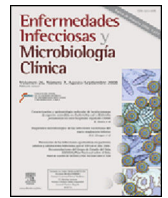




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos



Gabriel Alberto March-Roselló

Servicio de Microbiología e Inmunología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de noviembre de 2016

Aceptado el 16 de diciembre de 2016

On-line el 18 de enero de 2017

Palabras clave:

Antibiograma rápido

Antibiograma directo

Sensibilidad

R E S U M E N

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

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics

A B S T R A C T

The most widely used antibiotic susceptibility testing methods in Clinical Microbiology are based on the phenotypic detection of antibiotic resistance by measuring bacterial growth in the presence of the antibiotic being tested. These conventional methods take typically 24 hours to obtain results. Here we review the main techniques for rapid determination of antibiotic susceptibility. Data obtained with different methods such as molecular techniques, microarrays, commercial methods used in work routine, immunochromatographic methods, colorimetric methods, image methods, nephelometry, MALDI-TOF mass spectrometry, flow cytometry, chemiluminescence and bioluminescence, microfluids and methods based on cell disruption are analysed in detail.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Rapid antibiotic susceptibility test

Direct antibiotic susceptibility test

Susceptibility

Introducción

Para conseguir una evolución clínica favorable de los pacientes que padecen infecciones, el laboratorio de Microbiología Clínica debe informar lo más rápidamente posible el agente causal de dicha infección. Si es una bacteria que no presenta una sensibilidad homogénea a los antibióticos se debe informar, además, el antibiograma, ya que el notable aumento de resistencias a antimicrobianos difícult, en algunos casos, el tratamiento empírico.

Las técnicas rutinarias del antibiograma se basan en un estudio fenotípico en el que se observa el crecimiento microbiano en presencia de diferentes antibióticos. Estas técnicas incluyen la dilución en agar (*gold standard* del antibiograma), macrodilución y microdilución en caldo, tiras con un gradiente de antibiótico, y requieren unas 17 h para la obtención de resultados. Con el fin de acortar este tiempo, sería deseable disponer de los resultados del antibiograma de una forma rápida y fiable. Para evaluar la fiabilidad, de acuerdo con la *Food and Drug Administration* (FDA)¹, los resultados de un antibiograma rápido se clasifican, con respecto al antibiograma obtenido mediante el *gold standard*, como *agreements* (concordancia), *minor errors* (resultado erróneo de una

Correo electrónico: gmr810@hotmail.com

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>

0213-005X/© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

sensibilidad intermedia), *major errors* (falsa resistencia) y *very major errors* (falsa sensibilidad).

Existe un considerable número de técnicas instrumentales que permiten llevar a cabo un antibiograma rápido. Entre estas cabe destacar las técnicas moleculares, *microarrays*, métodos comerciales utilizados en el trabajo de rutina, técnicas inmunocromatográficas, métodos colorimétricos, métodos de imagen, nefelometría, espectrometría de masas MALDI-TOF, citometría de flujo, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, microfluidos y métodos de lisis bacteriana. A continuación se expone el fundamento de cada una de estas técnicas y los resultados obtenidos.

Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares permiten la detección de material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN). Entre las técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la que ha adquirido un mayor valor diagnóstico, ya que permite una identificación certera del agente infeccioso, además de ser el método de referencia para caracterizar sus genotipos de resistencia y virulencia. La realización de una PCR convencional requiere aproximadamente unas 12 h y consta de 3 etapas. La primera consiste en una extracción del material genético. La segunda etapa, llevada a cabo en un termociclador, se corresponde con la amplificación del ADN. El termociclador permite alcanzar las temperaturas óptimas necesarias para que tengan lugar cada uno de los 3 pasos de los que consta un ciclo de amplificación (desnaturalización del ADN que se va a usar como molde, anillamiento de cebadores sintéticos o *primers* y extensión catalizada por la ADN polimerasa de los *primers*). La amplificación se repite un número determinado de veces, generalmente de 25 a 35, duplicándose cada vez el número de moléculas de producto (amplicones). De esta forma se sintetiza un elevado de amplicones, lo que permite detectar cantidades iniciales de ADN muy pequeñas². Finalmente, en la tercera etapa de la PCR se lleva a cabo la detección de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa. Con el fin de acortar el tiempo de diagnóstico de la PCR convencional se ha diseñado la PCR en tiempo real, en la que paralelamente a la amplificación tiene lugar, mediante diferentes métodos, la detección de los amplicones sintetizados. De este modo, la PCR en tiempo real permite obtener resultados en pocas horas².

