por el CLSI** en 2021, que se basa en varias concentraciones de moléculas de polimixina en agar MH (generalmente en concentraciones 2X en serie), seguido de la siembra de un inóculo bacteriano de concentración conocida en la placa de agar (Fig.6). De acuerdo con las recomendaciones de CLSI, el polvo de polimixina se disuelve en agua estéril y se agrega al agar MH fundido para proporcionar diluciones al doble (que van generalmente desde 0,12 µg/ml hasta 512 µg/ml) **(Depka y Col., 2020)**. Un inóculo bacteriano correspondiente a aproximadamente 10^4 UFC/ml es preparado y luego se añaden diluciones 10x del antibiótico a estudiar. La dilución en agar teóricamente podría evitar la adsorción de colistín a las placas, pero no existen estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, si existen estudios que han demostrado una fuerte correlación entre la técnica de dilución en agar y la BMD **(Matuschek y Col., 2018)**, Una ventaja del método de dilución de agar es la capacidad de probar múltiples cepas en una misma placa. Sin embargo, el método de dilución en agar también presenta algunas desventajas, ya que es muy laborioso si no está automatizado y las placas (no disponible en fuentes comerciales) se deben utilizar dentro de la semana de preparación. Muchos estudios han empleado el método de dilución en agar como estándar; sin embargo, BMD sigue siendo el método de referencia principal para las pruebas

de CMI de polimixina (**Anexo 1**), pero al igual que en la prueba de BMD, no se recomienda para *A. baumannii* (CLSI., 2020)

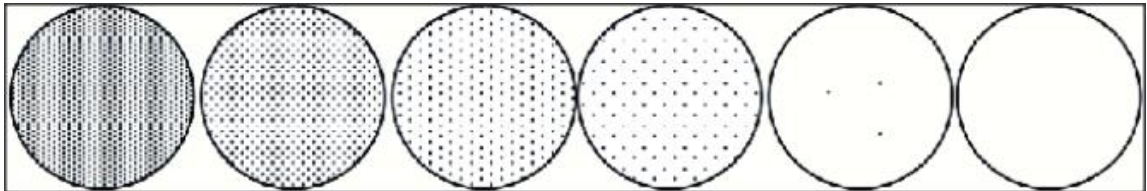


FIGURA 6: MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR (VEGA Y COL.2019), DE IZQUIERDA A DERECHA SE OBSERVA MENOR CRECIMIENTO BACTERIANO DEBIDO A MAYORES CONCENTRACIONES DE ANTIBIÓTICO

Objetivo III: Nuevos métodos para detección de resistencia a colistín en laboratorios clínicos

Tanto EUCAST como CLSI recomiendan tanto la BMD y recientemente **(CLSI., 2021)** las pruebas de **colistín agar test** y **colistín broth disk elution** para las pruebas de susceptibilidad a colistín, pero estos análisis no se usan de manera rutinaria en laboratorios de diagnóstico microbiológico, es por esto que es de suma importancia conocer nuevos y modernos métodos analíticos los cuales permitirán obtener resultados tanto o más confiables que la BMD, en un periodo más acotado y con menor carga laboral para el personal del laboratorio.

9 Nuevos métodos para la detección de resistencia a colistín.

9.1 Test rápido polymixin *Acinetobacter*, rapid polymyxin *Pseudomonas* y Rapid resapolymyxin NP.

ElitechGroup presentó las pruebas rápidas de polimixina para *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. en octubre de 2018 **(Malli y Col., 2019)**. Ambas pruebas utilizan el mismo principio de la prueba *Rapid Polymyxin NP*, la cual fue desarrollada para Enterobacterales, ya que se basan en la detección colorimétrica del metabolismo bacteriano en presencia de una concentración definida de colistín **(Lescat y Col.,2019)**. Un resultado positivo de *Rapid Polimixin Acinetobacter* se lee mediante un cambio de color del indicador de pH rojo fenol (rojo a naranja o amarillo), mientras que *Rapid Polymyxin Pseudomonas* usa el indicador de pH bromocresol púrpura (verde-amarillo a violeta). Diversos estudios registraron 100% de sensibilidad en *Rapid polymyxin Pseudomonas*, Sin embargo, el test rapid polymyxim *Acinetobacter* tuvo discrepancias, no registrando errores en un estudio y ocho errores en otro análisis **(Lescat y Col.,2019: Sadek y Col., 2020)**. También se desarrolló la prueba *Rapid Resapolymyxin NP* para detectar la resistencia a colistín en diversas bacterias Gram-negativas incluyendo Enterobacterales, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*

(Lescat y Col., 2019). La prueba se lleva a cabo inoculando 20 µl estandarizados de suspensión bacteriana (3.5 McFarland) en caldo MH que contiene una concentración final de 3.75 mg/L de colistín sulfato. Posteriormente se añade la resazurina (PrestoBlue®) después de 3 h de incubación en el medio y los resultados se leen durante un período de 1 h después de la adición del compuesto. La detección de resistencia a colistín. se basa en la reducción de la resazurina azul a rosa resorufina por células metabólicamente activas en presencia de una concentración definida de colistín **(Lescat y Col.,2019)**. La evaluación de la prueba Rapid ResaPolymyxin NP mostró detección confiable de la resistencia a colistín en no fermentadores y 100% de precisión en Enterobacterales **(Germ y Col., 2019)**. Cabe destacar que, aunque el crecimiento de *Pseudomonas* spp, puede retrasarse, *Enterobacterales* y *Acinetobacter* spp, pueden ser detectables en menos de 4 h **(Jia y Col., 2020)**.

