

## ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.18004/rspp.2021.diciembre.17>Evaluación de pruebas de sensibilidad a colistina en *Enterobacteriales* aisladas en ParaguayEvaluation of colistin susceptibility testing methods among *Enterobacteriales* strains isolated in ParaguayMelgarejo Touchet Nancy<sup>1</sup> , Busignani Sofia<sup>1</sup> , Kawabata Aníbal<sup>2</sup> , Falcón Miryan<sup>1</sup> , López Evelyn<sup>3</sup> , Zárate Noemí<sup>4</sup> , González Gladys<sup>5</sup> , Meyer María<sup>6</sup> , Medina Betania<sup>7</sup> , Almada Sandra<sup>8</sup> , Portillo Maida<sup>9</sup> , Hamuy Rossana<sup>10</sup> , Martínez Mora Mario<sup>1</sup> <sup>1</sup> Laboratorio Central de Salud Pública, Servicio Antimicrobianos: Av. Venezuela y Teniente Escurra- Asunción, Paraguay.<sup>2</sup> Hospital del Trauma "Dr. Manuel Giani": Av. General Santos y Teodoro Mongelos; Asunción, Paraguay.<sup>3</sup> Hospital Nacional de Itaugua: Av. Itaugua Guazu; Itauguá, Paraguay.<sup>4</sup> Hospital General Pediátrico "Niños de Acosta Ñu": Av. Arnaldo Bacigalupo; San Lorenzo, Paraguay.<sup>5</sup> Instituto de Previsión Social "Hospital Central": Av. Sacramento y Capitán Lombardo; Asunción, Paraguay.<sup>6</sup> Meyer Lab: Coronel Irazábal y Mariscal Estigarribia; Asunción, Paraguay.<sup>7</sup> Hospital Policial Rigoberto Caballero: Av. Mariscal López y Juscelino Kubitschek- Asunción, Paraguay.<sup>8</sup> Hospital Regional de Encarnación: Jorge Memmel casi Independencia Nacional; Encarnación, Paraguay.<sup>9</sup> Hospital Militar Central: Don Bosco 745; Asunción Paraguay.<sup>10</sup> Instituto de Medicina Tropical: Av. Venezuela y Florida; Asunción, Paraguay.**Correspondencia:** Nancy Melgarejo Touchet, correo electrónico: [nmtouchet@gmail.com](mailto:nmtouchet@gmail.com)**Editor responsable:** Dr. Ángel Ricardo Rolón**Cómo referenciar este artículo:** Melgarejo Touchet M, Busignani S, Kawabata A, Falcón M, López E, Zárate N, et al. Evaluación de pruebas de sensibilidad a colistina en Enterobacteriales aisladas en Paraguay. Rev. salud publica Parag. 2021; 11(2):8-19

Recibido el 01 de julio de 2021, aprobado para publicación el 21 de octubre de 2021

## RESUMEN

**Introducción:** La evolución de la resistencia a los antimicrobianos ha puesto en riesgo el valor de las drogas de amplio espectro disponibles para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y ha promovido el uso de otros como la colistina, sobre todo en infecciones por *Enterobacteriales* multirresistentes, siendo necesario conocer y definir metodologías confiables que puedan predecir su sensibilidad.**Objetivo:** Evaluar distintas metodologías de pruebas de sensibilidad a colistina en cepas aisladas de muestras clínicas y remitidas de diferentes centros del país.**Material y métodos:** Estudio retrospectivo, de corte transversal, realizado con cepas aisladas en diferentes hospitales de Paraguay, durante el periodo comprendido entre 2016-2019. Fueron evaluadas 5 metodologías diferentes: difusión de discos (Kirby Bauer), difusión de tiras de gradiente, elución de discos de colistina, automatizado Vitek®2, portación de *mcr-1* por reacción en cadena de la polimerasa; y comparadas con el método de referencia: la macrodilución en caldo, siendo los resultados de CIM obtenidos interpretados según EUCAST. Fueron calculadas las tasas de error (grave y muy grave) y la concordancia categórica.**Resultados:** Se encontró una concordancia categórica del 100 % entre el método de elución de discos de colistina y el método de referencia. Con los métodos de difusión de tiras de gradiente y automatizado Vitek®2, se hallaron errores muy graves: 42% y 56% respectivamente. Las cepas con halos de inhibición de 14 mm fueron resistentes en un 50%. La portación de *mcr-1* fue de 10,5%, resultando 1 de ellas sensible a colistina.**Conclusión:** Nuestros hallazgos demostraron que el método de elución de discos de colistina es confiable para el estudio de sensibilidad en *Enterobacteriales*. Los demás métodos evaluados no deberían ser utilizados para predecir la sensibilidad a colistina, ya que podrían orientar a un tratamiento inadecuado. Además, fueron encontradas cepas portadoras *mcr-1* con CIM ≤ 2ug/mL.**Palabras clave:** resistencia bacteriana; colistina; pruebas de sensibilidad microbiana; *Enterobacteriaceae*; Paraguay