Se han comercializado varias PCR en tiempo real que permiten obtener la identificación de varios agentes patógenos y de los genes que confieren resistencia a antibióticos directamente a partir de diferentes muestras. Estas PCR están totalmente automatizadas, de tal forma que el procesamiento de las muestras solo requiere unos minutos. El sistema Verigene[®] (Nanosphere) se aplica a partir de frascos de hemocultivo crecidos. La detección de los amplicones tiene lugar mediante hibridación con oligonucleótidos específicos sintéticos marcados con nanopartículas de oro. En bacterias grampositivas detecta, en menos de 3 h y con una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100%, 9 especies y 4 géneros bacterianos, así como los genes de resistencia *mecA* y *vanA/B*³. En bacterias gramnegativas detecta, con el mismo tiempo de respuesta y con una sensibilidad y especificidad superiores al 93%, 5 especies y 4 géneros bacterianos, y los genes de resistencia que codifican β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M y carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA⁴. El sistema FilmArray Blood Culture Identification Panel (BioFire Diagnostics) también se aplica a partir del frasco de hemocultivo crecido. En este caso se realiza una PCR anidada en la que primero se amplifica una región de ADN que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR que tiene lugar en una matriz con pocillos que contienen los *primers* de los

diferentes ensayos. Finalmente, mediante el fluorocromo LCGreen[®] Plus (BioFire Diagnostics), el instrumento evalúa la curva de fusión del ADN en cada pocillo de la matriz para determinar si aparece, en dicho pocillo, un producto de la PCR. Este sistema detecta, en una hora, 11 especies y 15 géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas, y 5 especies de levaduras. Además detecta los genes de resistencia *mecA*, *vanA/B* y *KPC*. La sensibilidad oscila entre el 83 y el 100% y la especificidad es superior al 99%, dependiendo del patógeno estudiado³. El sistema GeneXpert[®] realiza la PCR en tiempo real en cartuchos desechables de un solo uso. Existe un número considerable de cartuchos para llevar a cabo diferentes análisis. Para la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina a partir de muestras clínicas están disponibles 2 cartuchos, el Xpert MRSA/SA[®] BC, que se utiliza a partir de frascos de hemocultivo crecidos, y el Xpert[®] MRSA/SA SSTI, que se utiliza a partir de hisopos para el diagnóstico de infecciones de piel y tejidos blandos. Ambas pruebas requieren una hora para la obtención de resultados y presentan una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100%^{3,5}. El cartucho Xpert MTB/RIF[®] detecta *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina a partir del esputo y de líquidos biológicos en 2 h. En este caso tiene lugar una PCR anidada semicuantitativa. Se ha observado que en el esputo y en el lavado broncoalveolar la prueba presenta una sensibilidad y una especificidad del 86,8 y del 93,1%, respectivamente, mejorando los resultados de la baciloscopia⁶.

En la literatura se han descrito un considerable número de PCR, tanto «caseras» como comerciales y automatizadas, y kits para PCR que detectan, de forma certera y con una sensibilidad y especificidad prácticamente del 100%, un gran número de genes que confieren resistencia a los antibióticos⁷. Es preciso señalar que estas metodologías no proporcionan la identificación microbiana y que se aplican, en la mayoría de los casos, a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento.