9.2 CHROMagar™ COL-APSE

Desarrollado por CHROMagar (París, Francia), este es el primer medio selectivo diseñado para detectar y diferenciar *Acinetobacter* spp., *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. y *Stenotrophomonas* spp. **(Abdul y Col., 2017)**. Las placas de agar se preparan utilizando un medio de cultivo base deshidratado (CHROMagar®) más suplementos que contienen colistín sulfato y oxazolidinonas para mejorar el crecimiento de bacterias Gram-negativas resistentes a colistín e inhibir el crecimiento de bacteria Gram-positivas **(Abdul y Col., 2017)**. La invasividad de *Proteus* spp. que provoca un crecimiento que obstaculiza el aislamiento de cualquier otro agente microbiano **(Rütschlin y Col., 2020)**, es inhibido al agregar p-nitrofenil-glicerol a la preparación del medio, lo cual no afecta al rendimiento del medio.

La precisión en la detección y diferenciación de especies Gram-negativas resistentes a colistín fue evaluada por Osei Sekyere y Col. (2020), en donde el aspecto morfológico de las cepas detectadas fue la descrita por el fabricante. Además, tres estudios que han evaluado CHROMagar®™ COL-APSE concluyeron que el medio tiene una alta sensibilidad (97% aproximadamente) en la detección de aislamientos que portan genes *mcr* **(Abdul y Col.,2017; Osei Sekyere y Col., 2020; Thiry y Col., 2019)**.

9.3 Medio LBJMR

Lucie-Bardet-Jean-Marc-Rolain (LBJMR), es un medio polivalente basado en agar púrpura, el cual fue diseñado para el aislamiento de bacterias Gram-negativas resistentes a colistín, así como de bacterias Gram-positivas resistentes a la vancomicina **(Bardet y Col., 2017)**. El medio fue desarrollado agregando glucosa (7,5 g/L), sulfato de colistín (4 µg/ml) y vancomicina (50 µg/ml) a 31 g/L de base de agar púrpura **(Bardet y Col., 2017)**. En total, 143 aislamientos bacterianos, incluidas Enterobacterales y BGNNF, se utilizaron para evaluar este medio, donde la especificidad y la sensibilidad fueron del 100 % **(Bardet y Col., 2017)**. El medio se evaluó en 56 aislados *mcr-1* positivos y 10 *mcr-1* negativos, en donde las muestras fueron recolectadas de humanos y pollos. El estudio describió que el medio LBJMR puede detectar aislados *mcr-1*-positivos con alta sensibilidad **(Bardet y Col., 2017)**. Además, el medio LBJMR no contiene daptomicina y anfotericina B, que se utilizan en algunos medios a base de agar para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos, incluyendo cepas bacterianas resistentes a vancomicina, esto sería una desventaja, debido que no evitaría el crecimiento de bacterias que podrían contaminar el medio. **(Bardet y Col., 2017)**.

9.4 Rapid flow cytometry method (FASTinov®)

FASTinov® (Porto, Portugal) desarrolló recientemente un sistema basado en la citometría de flujo, que permite la detección directa de bacterias Gram-negativas resistentes y/o susceptibles a colistín en hemocultivo o en placas dentro de 1-2 h. Este ensayo funciona midiendo los niveles de fluorescencia de las células dañadas por la acción de colistín, el que actúa destruyendo la membrana celular. En células susceptibles, el colistín rompe las membranas celulares y permite la entrada de sondas fluorescentes, permitiendo que las células susceptibles emitan fluorescencia, la cual es detectada y analizada mediante el software BioFast desarrollado por FASTinov®. Mientras tanto, las células resistentes emiten baja o ninguna fluorescencia debido a que la membrana celular permanece intacta, impidiendo la entrada de las sondas fluorescentes. Este ensayo no depende del crecimiento de las bacterias, sino de la capacidad de su membrana para reaccionar a colistín lo que permite una detección más rápida de la susceptibilidad a colistín en comparación con pruebas basadas en cultivos bacterianos. Una gran característica de este método es que requiere menos habilidad para operar y analizar. Se obtuvo como resultado un 99,0% de susceptibilidad sin errores mayores **(Fonseca y Col.,2019)**.