## ABSTRACT

**Introduction:** The evolution of antimicrobial resistance has put at risk the value of broad-spectrum drugs available for the treatment of infectious diseases and has promoted the use of others such as colistin, especially in multi-resistant *Enterobacteriales* infections, being necessary to know and define reliable methodologies that can predict its sensitivity.**Objective:** With the aim of evaluating different colistin susceptibility test methods; the present study was carried out on isolated strains in different hospitals in Paraguay.**Methodology:** Retrospective, cross-sectional study, carried out with isolated strains in different hospitals in Paraguay, during the period between 2016-2019. Five colistin susceptibility testing methods were evaluated: disk diffusion (Kirby Bauer), gradient diffusion strips (Epsilometer test), colistin broth disk elution, automated Vitek®2 and *mcr-1* gene by PCR, and compared with the reference method: broth macrodilution. MIC results were evaluated using interpretive criteria available from the EUCAST. In addition, the error rates (major and very major), and categorical agreement were calculated.**Results:** Categorical agreement between colistin broth disk elution and broth macrodilution was 100%. With the Vitek®2 automated and gradient diffusion strips methods, very severe errors were found: 42% and 56% respectively. Strains with a zone diameter 14 mm were 50% resistant. The carriage of *mcr-1* was 10.5%, 1 of them being sensitive to colistin.**Conclusion:** Our findings showed that the colistin broth disk elution method is reliable for the study of susceptibility in *Enterobacteriales*. The other methods evaluated should not be used to predict sensitivity to colistin, as they could lead to inappropriate treatment. Furthermore, *mcr-1* carrier strains with MIC ≤ 2ug/mL were found.**Key words:** drug resistance, bacterial; colistin; microbial sensitivity tests; *Enterobacteriaceae*; Paraguay

## INTRODUCCIÓN

La evolución de la resistencia a los antimicrobianos ha puesto en riesgo el valor de las drogas de amplio espectro disponibles para el tratamiento de las enfermedades infecciosas<sup>(1)</sup>. La aparición de cepas productoras de carbapenemasas, que, por lo general van acompañadas de otros mecanismos de resistencia, ha dado origen a bacterias resistentes a múltiples antibióticos<sup>(2)</sup>, a esta situación se suma la pobre producción farmacéutica de nuevos antimicrobianos, haciendo cada vez más difícil lograr el éxito terapéutico contra las infecciones bacterianas.

En nuestro país, las primeras cepas portadoras de carbapenemasa del tipo KPC fueron confirmadas en *Enterobacteriales* (ETB) en el año 2009<sup>(2)</sup>, y desde ese entonces se han registrado brotes en distintos centros asistenciales de todo el país. Las carbapenemasas del tipo metalobetalactamasa genotipo NDM, fueron detectadas y confirmadas en Asunción y Central en *Acinetobacter pittii* en el año 2012<sup>(3)</sup>, siendo Paraguay el primer país en confirmar la presencia de este mecanismo de resistencia en *Acinetobacter* sp. en la región<sup>(4)</sup>, y actualmente es una de las carbapenemasas más frecuentes en ETB.

Toda esta problemática de carácter mundial ha promovido la consideración de la utilización de drogas en desuso, como las polimixinas, para el tratamiento terapéutico, antimicrobianos que por muchos años han sido relegados por su toxicidad<sup>(5,6)</sup>.

Actualmente, sólo dos polimixinas, polimixina E (colistina) y polimixina B, están disponibles comercialmente. La colistina ha resurgido como tratamiento de última línea a mediados de la década de los 90 para el tratamiento de infecciones severas ocasionadas por bacilos gramnegativos resistentes a múltiples antimicrobianos<sup>(7,8)</sup>.

Desafortunadamente, el aumento de la utilización de este antimicrobiano trajo aparejado el incremento de su resistencia a nivel mundial.

Los mecanismos de resistencia a esta droga son de varios tipos: intrínsecos, que son propios de los microorganismos; y adquiridos, que pueden ser cromosómicos y plasmídicos<sup>(9)</sup>.