Entre de las PCR comerciales automatizadas en tiempo real cabe destacar las siguientes. La plataforma NucliSENS EasyQ[®] KPC (bioMérieux) detecta, en 2 h, genes que codifican carbapenemasas tipo KPC⁸. El cartucho Xpert Carba-R[®] de GeneXpert[®] detecta, en una hora, genes que codifican carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48⁹. El sistema eazyplex[®] (Amplex Biosystems GmbH) consiste en una plataforma que realiza la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Esta técnica se fundamenta en la amplificación de ADN por desplazamiento de cadena a una temperatura constante; de este modo, el sistema no precisa de termociclador. Para llevar a cabo la amplificación, el ADN extraído es introducido en un tubo que contiene un liofilizado con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos; seguidamente, este tubo es introducido en el equipo Genie[®] II (OptiGene) que mantiene el tubo a una temperatura constante y detecta, en tiempo real, los amplicones formados. Para esta plataforma se han comercializado varios kits que detectan, en menos de 30 min, genes que confieren resistencia a antibióticos. Uno a destacar es el eazyplex[®] SuperBug CRE que detecta, tanto a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento como directamente a partir de muestras de orina y frascos de hemocultivo crecidos, genes que codifican BLEE tipo CTX-M y carbapenemasas tipo VIM, NDM, KPC y OXA-48¹⁰. AID Autoimmun Diagnostika GmbH ha comercializado una PCR basada en ensayos de sondas en línea. En este caso, una vez que se ha realizado la PCR tiene lugar la hibridación reversa de los amplicones con sondas complementarias ancladas a una tira de nitrocelulosa. La hibridación es detectada utilizando un marcador de biotina presente en los *primers* utilizados en la PCR, obteniéndose un patrón de bandas que se interpreta de forma visual o con un escáner. Entre los kits de resistencia a antibióticos destaca el AID ESB� que detecta genes que codifican BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M y carbapenemasas tipo KPC en 5 h¹¹.

Entre los kits comercializados para la detección de genes que confieren resistencia bacteriana a los antibióticos es interesante destacar los siguientes: LightMix (Roche Diagnostics) y Check-Direct CPE (Check-Points Health B.V.). El LightMix, utilizando la plataforma LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics), detecta carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48 en una hora y media. Cabe resaltar que este kit también puede ser aplicado a partir de frascos de hemocultivo crecidos¹². El kit Check-Direct CPE puede utilizarse en varias plataformas de PCR en tiempo real, como la ABI 7500 (Applied), CFX96™ (Bio-Rad), LightCycler® 480 system I & II (Roche), Rotor-Gene Q (Qiagen) y BD MAX™ (Becton Dickinson). Este kit incorpora los reactivos necesarios para la detección, en 2 h, de genes que codifican carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM y OXA-48⁹. Asimismo, se han comercializado algunos kits para la realización de una PCR mediada por ligación. Resumidamente, en esta PCR se utilizan 2 sondas de ADN que reconocen una de las 2 hebras del gen que interesa detectar. En caso de producirse la hibridación, las sondas quedan adyacentes y una ADN ligasa se encarga de unir las, generando un ADN de doble cadena. Este paso de ligación se realiza en el equipo MyCycler (Bio-Rad). Por último, la PCR en tiempo real tiene lugar en la plataforma ABI 7500 (Applied) utilizando unos *primers* universales. Entre los kits que detectan genes que codifican resistencias bacterianas a antibióticos mediante PCR por ligación cabe resaltar dos: uno para BLEE tipo CTX-M, TEM y SHV¹³ y otro para carbapenemasas tipo KPC, NDM, IMP, VIM, y OXA-48¹⁴. Ambos kits proporcionan resultados en 4 h y media.

Por último, cabe destacar que los métodos moleculares comerciales mencionados anteriormente presentan un escaso porcentaje de falsos negativos debido a que estos métodos no detectan todas las variantes alélicas de los genes que confieren resistencia a los antibióticos¹⁵.

Microarrays

Esta metodología se basa en la detección, mediante un análisis de imágenes, de la hibridación de una molécula diana a una sonda específica inmovilizada en un soporte sólido. Los *microarrays* detectan un gran número de genes de resistencia en un mismo ensayo dado que estas sondas, que normalmente son oligonucleótidos, están pegadas a una distancia muy corta. Se han comercializado varios *microarrays*, como el Check-MDR CT102, el Check-MD CT103 y el Check-MDR CT103 XL (Check points Health BV), que permiten detectar un gran número de genes que codifican diferentes β-lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas) a partir de colonias crecidas en placas de aislamiento. Estos 3 *microarrays* precisan de un primer paso de una PCR con una pareja de *primers* o cebadores universales marcados con biotina. A continuación, los amplicones son clasificados mediante hibridación con las sondas de oligonucleótidos. Finalmente, el software del fabricante detecta la hibridación utilizando el marcador de biotina y traduce los datos automáticamente, expresando los resultados en forma de presencia o ausencia de un gen. Estos *microarrays* precisan 8 h para la obtención de los resultados y presentan una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%¹⁶⁻¹⁸.