9.5 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) es un método de amplificación de ácidos nucleicos que permite el autociclado de ADN a temperatura constante usando una ADN polimerasa conocida como *Bst DNA polymerase*, la cual a diferencia de la ampliamente utilizada *Taq polimerasa*, no requiere un paso extra para denaturación debido que todo el proceso es llevado a cabo a temperatura constante **(Zhong y Col., 2019)**. El uso de LAMP para detectar el gen *mcr* y sus variantes fue descrito por primera vez en dos publicaciones **(Imirzalioglu y Col., 2017; Zou y Col., 2017)**. Zou y Col. (2017) establecieron un ensayo LAMP para detectar el gen *mcr-1* de bacterias cultivadas y heces humanas. En este estudio, el ensayo LAMP se realizó en mezclas de reacción de 25 µl que contenía Tris-HCl 20 mM, KCl 10 mM, 10 mM (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ 8 mM, betaína 0,8 M, Tween-20 al 0,1 %, 1,4 mM de cada nucleótido trifosfato de desoxirribosa y 8 U Bst ADN polimerasa **(Zou Y col., 2017)**. Cada reacción tenía mezclas específicas de partidores *forward* y *reverse*, bucles cebadores, así como la cantidad adecuada del templado de ADN **(Zou Y col., 2017)**. La mezcla se cubre con 25 µl de cera. y se introduce en una incubadora de baño seco durante 60 min a temperatura constante para luego observar los productos de amplificación los cuales se leen visualmente y por turbidimetría **(Zou Y col., 2017)**. Una reacción positiva se

observa por la formación de un precipitado de pirofosfato de magnesio, el cual cambia el color del medio de naranja a verde **(Leshaba y Col., 2022)**.

Imirzalioglu y Col., (2017) evaluaron el kit Eazyplex Superug *mcr-1*® (Amplex Biosystems) para la detección rápida del gen *mcr-1*. Este kit según los investigadores resultó ser más preciso que incluso el PCR convencional **(Imirzalioglu y Col., 2017)**. Sin embargo, los análisis realizados mediante la técnica LAMP para detectar *mcr-1* no pueden detectar otros genes de interés. No obstante, Zhong y Col., (2019) desarrollaron un nuevo método con una endonucleasa de restricción para la detección de múltiples genes *mcr* a través de un sistema multi-LAMP. Se establecieron dos sistemas LAMP separados, un doble LAMP (*mcr-2* y *mcr-5*) y un sistema triple-LAMP (*mcr-1*, *mcr-3* y *mcr-4*). Los productos de amplificación se detectaron visualmente por el cambio de color de SYBR Green I, el cual cambia de amarillo a naranja en una reacción positiva **(Zhong y Col., 2019)**. Los productos de amplificación posteriormente fueron teñidos con GoldView TM y analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% **(Zou y Col., 2017)**. Una ventaja de los ensayos LAMP sobre la PCR convencional es que LAMP es más sensible, tiene un tiempo de procesamiento menor a 60 minutos y es relativamente más fácil de ejecutar **(Imirzalioglu y Col., 2017; Zhong y Col., 2019)**.

9.6 Test de elución en disco

Aprobado recientemente por el CLSI en 2021 para detección de resistencia a colistín mediados por mecanismos tradicionales (cromosómicamente), así también como mecanismos plasmídicos transferibles (*mcr*) en bacterias del grupo *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. **(Anexo 2)**. El test consiste en la preparación de 4 tubos con CA-MHB, en donde asépticamente se añaden discos de colistín (10 µg hasta completar una concentración de 0,1,2 y 4 µg/mL en cada tubo, los cuales se incuban entre 30 a 60 min. Posteriormente los 4 tubos son inoculados con 5 µL de inóculo bacteriano (concentración aproximada de $7,5 \times 10^5$ UFC/ml), luego se incuban las muestras entre 18 a 20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y 24h para *Acinetobacter* spp **(Anexo 2)**. Una cepa bacteriana es susceptible si su CMI es menor a 2 ug/mL (<2ug/mL) y no susceptible si su CMI es mayor a 4 ug/mL (>4ug/mL).