Hasta el año 2015, los mecanismos de resistencia cromosómicos a la colistina eran los únicos conocidos, siendo el más común la modificación del lipopolisacárido (LPS) de la membrana plasmática<sup>(9)</sup>. También se ha encontrado heteroresistencia en algunas cepas como consecuencia de mutaciones cromosómicas y que describe la presencia de 2 poblaciones con diferentes perfiles de sensibilidad a la colistina<sup>(10-12)</sup>.

Desde la publicación del hallazgo del mecanismo plasmídico de resistencia a polimixinas en *Escherichia coli* (eco), a finales del 2015<sup>(13)</sup>, cuyo gen codificante es el *mcr-1* (*Mobile Colistin Resistance*), se llevaron a cabo estudios retrospectivos en animales, alimentos, humanos y medioambiente, los mismos evidenciaron que este mecanismo se halla ampliamente diseminado en varios países del mundo, en muestras de diversos orígenes y en diferentes especies de ETB<sup>(14,15)</sup>.

Estudios detallados del gen realizados por varios grupos de investigadores, han demostrado la gran cantidad de variantes (22 variantes genéticas funcionales de *mcr-1*)<sup>(16,17)</sup> y alelos nuevos de *mcr-1* (de *mcr-2* a *mcr-9*) circulantes<sup>(18-20)</sup>.

En Paraguay, el hallazgo y confirmación de *mcr-1* fue en agosto de 2016, en cepas de *Klebsiella pneumoniae* (kpn) aisladas de muestras urinarias de pacientes ambulatorios<sup>(21)</sup>; luego fue detectada en otros miembros de ETB aislados tanto de pacientes hospitalizados como de la comunidad. Se observó además en estos aislamientos la presencia de resistencia acompañante a otros antimicrobianos, incluyendo a carbapenémicos por la producción de carbapenemasas<sup>(22)</sup>.

El gran desafío para los laboratorios de microbiología clínica, sin dudas, representa el análisis de los aislamientos bacterianos a fin de obtener el perfil de susceptibilidad a la colistina, lo cual guarda relación con las características estructurales de droga que dificultan la tarea a la hora de la realización de las pruebas de sensibilidad<sup>(23)</sup>.

A lo largo de los años, las guías internacionales, como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing* (EUCAST), han realizado revisiones y modificaciones en relación a las polimixinas, como cambios en los criterios de interpretación, en las composiciones de las drogas y componentes utilizados para la realización de las pruebas de sensibilidad; y en el año 2016 ambas instituciones han conformado un grupo de trabajo conjunto y han publicado recomendaciones para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de colistina para un grupo de microorganismos; siendo la microdilución en caldo la metodología de referencia recomendada para ETB, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp., y recomendando la no utilización de metodologías de difusión en agar<sup>(24)</sup>.

En cuanto a los criterios de interpretación, el CLSI, luego de retirar los puntos de corte para colistina de sus tablas de interpretación para ETB en 1986, los volvió a incorporar este año 2020<sup>(25)</sup>; categorizando las CIM ( $I \leq 2$ ,  $R \geq 4$ ), a diferencia del EUCAST que las mantiene ( $S \leq 2$ ,  $R \geq 4$ )<sup>(26)</sup>.

En nuestro país como en toda la región, los laboratorios de microbiología clínica se encuentran limitados para la determinación de la CIM por el método de referencia propuesto, tanto en insumos como por la complejidad del trabajo requerido para ello.

El Laboratorio de Referencia Regional (LRR); del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI-ANLIS) Dr. Carlos Malbrán de Argentina; ha estandarizado para los laboratorios clínicos y de referencia de los países de la región, alternativas para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a colistina; categorizando las distintas metodologías en 3 grupos<sup>(27)</sup>:

Metodologías de referencia (MR): que incluyen la microdilución en caldo, macrodilución en caldo, dilución en agar y reacción en cadena de la polimerasa para *mcr-1*;

Metodologías aceptadas (MA): que incluyen al *sensititre*, *Walkaway* (MicroScan), predifusión con tabletas de colistina, COL-agar-spot, COLTEST, CIM por elución de discos de colistina de 10 ug, *Colistin Drop-test*, y

Metodologías cuestionadas (MC) que son las *Rapid Polymyxin NP test*, Vitek 2, Phoenix; difusión de discos y tiras de gradientes.

Además, recomienda la utilización de los puntos de corte de EUCAST para la interpretación de los valores de CIM.

En Paraguay, es cada vez mayor la necesidad de contar con esta droga para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, por lo que resulta imperiosa la evaluación de las metodologías utilizadas en los laboratorios clínicos, con las cepas aisladas en nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio multicéntrico coordinado por el Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), llevado a cabo en la Sección Antimicrobianos con cepas de ETB remitidas por los laboratorios que conforman la Red Nacional de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos Paraguay.