Métodos comerciales de antibiograma

Diferentes métodos comerciales de antibiograma utilizados en la rutina de trabajo del laboratorio de Microbiología Clínica se han aplicado directamente a partir de diferentes muestras clínicas. Las tiras comerciales con un gradiente de antibiótico se han utilizado para realizar un antibiograma directo a partir de muestras respiratorias. Para ello, la muestra se siembra en masiva en placas de agar Mueller Hinton y seguidamente se depositan

las tiras con antibiótico. Las placas son incubadas durante 24 h y, una vez crecidas las colonias, se obtiene la CMI. Boyer et al.¹⁹ obtuvieron un 88,9% de *agreements*, un 1,5% de *very major errors* y un 9,6% de *major errors*, y Bouza et al.²⁰ un 96,44% de *agreements*, un 1,98% de *major errors* y un 1,56% de *minor errors*.

Los métodos de microdilución en caldo semiautomatizados (MicroScan, VITEK2 y Phoenix) permiten obtener la identificación bacteriana y el antibiograma directamente a partir del frasco de hemocultivo crecido. Para la identificación bacteriana se requieren 3 h, con pobres resultados en bacterias grampositivas y aceptables en gramnegativas; para obtener el antibiograma se precisan 14 h, obteniendo buenos resultados en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas².

Técnicas inmunocromatográficas

Estas técnicas requieren unos 20 min para la obtención de resultados. Tienen un precio económico y no precisan ni de instrumentación ni de personal experto, por lo que pueden ser realizadas en cualquier laboratorio. En el caso de resistencias a antibióticos permiten detectar enzimas bacterianas que hidrolizan el antibiótico. El procedimiento consiste en suspender la bacteria en un diluyente. A continuación, unas gotas de este se depositan en un extremo de la tira (normalmente de nitrocelulosa) y las bacterias se desplazan por capilaridad hacia el otro extremo de la tira. Si en la posición test de la tira, donde está fijado un anticuerpo que reconoce el antígeno de la bacteria, aparece una banda coloreada significa que la prueba es positiva. Se han comercializado 2 inmunocromatografías que detectan carbapenemasas tipo OXA-48 y KPC (Coris BioConcept) con una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%²¹. Para la detección de la resistencia de *S. aureus* a metilina se ha comercializado el test BinaxNOW PBP2a (Alere). Este test muestra una sensibilidad y una especificidad prácticamente del 100%; además, también se aplicó a partir de frascos de hemocultivo crecidos, ofreciendo una sensibilidad del 95,4% y una especificidad prácticamente del 100%³.

Métodos colorimétricos

Para la detección de carbapenemasas se han comercializado varios kits, como el RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux) y Rapid CARB Screen® (Rosco Diagnostica A/S), que proporcionan resultados en unas 2 h con sensibilidad y especificidad muy próximas al 100%²². En estos test, la bacteria se incuba en presencia del antibiótico. Si la bacteria posee una carbapenemasa, el antibiótico se hidroliza y se produce un cambio en el pH del medio que se detecta mediante un cambio de color del indicador. Estos test no caracterizan el tipo de carbapenemasa. Sin embargo, al realizar un estudio fenotípico, pueden detectar cualquier variante de carbapenemasa que se esté expresando.

La resazurina, añadida a una suspensión bacteriana resistente al antibiótico con el que es incubada, es reducida por la actividad metabólica de la bacteria. Si la bacteria es sensible al antibiótico se detiene su metabolismo, con lo que la resazurina permanece en su forma oxidada. Dado que la forma reducida de resazurina es estable y de color rojo, y fotométricamente distinguible de la forma oxidada, que es de color azul, la viabilidad celular puede ser monitorizada mediante espectrofotometría, colorimetría o fluorimetría. Coban et al.^{23,24} determinaron en 6 h la sensibilidad de *S. aureus* a metilina y vancomicina. March et al.^{25,26} realizaron un antibiograma en 2 h para estafilococos, enterococos y enterobacterias. Sin embargo, el inconveniente de la resazurina es que no es metabolizada por los bacilos gramnegativos no fermentadores. Otro método colorimétrico consiste en la medición de la actividad de la enzima bacteriana nitrato reductasa. Cuando la bacteria es incubada en