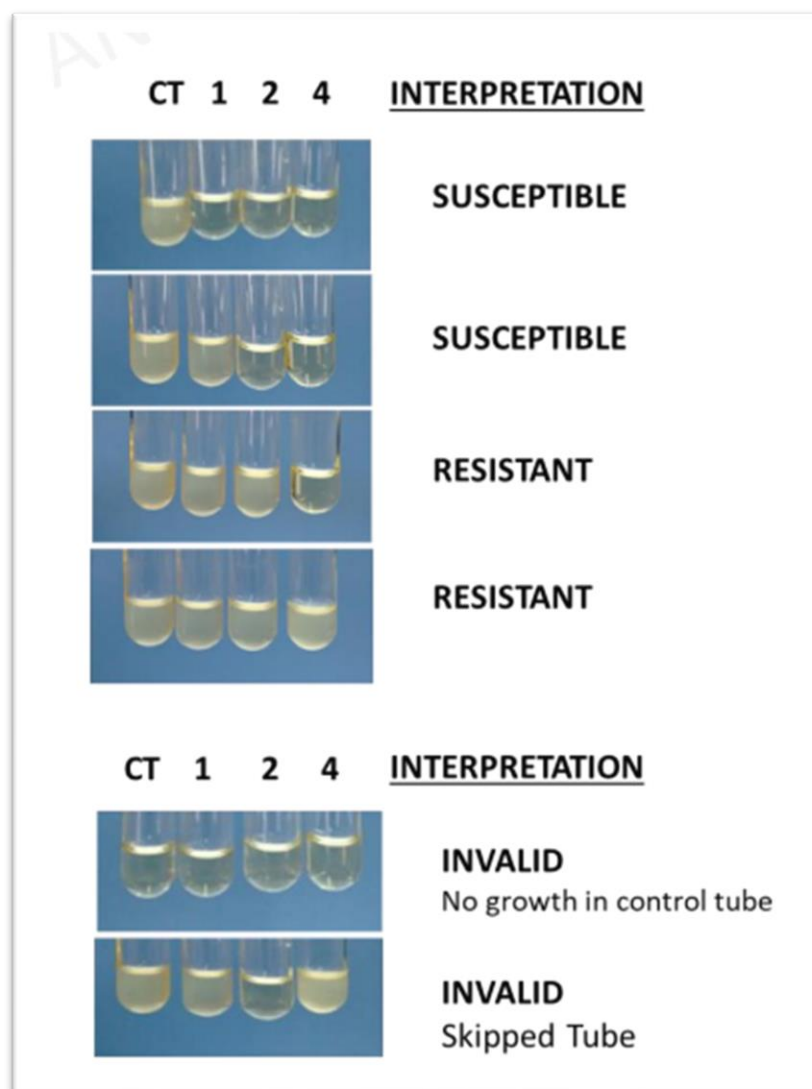


Figura 7: Interpretación de resultados test de elución en disco.

10 Discusión

En los últimos años ha aumentado considerablemente el interés en los mecanismos y en las metodologías para testear cepas resistentes a antibacterianos, sin embargo, contrario a lo esperado, la información a nivel mundial y en Latinoamérica es modesta, esto dado principalmente a que existe una necesidad de contar con protocolos universales para la identificación de cepas resistentes a colistín. Hasta hace algunos años el único método de referencia para determinar la resistencia a colistín en laboratorios recomendado por el CLSI y el EUCAST es la técnica de microdilución en caldo (BMD), la cual presenta ventajas tales como la obtención de información cuantitativa, lo cual indica que tan resistente es una cepa bacteriana a cierto antibiótico. Por otro lado, su principal desventaja además de su costo asociado el cual es alto, es el consumo de tiempo requerido para realizar esta técnica, la cual la hace poco factible para su realización de manera rutinaria en laboratorios clínicos. Recientemente el CLSI ha aprobado dos nuevos métodos para detección de resistencia a colistín los cuales son colistín agar test y test de elución en disco. Cabe destacar que hoy en día, a pesar de haber un gran número de nuevos métodos para determinar susceptibilidad a antibióticos, aun no existe un método que esté por sobre el método de referencia, ya que como ocurre habitualmente en los avances tecnológicos, en general aun existe una falta de pruebas de

estandarización en los protocolos existentes. Por otro lado, los 3 test antes mencionados, se encuentran validados para pruebas en *P.aeruginosa* y *Enterobacterales*, aun no existen métodos aprobados por el CLSI para *A.baumannii* debido a inconsistencias en las pruebas realizadas. Este problema es una excelente oportunidad dirigida a los distintos grupos de investigación de generar estos métodos de análisis confiables, fáciles, rápidos y de bajo costo para responder a las necesidades que existen hoy en día en los laboratorios clínicos, en especial en el are de microbiología.

11 Conclusiones

Las polimixinas fueron utilizadas durante varias décadas como agente bactericida contra bacilos Gram negativos, sin embargo, debido a sus efectos nefrotóxicos y neurotóxicos, su uso se ha visto limitado, pero actualmente se han reintroducido en la práctica clínica como último recurso para tratar bacterias multiresistentes (MDR), estas actúan en la membrana externa, específicamente en el lípido A del LPS, produciendo muerte celular. Uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana a las polimixinas es a través de los TCs PhoP-PhoQ, además del operón *arnBCADTEF* y recientemente el gen de resistencia de tipo plasmídica y sus variantes *mcr*, las cuales son una amenaza latente atribuida principalmente al abuso de antibióticos.

En el último tiempo las polimixinas han ganado un interés creciente debido a la situación epidemiológica actual, la cual es crítica con respecto a las bacterias MDR, estas se extienden por todo el mundo y no existen nuevos arsenales de antibióticos comercializados capaces de contener esta pandemia. Existen zonas geográficas donde el uso de polimixinas solas o en conjunto con otros antibióticos, que antes se catalogaban como agentes de última línea, hoy ya se podrían catalogar como tratamiento de primera línea, además recientes estudios identificaron un nuevo mecanismo de resistencia a polimixinas, el gen

mcr el cual es de tipo plasmídica, esto modificó la perspectiva respecto a la investigación sobre resistencia antimicrobiana, ya que hoy en día existen distintos análisis tales como la citometría de flujo, el cual podría utilizarse para una detección rápida de resistencia a colistín, o técnicas basadas en agar como el medio LBJMR que representa menor tiempo de trabajo asociado para el personal de laboratorio, además se deberían considerar técnicas moleculares como la técnica LAMP, que resulta ser más sensible que una PCR convencional, con sensibilidad cercana al 100%, menor tiempo de espera y de bajo costo.

Es por esto que hoy en día existen una variedad de análisis, los cuales tienen altos niveles de especificidad y sensibilidad, y donde estos poseen el potencial de reemplazar al método de referencia, siempre y cuando no discriminen entre tipos de resistencia antimicrobiana (de tipo plasmídica y cromosómica) y cumplan con los requisitos ya antes descritos, para que los laboratorios clínicos muestren interés en aplicar en sus instalaciones estos análisis de manera rutinaria.