Fueron estudiadas 86 cepas de ETB remitidas por 16 diferentes centros, para confirmación de resistencia a colistina, en el periodo comprendido entre 2016 a 2019. Las mismas, luego de ser identificadas por pruebas bioquímicas convencionales, fueron sometidas de manera simultánea a las pruebas de susceptibilidad a colistina por 6 metodologías diferentes:

Difusión de discos: Se evaluó el halo de inhibición en mm por el método de Kirby Bauer (KB), con discos de colistina de 10 ug de la marca BioRad<sup>(25)</sup>;

Difusión de tiras de gradiente, método epsilométrico (EPS): Se evaluó la CIM utilizando tiras de gradiente de colistina de la marca Liofilchem<sup>(25)</sup>;

Macrodilución en caldo (MAC): Se evaluó la CIM, siguiendo las recomendaciones del CLSI (*Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 10th ed. CLSI document M07-A010. CLSI, Wayne, PA.*), utilizando colistina sulfato de la marca Alfa Aesar, con volumen final de 1 mL, y con rango de concentración de 0,25 a 8 ug/mL;

Elución de discos de colistina de 10 ug (ELU): Se evaluó la CIM siguiendo recomendaciones del CLSI y el LRR, utilizando por cepa, 4 tubos de 10 mL de caldo con 0, 1, 2 y 4 discos de colistina de 10 ug respectivamente<sup>(25, 27)</sup>;

Equipo automatizado Vitek®2 (VTK): Se evaluó la CIM, con la utilización de tarjetas AST-N303, según recomendaciones de la marca;

Análisis molecular de portación del gen *mcr-1* (PCR): Se evaluó la presencia del gen *mcr-1*, según protocolo del LRR

(disponible en la página web: <http://antimicrobianos.com.ar/2016/01/deteccion-deresistencia-transferible-a-colistin-gen-mcr-1/>)

La metodología de referencia utilizada fue la MAC, recomendada por el LRR (27), y la interpretación de los resultados fue realizada utilizando los puntos de corte de EUCAST (Sensible ≤2 ug/mL, Resistente ≥4 ug/mL)<sup>(26)</sup>.

Además, fueron calculadas las siguientes tasas:

Error grave (EG): Resultados falsos resistentes (resistente por metodología de prueba y sensible por metodología de referencia).

Error muy grave (EMG): Resultados falsos sensibles (sensible por metodología de prueba y resistente por metodología de referencia).

Concordancia categórica(CC): Concordancia en la interpretación de las CIM de las metodologías evaluadas y el método de referencia.

El valor de ≤3% para las tasas de EG y EMG es el máximo permitido por CLSI para pruebas de sensibilidad (FDA permite tasa de EMG de ≤1,5% como máximo); y para CC ≥ 90%<sup>(28)</sup>.

**Control de calidad:** Las cepas controles utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC® 25922™ (CIM a colistina: 0,25-2 ug/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ (CIM a colistina: 0,5-4 ug/mL) (25), y OPS 229-Programa Latinoamericano de Control de Calidad (control positivo de *mcr-1* y MAC) (CIM a colistina: 4-8 ug/mL).

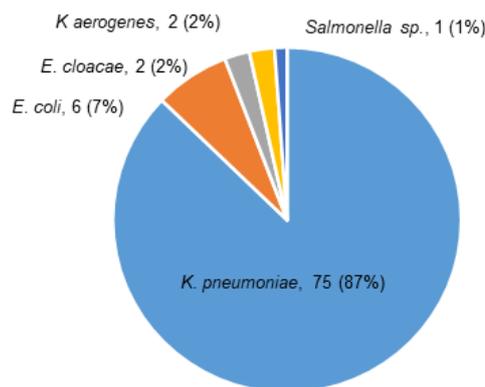
**Aspectos éticos:** La revisión y aprobación del protocolo de investigación (Referencia: Protocolo CEI-LCSP N° 185/13062020) fue realizada por parte del Comité de Ética en Investigación del Laboratorio Central de Salud Pública (Certificación Internacional FWA N° FWA00020088), y el dictamen favorable fue otorgado en fecha 16 de julio de 2020 (Dictamen 139/2020).