presencia de iones NO_3^- y antibiótico, si la bacteria es resistente al antibiótico se van a generar iones NO_2^- que, con los reactivos de Gries, originan un compuesto de color rojo. Con este método se ha determinado en unas 6 h la sensibilidad de *S. aureus* a meticilina y vancomicina^{23,24}. Estos 2 métodos colorimétricos también han sido aplicados en micobacterias, obteniendo el antibiograma en un tiempo de 7 a 14 días²⁷. En todos los casos la correlación obtenida con los métodos de referencia ha sido cercana al 100%.

Métodos de imagen

A partir de frascos de hemocultivo crecidos el equipo ACCELERATE pheno™ SYSTEM (Accelerate Diagnostics) proporciona, en una hora, la identificación de 10 especies y 6 géneros bacterianos mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Para llevar a cabo el antibiograma directo se monitoriza, mediante la toma de imágenes, el crecimiento bacteriano de una cepa incubada en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico. De este modo, este equipo informa, en 5 h, la CMI y los fenotipos de resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomina en enterococos y de inducción de resistencia a clindamicina por eritromicina en estafilococos. Dependiendo del patógeno estudiado, la sensibilidad obtenida concuerda entre un 92% y un 100% con la obtenida mediante microdilución en caldo²⁸.

Nefelometría

La nefelometría es una técnica que mide la intensidad de radiación dispersa que se genera cuando un haz de luz atraviesa una suspensión de partículas. Dado que la dispersión de luz es proporcional a la concentración de partículas, esta técnica instrumental permite la cuantificación de microorganismos². El equipo Alfred 60 (Alifax) lleva a cabo un cribado de muestras de orina para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario. Para ello, una alícuota de orina es inoculada en un tubo con medio líquido de enriquecimiento y el crecimiento bacteriano es monitorizado durante 3 h mediante nefelometría. Con este equipo, monitorizando el crecimiento bacteriano en tubos comercializados que contenían medio líquido de enriquecimiento y antibiótico junto con una alícuota de la muestra, se ha realizado un antibiograma en 5 h directamente a partir de orinas y frascos de hemocultivo^{29,30}.

Espectrometría de masas MALDI-TOF

El sistema MALDI-TOF proporciona, mediante un análisis de proteínas, la identificación de bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos filamentosos en minutos². En cuanto al antibiograma rápido, el sistema MALDI-TOF predice en menos de 3 h si las bacterias producen enzimas que hidrolizan los antibióticos, como por ejemplo carbapenemasas y BLEE. Para ello, los microorganismos son incubados durante un tiempo con el antibiótico. Se realiza una centrifugación y el sobrenadante obtenido se analiza mediante MALDI-TOF. Si el microorganismo posee la enzima que degrada el antibiótico se observará la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la rotura del antibiótico. En caso de que la bacteria no hidrolice el antibiótico únicamente se observará el pico correspondiente al antibiótico. Esta metodología ha proporcionado sensibilidades prácticamente del 100%, tanto a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento³¹, como a partir de frascos de hemocultivo crecidos de pacientes³². También es posible predecir la resistencia a cloranfenicol y clindamicina mediante la detección de la metilación del ARNr 16S llevada a cabo por metiltransferasas³³. Por otra parte, se ha observado que tanto las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina como las resistentes