12 Anexos

Anexo 1: Recomendaciones grupo CSLI-EUCAST para la determinación de resistencia a colistín. (www.eucast.org).



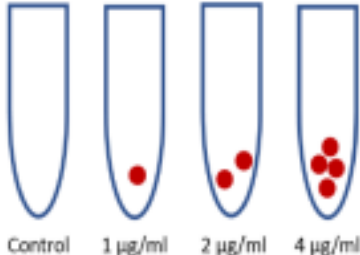
Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group

Colistin (polymyxin E) MIC determination is associated by several methodological issues. The issues have been extensively investigated by the CLSI-EUCAST joint Polymyxin Breakpoints Working Group and the following method for determination of colistin MIC was agreed:

1. Reference testing of Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. is by the ISO-standard broth microdilution method (20776-1). Note:
 - a. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth is used
 - b. No additives may be included in any part of the testing process (in particular, no polysorbate-80 or other surfactants)
 - c. Trays must be made of plain polystyrene and not treated in any way before use
 - d. Sulphate salts of polymyxins must be used (the methanesulfonate derivative of colistin must not be used - it is an inactive pro-drug that breaks down slowly in solution)
2. Susceptibility testing by other methods, including agar dilution, disk diffusion and gradient diffusion, cannot be recommended until historical data have been reviewed or new study data have been generated. Work on these methods is ongoing.

Published on www.eucast.org 22 March 2016

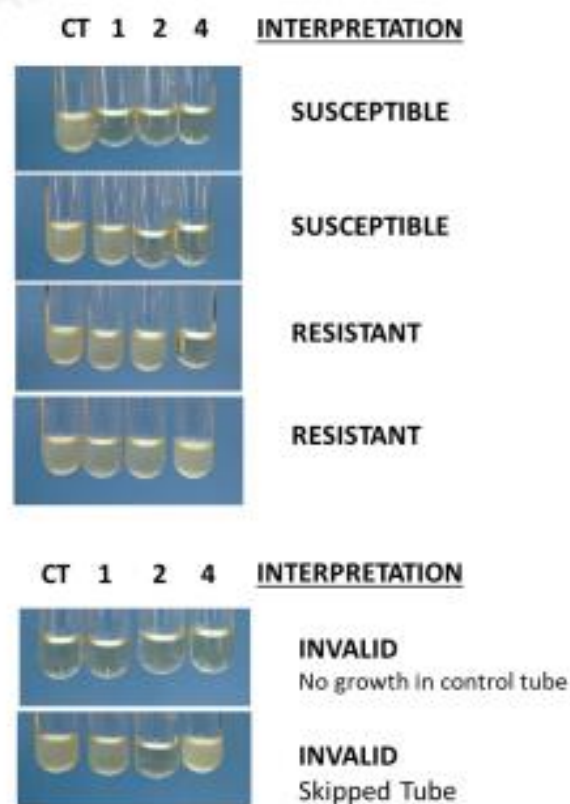
Anexo 2: Test de elución en disco para detección de resistencia a colistín.

Colistin Micro Broth Disk Elution Test	
Version EN 1.0 Last update: May 2020 Pages: 3	
	
Strengths	- Is an adaptation of the CLSI colistin disk elution test.¹ - Is capable to detect colistin resistance mediated by traditional (chromosomic) as well as transferable plasmidic (<i>mcr</i>) mechanisms.
Limitations	Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CA-MHB) required
Organism group	<i>Enterobacterales</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp.
Medium	CA-MHB
Antimicrobial concentrations	Colistin 1 - 4 µg/ml
Source of antimicrobial	10-µg colistin paper disk
Test procedure	A) Tubes Preparation (1 ml final volume) - Label 4 glass tubes for each test strain as Control, 1, 2 and 4. - Place 10 ml of CAMHB in each tube. - Aseptically add 0, 1, 2 and 4 colistin disks to tubes labelled as Control, 1, 2 and 4 respectively obtaining a final concentration of 0, 1, 2 and 4 µg/ml.  Control 1 µg/ml 2 µg/ml 4 µg/ml - Incubated at room temperature for at least 30 minutes but not longer than 60 minutes to allow colistin to elute from the disks. - Remove aseptically the colistin disks and discard - Homogenize tube 1.