**Conflicto de intereses:** Ninguno

## RESULTADOS

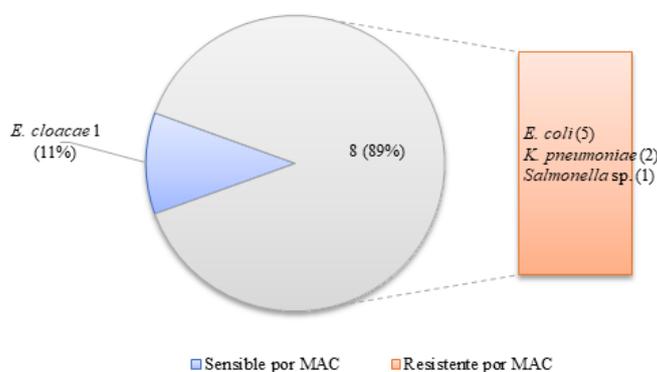
De las 86 cepas de ETB estudiadas en la Sección Antimicrobianos del Departamento Bacteriología y Micología del LCSP, 82 (95 %) fueron de origen hospitalario, siendo el 76% de las mismas portadoras de carbapenemasa. Los resultados de tipificación fueron los siguientes: 75 (87,21 %) correspondieron a *Klebsiella pneumoniae* (kpn), 6 (6,97 %) a *Escherichia coli* (eco), 2 (2,33 %) a *Klebsiella aerogenes* (eae), 2 (2,33 %) a *Enterobacter cloacae* (ecl) y 1 (1,16 %) de ellas a *Salmonella* Schwarzengrund (sal). Figura 1.

El 13% de las mismas fueron sensibles a la colistina y 87% resistentes utilizando la metodología de referencia (MAC); 9 cepas (10,5 %) portaban el gen de resistencia plasmídica a colistina (*mcr-1*). Figura 2.



Fuente: Dpto. Bacteriología y Micología. Sección Antimicrobianos. Laboratorio Central de Salud Pública.

Figura 1. Evaluación de pruebas de sensibilidad a colistina en *Enterobacteriales* aisladas en Paraguay (2016 - 2019). n 86.



Fuente: Dpto. Bacteriología y Micología. Sección Antimicrobianos. Laboratorio Central de Salud Pública.

Figura 2. Portación del gen *mcr-1* en cepas de *Enterobacteriales* aisladas en Paraguay. (2016 – 2019). n 86.

**Comparación de ELU con MAC:** Los resultados obtenidos por ELU fueron concordantes con los de MAC en el 100% en lo referente a las interpretaciones de las CIM (sensibles/resistentes); sin embargo, fueron observadas diferencias en 1 dilución en 6 cepas.

**Comparación de EPS con MAC:** Se encontró 100 % de concordancia entre los resultados por EPS y MAC en cepas resistentes a la colistina. En cepas sensibles, se encontraron discrepancias en el 42 % (error muy grave).

**Comparación de VTK con MAC:** El 100% de los resultados resistentes por este método fueron concordantes con el método MAC; sin embargo, se encontraron diferencias del 56% en cepas sensibles a la colistina. Con una cepa de *E. cloacae* con heterorresistencia a la colistina se obtuvo una CIM  $\leq 0,5$  ug/mL con el VTK.

La tabla 1 compara los resultados de las pruebas de sensibilidad a colistina, con valores de CIM; así como la tasa de EMG de cada método comparado con el de referencia MAC.

**Comparación de KB con MAC:** Las cepas con halo de inhibición menor a 12 mm ( $\leq 11$  mm), fueron en el 100% resistentes con la metodología de referencia; sin embargo, con halos de 12 mm y más, se obtuvieron diferentes resultados, tanto sensibles (37%) como resistentes (63%). En la tabla 2 se muestran los resultados de los halos de inhibición (mm) de las cepas estudiadas.

**Comparación de portación de *mcr-1* con MAC:** El gen *mcr-1* fue detectado en 9 cepas (10,5%), con halos de inhibición comprendidos entre 10 y 13 mm; una de las 9 cepas resultó sensible a colistina por MAC. Las especies con portación de dicho gen fueron: *kpn* (n: 2), *eco* (n: 5), *sal* (n: 1) y *ecl* (n: 1). Ocho de estas cepas con portación de *mcr-1* contaban con genes de resistencia acompañante a otros antimicrobianos: Betalactamasa de espectro extendido genotipo CTX-M, resistencia a quinolonas mediada por plásmidos genotipo *qnrB* y carbapenemasa del grupo *2f* genotipo KPC.

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas de susceptibilidad a colistina en cepas de *Enterobacteriales* por 4 metodologías que arrojan CIM (ug/mL). n 86

MÉTODO	N (%)		CC %	EMG %
	Sensible ≤ 2 ug/mL	Resistente ≥4 ug/mL		
Macrodilución en caldo	11 (13)	75 (87)	-	-
Elución de discos de colistina	11 (13)	76 (87)	100	0
Epsilométrico	19 (22)	67 (78)	89	42
Vitek®2	25 (29)	61 (71)	81	56

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima; EMG: Error Muy Grave; CC: Concordancia Categórica.