	• Divide the entire contents into 10 glass tubes with screw caps (or similar to allow storage) dispensing 1ml in each tube and Label as "1". • Proceed in the same way with tubes 2, 4 and control. • Store tubes at -20°C properly closed up to 6 months. B) Colistin Micro Broth Disk Elution procedure: • Remove a set of 1ml tubes (one of each: control, 1, 2 and 4) from the freezer and allow them to reach room temperature. • Using a pipette or a calibrated loop, add 5 µl of the inoculum to each tube (1, 2, 4 and control) (final concentration: approximately 7.5×10^5 CFU/ml). <i>Note: If you don't have a 5 µl micropipette, you can prepare a two-fold dilution of standardized inoculum and add 10 µl to each tube using 10 µl calibrated loop</i> • Mix each tube gently. • Incubate for 18-20 hours at 35 ± 2 °C for <i>Enterobacterales</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and 24 hours for <i>Acinetobacter</i> spp. • After incubation, examine the growth tube which must demonstrate obvious turbidity for the test to be valid Note: some <i>P. aeruginosa</i> isolates may grow near the meniscus.¹ • Read the MIC as the lowest colistin concentration that completely inhibits growth of the isolate.
Results	COLISTIN SUSCEPTIBLE: MIC ≤ 2 µg/ml. COLISTIN RESISTANT: MIC ≥ 4 µg/ml.
Additional testing and reporting	If there are an inconsistent growth pattern (for example, no growth in tube 2, but growth in tubes 1 and 4) repeat the test. This could be due to: • Contaminated tube. • No inoculated tube. • Hetero-resistant isolates. • Inadequate colistin concentration in tubes.
QC recommendations	It is suggested to test a positive and negative control each time a batch of ten determinations is prepared: • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (MIC range $\leq 1 - 2$ µg/ml) • <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (MIC range $\leq 1 - 4$ µg/ml) • Colistin resistant: <i>E. coli</i> mcr producer Note: Disks content may vary between manufacturers. If different batches or brands of disks are used, they should be controlled with adequate quality control strains.

Reference	¹ Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. ² Development and validation of simple tests (agar spot, colistin drop, 1ml-broth disk elution MIC and tablet pre-diffusion) as an alternative to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in GNB. F. Pasteran, D. Danze, C. Cabrera, C. Lucero, A. Menocal, E. Albornoz, I. Castillo, M. Rapoport, P. Ceriana, P. Gagetti, A. Corso. O0952. 28 th ECCMID, 2018
-----------	---

Figure. Examples of a colistin-resistant and colistin-susceptible strains



13 Referencias

Abdul Momin, M. H. F., Bean, D. C., Hendriksen, R. S., Haenni, M., Phee, L. M., & Wareham, D. W. (2017). CHROMagar COL-APSE: A selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 1554–1561. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000602>

Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3628 –3634. <https://doi.org/10.1128/AAC.00284-09>.

Aguayo, Alejandro et al. Colistín en la era post-antibiótica. *Rev. chil. infectol.* 2016, 33, n.2 0716-1018. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200006>.

Almasaudi S. B. (2018). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3), 586–596. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>.

Aprameya IV. Non-fermenting Gram-negative bacilli (NFGNB) other than *Pseudomonas*. J Acad Clin Microbiol 2013; 15:59-61.

Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis. Infect. Drug Resist. 2018, 11, 1645–1658.

Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. 2016;48(6):583–91.

Benedict RG, Langlykke AF. 1947. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. J Bacteriol 54:24.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B. y Bartlett, J., “Bad bugs, no drugs: no escape! An update from the Infectious Diseases Society of America”, Clin Infect Dis, 2009; 48 (1): 112.

Bradford PA, KazmierczakKM, Biedenbach DJ,WiseMG, Hackel M, Sahm DF. Correlation of beta-lactamase production and colistin resistance among

Enterobacteriaceae isolates from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(3):1385–92.

Çağlan E, Nigiz Ş, Sancak B, Gür D. Resistance and heteroresistance to colistin among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020 Jun 1;67(2):107-111. doi: 10.1556/030.66.2019.021. PMID: 31813259.

Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(7):1607–15.

Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, Venditti M, Bordi E, Capozzi D, Balice MP, Tarasi A, Parisi G, Lappa A, Carattoli A, Petrosillo N. 2013. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect* 19: E23–E30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12070>.

Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN, Flamm RK. Detection of mcr-1 among *Escherichia coli* clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(9):5623–4.

Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. 2015. State of the World's Antibiotics, 2015. CDDEP: Washington, D.C.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019. Antibiotic resistant threats in the United States 2019. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>.

Chew KL, La MV, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol*. 2017 Sep;55(9):2609-2616. doi: 10.1128/JCM.00268-17. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28592552; PMCID: PMC5648698.

Choi MJ, Ko KS. 2014. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 69:275–277. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt315>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. Document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

Dadgostar P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and drug resistance*, 12, 3903–3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.

Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). doi:10.1128/cmr.00181-19.

Depka D, Mikucka A, Bogiel T, Gospodarek-Komkowska E. Comparison of the recommended colistin susceptibility testing methods with colistin gradient strips and semi-automated method for antimicrobial-resistant non-fermenting rods. *J Microbiol Methods*. 2020 May; 172:105905. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105905. Epub 2020 Mar 27. PMID: 32229263.

Esposito, F., Fernandes, M. R., Lopes, R., Muñoz, M., Sabino, C. P., Cunha, M. P., ... Lincopan, N. (2017). Detection of colistin-resistant MCR-1-Positive *Escherichia coli* using inhibition by EDTA and zeta potential assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 55, 3454–3465. <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-17>.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 2.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf.

Falagas, M., & Kasiakou, S. (2006). *Critical Care*, 10(1), R27. doi:10.1186/cc3995.

Fonseca E Silva, D., Silva-Dias, A., Gomes, R., Martins-Oliveira, I., Ramos, M.H., Rodrigues, A.G. et al. (2019) Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54, 820–823.

Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853. doi:10.3201/eid2305.161556.

Krizan Hergouth, V. et al. (2019) Evaluation of a novel epidemiological screening approach for detection of colistin resistant human Enterobacteriaceae isolates using a selective SuperPolymyxin medium. *Journal of Microbiol Methods*, 160, 117–123.

Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin resistant
Giammanco A, Cala C, Fasciana T, Dowzicky MJ. 2017. Global assessment of
the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gramnegative pathogens
between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial.
mSphere 2: e00310-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00310-16>.

Goberna Tricas, Josefina. (2004). La Enfermedad a lo largo de la historia: Un
punto de mira entre la biología y la simbología. Index de Enfermería, 13(47), 49-
53. Recuperado en 28 de abril de
2021.http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113212962004000300011&lng=es&tlng=es.

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current
knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. Microbial Cell Factories,
15(1). doi:10.1186/s12934-016-0603-7.

Han, R., Shi, Q., Wu, S., Yin, D., Peng, M., Dong, D., Zheng, Y., Guo, Y., Zhang,
R., Hu, F., & China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group
(2020). Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM)
Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and

Children Patients in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 314. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00314>.

Hindler JA, Humphries RM. 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 51:1678 –1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>.

Hussein NH, Al-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep*. 2021 Mar;48(3):2897-2907. doi: 10.1007/s11033-021-06307-y. Epub 2021 Apr 10. PMID: 33839987.

Imirzalioglu, C., Falgenhauer, L., Schmiedel, J., Waezsada, S.-E., Gwozdzinski, K., Roschanski, N. et al. (2017) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification-based assay for the rapid detection of plasmid-encoded colistin resistance gene mcr-1 in Enterobacteriaceae Isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 61, e02326-16.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. Infectious agents and how they cause disease. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27114/>.

Javed M, Ueltzhoeffer V, Heinrich M, Siegrist HJ, Wildermuth R, Lorenz FR, Neher RA, Willmann M. Colistin susceptibility test evaluation of multiple-resistance-level *Pseudomonas aeruginosa* isolates generated in a morbidostat device. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Dec 1;73(12):3368-3374. doi: 10.1093/jac/dky337. PMID: 30137346.

Jia, H., Fang, R., Lin, J., Tian, X., Zhao, Y., Chen, L. et al. (2020) Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiology*, 20, 7.

Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of last resort: polymyxin resistance. *Infect Dis Clin N Am.* 2016;30(2): 391–414.

Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003. p.719-28.

Gwozdzinski K, Azarderakhsh S, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Chakraborty T. An Improved Medium for Colistin Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 2018 Apr 25;56(5):e01950-17. doi: 10.1128/JCM.01950-17. PMID: 29514937; PMCID: PMC5925729.

Landman, D., Georgescu, C., Martin, D. A., & Quale, J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*, 21(3), 449–465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-08>.

Laxminarayan, R. (2022). The overlooked pandemic of antimicrobial resistance. *The lancet*, 399(10325), 606-607. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00087-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00087-3).

Lescat, M., Poirel, L., Tinguely, C. & Nordmann, P. (2019) A resazurin reduction-based assay for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(3), <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-18>.

Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.* Clin Microbiol Infect. 2018 Aug;24(8):865-870. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.020. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29221995.

Hindler JA, Humphries RM. 2018. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 51:1678 –1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>.

Legarraga, Paulette, Wozniak, Aniela, Prado, Sandra, Estrella, Laura, & García, Patricia. (2018). Primera comunicación en Chile de la detección del gen mcr-1 en un aislado clínico de *Escherichia coli* resistente a colistín. Revista chilena de infectología, 35(4), 453-454. <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000400453>

Leshaba TMS, Mbelle NM, Osei Sekyere J. Current and emerging polymyxin resistance diagnostics: A systematic review of established and novel detection methods. J Appl Microbiol. 2022 Jan;132(1):8-30. doi: 10.1111/jam.15184. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34152057.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161– 8.

Lyddiard D, Jones GL, Greatrex BW. Keeping it simple: lessons from the golden era of antibiotic discovery. *FEMS Microbiol Lett.* 2016 Apr;363(8): fnw084. doi: 10.1093/femsle/fnw084. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27036144.

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.

Malli, E., Tsilipounidaki, K., Xitsas, S., Pyridou, P., Papagiannitsis, C.C. & Petinaki, E. (2021) Letter to the Editor: Implementation of the rapid polymyxin acinetobacter test to detect colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 27, 134–135.

Mendes Oliveira, V. R., Paiva, M. C., & Lima, W. G. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. doi:10.1016/j.tmaid.2019.07.015.

MINSAL, Informe de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias, Chile 2018.

Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4971– 4977. <https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10>.

Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014; 5:643.

Opal S. M. (2009). A Brief History of Microbiology and Immunology. *Vaccines: A Biography*, 31–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1108-7_3.

Osei Sekyere, J. (2018). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, e00682. doi:10.1002/mbo3.682

Osei Sekyere, J., Sephofane, A.K. & Mbelle, N.M. (2020) Comparative evaluation of CHROMagar COL-APSE, MicroScan Walkaway, ComASP Colistin, and Colistin MAC test in detecting colistin-resistant gram-negative bacteria. *Scientific Reports*, 10, 1–13.

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>.

Park YK, Lee JY, Ko KS. Transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identifies genes associated with colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Aug;21(8):765.e1-7. doi: 10.1016/j.cmi.2015.04.009. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25911992.

Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jan;10(1):35-66. doi:10.1128/CMR.10.1.35-66.1997. PMID:8993858; PMCID: PMC172914.

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. doi:10.1128/cmr.00064-16.

Rütschlin S, Böttcher T. Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior. *Chemistry*. 2020 Jan 22;26(5):964-979. doi: 10.1002/chem.201901961. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31268192; PMCID: PMC7027876.

Sadek, M., Tinguely, C., Poirel, L. & Nordmann, P. (2020) Rapid Polymyxin/Pseudomonas NP test for rapid detection of polymyxin susceptibility/resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39, 1657–1662.

Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009–2012. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(4):328–34.

Santos Zonta, Franciele do Nascimento, Roque, Márcia da Silva, Soares da Silva, Ruan Gabriel, Ritter, Amanda Gabrieli, & Jacobsen, Fernanda Tondello. (2020). Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enfermería Global*, 19(59), 214-254. Epub 10 de agosto de 2020. <https://dx.doi.org/10.6018/eglobal.406691>.

Sherman EX, Wozniak JE, Weiss DS. Methods to Evaluate Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter baumannii*. *Methods Mol Biol*. 2019;1946:39-50. doi: 10.1007/978-1-4939-9118-1_4. PMID: 30798542; PMCID: PMC6637766.

Silva O, Francisco, Cifuentes D, Marcela, & Pinto C, M. Eugenia. (2011). Resultados de la vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en Chile: Consolidando una red. *Revista chilena de infectología*, 28(1), 19-27. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000100004>

Simar S, Sibley D, Ashcraft D, Pankey G. Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli. *Ochsner J*. 2017 Fall;17(3):239-242. PMID: 29026355; PMCID: PMC5625981.

Sosa O. (2019) Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo ESKAPE en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017. *enf inf microbiol* 2019 39 (2): 59-6.

Srinivas, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Current Infectious Disease Reports*, 19(11). doi:10.1007/s11908-017-0596-3.

Thiry, D., Berrah, A., Evrard, J., Duprez, J.N., Mainil, J.G. & Saulmont, M. (2019) Assessment of two selective agar media to isolate colistin-resistant bovine *Escherichia coli*: correlation with minimal inhibitory concentration and presence of *mcr* genes. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 174–178.

Towse A, Hoyle CK, Goodall J, Hirsch M, Mestre-Ferrandiz J, Rex JH. Time for a change in how new antibiotics are reimbursed: Development of an insurance framework for funding new antibiotics based on a policy of risk mitigation. *Health Policy*. 2017 Oct;121(10):1025-1030. doi: 10.1016/j.healthpol.2017.07.011. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28888660.

Trimble, M. J., Mlynářčik, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. Cold Spring Harbor

perspectives in medicine, 6(10), a025288.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>.

Vega-Jiménez, Alejandro & Vázquez-Olmos, América & Acosta-Gío, Enrique & Álvarez-Pérez, Marco. (2019). In vitro Antimicrobial Activity Evaluation of Metal Oxide Nanoparticles. 10.5772/intechopen.84369.

Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, Liu D, Lu J, Guo Y, Xia X, Jiang J, Wang X, Fu Y, Yang L, Wang J, Li J, Cai C, Yin D, Che J, Fan R, Wang Y, Qing Y, Li Y, Liao K, Chen H, Zou M, Liang L, Tang J, Shen Z, Wang S, Yang X, Wu C, Xu S, Walsh TR, Shen J. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis*. 2020 Oct;20(10):1161-1171. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30149-3. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32505232.

Wang Q, Zhang F, Wang Z, Chen H, Wang X, Zhang Y, Li S, Wang H. Evaluation of the Etest and disk diffusion method for detection of the activity of ceftazidime-avibactam against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in China. *BMC Microbiol*. 2020 Jun 29;20(1):187. doi: 10.1186/s12866-020-01870-z. PMID: 32600252; PMCID: PMC7325266.

Walkty A, Lagace-Wiens P, Adam H, Baxter M, Karlowsky J, Mulvey MR, et al. antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008–2015. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(1):60–3.

Weiner LM, Webb AK, Limbago B, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37:1288.

Xie RQ, Zhang XD, Zhao Q, Peng B, Zheng J. 2018. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerg Microbes Infect* 7:31. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0038-9>.

Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(1):18–29.

Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. Am J Infect Control. 2006 May;34(4):188-92. doi: 10.1016/j.ajic.2005.11.010. PMID: 16679175.

Zhong, L.L., Zhou, Q., Tan, C.Y., Roberts, A.P., El-Sayed Ahmed, M.A.E., Chen, G. et al. (2019) Multiplex loop-mediated Isothermal amplification (multi-LAMP) assay for rapid detection of mcr-1 to mcr-5 in colistin-resistant bacteria. Infection and Drug Resistance, 12, 1877–1887.

Zou, D., Huang, S., Lei, H., Yang, Z., Su, Y., He, X. et al. (2017) Sensitive and rapid detection of the plasmid-encoded colistin-resistance gene mcr-1 in Enterobacteriaceae isolates by loop-mediated isothermal amplification. Frontiers in Microbiology, 8, 2356.