**Tabla 2.** Comparación de los resultados de evaluación de la sensibilidad a colistina en cepas de *Enterobacteriales*, por los métodos Kirby Bauer y macrodilución en caldo. n 86

	Macrodilución en caldo	
	CIM ≤ 2 ug/mL Sensible (n 11)	CIM ≥ 4 ug/mL Resistente (n 75)
<b>Halos de inhibición Kirby Bauer</b>		6 mm (n 12)
		7 mm (n 14)
		8 mm (n 3)
		9 mm (n 7)
		10 mm (n 12)
		11 mm (n 8)
		12 mm (n 6)
		13 mm (n 7)
		14 mm (n 6)

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima, mm: milímetro.

## DISCUSIÓN

Estudios similares comparativos entre diferentes metodologías de evaluación de la sensibilidad a colistina, y los resultados obtenidos fueron muy variados; sin embargo, la mayoría de ellos coinciden en que los datos proporcionados por pruebas que no sean de referencia pueden conducir a una terapia inadecuada con colistina, y el consecuente fracaso terapéutico<sup>(29-34)</sup>.

A pesar de los años que lleva en el mercado esta droga, de amplio uso tanto en salud veterinaria como humana; no se ha logrado definir el método óptimo para determinar su sensibilidad en los laboratorios de rutina; además, las guías y los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad han sufrido varias modificaciones a lo largo del tiempo, como cambios sucesivos

en los puntos de corte e interpretación, en las composiciones de los drogas y componentes utilizados, por citar algunos de ellos. Un trabajo interesante fue desarrollado en el año 2016 por el *Polymyxin Breakpoints Working Group*, y como resultado fueron publicadas las recomendaciones para la determinación de CIM a colistina; considerando la microdilución en caldo como la única metodología válida<sup>(24)</sup>.

Teniendo en cuenta que no todos los laboratorios de microbiología clínica cuentan con las capacidades (insumos, personal calificado, complejidad) para llevar a cabo las pruebas de dilución; el LRR ha puesto a consideración varias alternativas<sup>(27)</sup> para la predicción de la susceptibilidad a la colistina. Es muy importante que los laboratorios de referencia lleven a cabo estudios sobre las metodologías disponibles en el país, a fin de facilitar recomendaciones sobre el desempeño de estas pruebas.

Este trabajo lo llevamos a cabo, como Laboratorio de Referencia Nacional, con cepas de *Enterobacteriales* aisladas y remitidas por los centros colaboradores; a fin de evaluar el desempeño de las metodologías más utilizadas a nivel nacional, establecer las tasas de error y evaluar las características de las cepas con portación de mecanismo plasmídico de resistencia a colistina (*mcr-1*) con cada una de las técnicas evaluadas.

El método con el mejor desempeño, según nuestros resultados, fue el de ELU; con el cual se ha obtenido un valor de CC del 100% en comparación con la metodología de referencia. Con ello, concluimos que el método de ELU es confiable para el reporte de la susceptibilidad de la colistina en bacilos gramnegativos pertenecientes a ETB. Además, tiene la ventaja de ser económica y sencilla de realizar; pudiendo los laboratorios de rutina optar por la realización del macro o micrométodo (adaptación del LRR) y ponerla a punto<sup>(27)</sup>, a fin de brindar resultados confiables para orientar el tratamiento de los pacientes.

En un estudio similar en bacilos gramnegativos, Patricia J. Simner y colaboradores<sup>(29)</sup>, obtuvieron con esta metodología (ELU) resultados de CC similares al nuestro, (100%) al utilizar como método de referencia la MAC; además obtuvieron concordancia del 98% con microdilución en caldo como método de referencia.

En contrapartida, según nuestro estudio, el método que presentó peor desempeño fue el VTK, con el que se obtuvo una tasa de EMG de 56%; seguido del método EPS, con una tasa de EMG del 42 %. Con ambos métodos no se observaron EG.

Publicaciones recientes similares a este trabajo concuerdan con nuestros hallazgos. Chew, KL y colaboradores<sup>(30)</sup>, encontraron tasas elevadas de EMG para las metodologías de VTK y EPS; y Dafopoulou K. y colaboradores<sup>(31)</sup>, en el año 2015, en un estudio de evaluación comparativa de métodos de sensibilidad a colistina en *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*, han comunicado tasa de EMG de 39,3% para el método EPS; sin embargo, obtuvieron resultados diferentes a los nuestros para VTK, no detectando EMG para esta metodología.

En un estudio también realizado en ETB en el año 2011,

Maalej S.M. y colaboradores<sup>(32)</sup>, han reportado resultados de CC de apenas el 33% entre el método EPS y el que utilizaron de referencia (dilución en agar).

En el año 2008, Melda S y colaboradores<sup>(33)</sup> en un estudio de comparación de métodos de sensibilidad a colistina en cepas *Acinetobacter baumannii* sensibles a esta droga encontraron CC con los métodos de KB y EPS en comparación con la metodología de referencia utilizada (microdilución en caldo); es decir, no encontraron EG. De manera similar, nuestros resultados con las técnicas de EPS y VTK no arrojaron EG, hallazgos que respaldan los resultados de resistencia a colistina, no así los resultados obtenidos como sensibles, motivo por el cual no recomendamos el uso de ambas metodologías en los laboratorios de microbiología clínica.

Para el método de difusión de discos (KB), no hemos podido calcular las tasas de error, ya que las guías disponibles no cuentan con puntos de corte en sus tablas de interpretación, e incluso esta metodología está desaconsejada; sin embargo, muchos laboratorios de rutina la siguen utilizando. Nuestros resultados confirman que la misma, a pesar de ser sencilla y práctica, no es confiable para el reporte de sensibilidad en ETB, aun con halos de inhibición de 14 mm (según nuestros hallazgos, resistentes en el 50%). Solo podríamos garantizar que las cepas con halos de inhibición  $\leq 11$  mm son resistentes. Estudios publicados por varios investigadores, como Gales y colaboradores<sup>(34)</sup> y Maalej J.M. y colaboradores<sup>(32)</sup>, también han concluido que el método KB no es confiable para la determinación de la sensibilidad de la colistina.

En cuanto a las cepas con portación del gen *mcr-1*, nuestros hallazgos evidenciaron la circulación en el país, de cepas de ETB con  $CIM \leq 2$  ug/mL.

Para finalizar; si bien existen diversas metodologías para la realización de pruebas de susceptibilidad a la colistina disponibles en el país y al alcance de los laboratorios de microbiología clínica, es importante que los profesionales bacteriólogos conozcan el desempeño de estas pruebas, considerando que algunas tienen muy bajo rendimiento, con tasas de EMG que superan lo recomendado por los organismos certificadores, y los resultados obtenidos de los mismos podrían conducir a una terapia antimicrobiana inadecuada, resultando finalmente en el fracaso terapéutico para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, sobre todo aquellas en las que están involucradas gérmenes multirresistentes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. George H. Talbot, John Bradley, John E. Edwards, Jr., David Gilbert, Michael Scheld, and John G. Bartlett. "Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(5):657-668. <http://www.jstor.org/stable/4484678>.
2. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón M. Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Revista de Salud Pública del Paraguay*. 2013; 3(1):30-5.

3. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Alerta Epidemiológica. Primer hallazgo de Metalobetalactamasa. New Delhi (NDM) en Paraguay. 26 de noviembre de 2012. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/dependencias/imt/uploads/Documento/alerta6.pdf>.
4. Pasteran F, Mora MM, Albornoz E, Faccione D, Franco R, Ortellado J, Melgarejo N, Gomez S, Riquelme I, Matheu J, Ramon-Pardo P, Corso A. Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep;69(9):2575-8. doi: 10.1093/jac/dku139. Epub 2014 May 3. PMID: 24793901.
5. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet*. 2017 Dec;56(12):1441-1460. doi: 10.1007/s40262-017-0561-1. PMID: 28550595.
6. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A 3rd, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*. 2010 Dec;30(12):1279-91. doi: 10.1592/phco.30.12.1279. PMID: 21114395; PMCID: PMC4410713.
7. Dijkmans AC, Wilms EB, Kamerling IM, Birkhoff W, Ortiz-Zacarias NV, van Nieuwkoop C, Verbrugh HA, Touw DJ. Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. *Ther Drug Monit*. 2015 Aug;37(4):419-27. doi: 10.1097/FTD.0000000000000172. PMID: 25549206.
8. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005 May 1;40(9):1333-41. doi: 10.1086/429323. Epub 2005 Mar 22. Erratum in: *Clin Infect Dis*. 2006 Jun 15;42(12):1819. Dosage error in article text. PMID: 15825037.
9. El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):868-885. doi: 10.1080/22221751.2020.1754133. PMID: 32284036; PMCID: PMC7241451.
10. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun;30(2):391-414. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.005. PMID: 27208765.
11. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 May;49(5):526-535. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28163137.
12. Snitkin ES, Zelazny AM, Gupta J; NISC Comparative Sequencing Program, Palmore TN, Murray PR, Segre JA. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res*. 2013 Jul;23(7):1155-62. doi: 10.1101/gr.154328.112. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23564252; PMCID: PMC3698508.
13. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 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 Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26603172.
14. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, Dumoulin R, Nordmann P, Madec JY. Co-occurrence of extended spectrum  $\beta$  lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *Lancet Infect Dis*. 2016 Mar;16(3):281-2. doi:

- 10.1016/S1473-3099(16)00007-4. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26774244.
15. Sun J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 2018 Sep;26(9):794-808. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.006. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29525421.
  16. Tijet N, Faccone D, Rapoport M, Seah C, Pasterán F, Ceriana P, Alborno E, Corso A, Petroni A, Melano RG. Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. *PLoS One.* 2017 Jul 5;12(7):e0180347. doi: 10.1371/journal.pone.0180347. PMID: 28678874; PMCID: PMC5498056.
  17. Lu X, Hu Y, Luo M, Zhou H, Wang X, Du Y, Li Z, Xu J, Zhu B, Xu X, Kan B. MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Apr 24;61(5):e02632-16. doi: 10.1128/AAC.02632-16. PMID: 28264851; PMCID: PMC5404552.
  18. Zhang J, Chen L, Wang J, Butaye P, Huang K, Qiu H, Zhang X, Gong W, Wang C. Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1 to mcr-5) in human vaginal swabs. *BMC Res Notes.* 2018 Feb 20;11(1):143. doi: 10.1186/s13104-018-3255-3. PMID: 29463301; PMCID: PMC5819219.
  19. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Jul 4;7(1):122. doi: 10.1038/s41426-018-0124-z. PMID: 29970891; PMCID: PMC6030107.
  20. Carroll LM, Gaballa A, Guldemann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio.* 2019 May 7;10(3):e00853-19. doi: 10.1128/mBio.00853-19. PMID: 31064835; PMCID: PMC6509194.
  21. Emergencia de resistencia a colistina/polimixina B por presencia de mcr-1 (mobilecolistinresistance) en Paraguay. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/lcsp/14258/comunicado-resistencia-a-colistina-en-paraguay.html>.
  22. Melgarejo Touchet N, Martínez M, Franco R, Falcón M, Busignani S, Espinola C, Takahasi V, Meyer I, Almada S, Segovia N, Ortellado J. Resistencia plasmídica a colistin por el gen mcr-1 en Enterobacteriaceae en Paraguay. *Rev. salud publica Parag.* 2018 June;8(1):44-48. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sciarttext&pid=S2307-33492018000100044&lng=en>. <https://doi.org/10.18004/rspp.2018.junio.44-48>.
  23. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1678-84. doi: 10.1128/JCM.03385-12. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23486719; PMCID: PMC3716094.
  24. EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016;(March, 22):2016. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General)
  - docs/Recommendations fo MIC determination of colistin March 2016.pdf.
  25. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-thirtieth informational supplement M100-S30. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  26. EUCAST 2020 breakpoint table versión 10.0 (2020). [https://eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://eucast.org/clinical_breakpoints/).
  27. INEI-ANLIS. Servicio Antimicrobianos. Novedades CLSI 2020 Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/2020/06/novedades-clsi-2020/>.
  28. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, marzo de 2018, 56 (4) e01934-17; DOI:10.1128 / JCM.01934-17.
  29. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, Campeau S, Kazmi AQ, Bell DT, Lewis S, Tamma PD, Humphries R, Hindler JA. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 2019 Jan 30;57(2):e01163-18. doi: 10.1128/JCM.01163-18. PMID: 30282791; PMCID: PMC6355542.
  30. 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.
  31. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pourmaras S, Tsakris A. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4625-30. doi: 10.1128/AAC.00868-15. Epub 2015 May 26. PMID: 26014928; PMCID: PMC4505270.
  32. Maalej SM, Meziou MR, Rhimi FM, Hammami A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Nov;53(5):546-51. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03145.x. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21895730.
  33. Sınırtaş M, Akalin H, Gedikoğlu S. Investigation of colistin sensitivity via three different methods in *Acinetobacter baumannii* isolates with multiple antibiotic resistance. *Int J Infect Dis.* 2009 Sep;13(5):e217-20. doi: 10.1016/j.ijid.2008.12.012. Epub 2009 Feb 20. PMID: 19230734.
  34. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):183-90. doi: 10.1128/JCM.39.1.183-190.2001. PMID: 11136768; PMCID: PMC87699.