proporcionan unos picos de identificación específicos; de esta forma, a partir de una base de datos, normalmente elaborada en el propio laboratorio, es posible diferenciar, en unos minutos, entre cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a meticilina a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento³⁴. De la misma manera, el sistema MALDI-TOF también discrimina entre cepas de enterococo sensibles y resistentes a vancomicina³⁵. También es posible estudiar la sensibilidad a los antibióticos mediante la incubación de microorganismos en presencia de antibiótico en un medio con moléculas marcadas con isótopos. Si el microorganismo es resistente, este incorporará las moléculas marcadas que podrán ser detectadas mediante MALDI-TOF³⁶. Jung et al.³⁷ desarrollaron un antibiograma basado en un análisis semicuantitativo. Incubaron en un medio líquido una alícuota del frasco de hemocultivo crecido, tanto en presencia como en ausencia de antibiótico, siendo esta última el grupo control. A partir de los sedimentos obtuvieron los espectros de masas y calcularon la intensidad relativa de los picos y el área bajo la curva (AUC). Para la interpretación del antibiograma, consideraron que una cepa era resistente al antibiótico si esta, al ser incubada con el antibiótico, proporcionaba una intensidad de picos y AUC similares a los del grupo control. Por contra, consideraron que una cepa era sensible al antibiótico si esta, al ser incubada con antibiótico, proporcionaba una intensidad de picos y AUC menores que los del grupo control. De este modo obtuvieron un antibiograma a partir del frasco de hemocultivo crecido en 4 h con un 2% de discrepancias con respecto a la sensibilidad obtenida mediante E-test.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica basada en la formación de un flujo de partículas (generalmente células) ordenadas en fila con una intensidad de 500-4.000 partículas/segundo. Gracias a este alineamiento, la técnica permite medir simultáneamente múltiples características de una sola célula de tal forma que es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto. Además, utilizando diversos fluorocromos se pueden estudiar diversos parámetros bacterianos (potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, integridad de la membrana celular y concentración microbiana) que aportan información acerca de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos².

Shrestha et al.³⁸ lograron diferenciar, mediante histogramas en los que se representó la luz dispersa en un ángulo de 90 grados (SSC) frente a la señal de fluorescencia, entre cepas de *S. aureus* resistentes y sensibles a meticilina tras una incubación de 4 h en presencia del antibiótico. El citómetro de flujo Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation) es un equipo empleado en los laboratorios de Microbiología para llevar a cabo un cribado de orinas mediante el recuento de bacterias. Este equipo ha sido utilizado para obtener 2 antibiogramas mediante la comparación de los recuentos obtenidos a partir de cepas incubadas en medio líquido con antibióticos con los recuentos de las mismas cepas incubadas sin antibiótico (grupo control). Se consideró que una cepa era resistente al antibiótico si esta, al ser incubada con el antibiótico, proporcionaba un recuento microbiano muy similar al del grupo control. Por el contrario, se consideró que una cepa era sensible al antibiótico si esta, al ser incubada con el antibiótico, proporcionaba un recuento microbiano menor que el del grupo control. Broeren et al.³⁹ calcularon la CMI de amoxicilina, gentamicina y piperacilina en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. En 4 h obtuvieron un antibiograma que se correlacionó en un 100% con el obtenido mediante los sistemas VITEK2, E-test y macrodilución en caldo. March et al.⁴⁰ realizaron un antibiograma a partir de 100 frascos de hemocultivo crecidos y obtuvieron, en tan solo 2 h, una concordancia del 98% con respecto a

la sensibilidad obtenida mediante los métodos comerciales E-test, MicroScan y VITEK2. Por otra parte, Faria-Ramos et al.⁴¹, a partir de bacterias incubadas en presencia de ceftazidima y cefotaxima con y sin ácido clavulánico, y utilizando el fluorocromo DiBAC₄(3), que solo penetra en las bacterias inviables, lograron discriminar, en menos de 3 h, entre cepas productoras y no productoras de BLEE. Gauthier et al.⁴² realizaron un antibiograma mediante citometría de flujo a partir de orina. Usaron 2 fluorocromos, el DiBAC₄(3) y el yoduro de propidio, que también penetra únicamente en bacterias no viables. Analizaron 114 muestras de orina y, realizando mediciones de la señal fluorescente tras una incubación de 2 h de las alícuotas de orina en presencia de diferentes antibióticos, obtuvieron un 2% de discrepancias con respecto a la sensibilidad obtenida mediante microdilución en caldo.

En levaduras, mediante el uso de yoduro de propidio, es posible obtener un antifungigrama en 6 h^{43,44}. En micobacterias, Pina-Vaz et al.⁴⁵ determinaron la sensibilidad de *M. tuberculosis* a estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol. Después de 3 días de incubación en presencia del antituberculoso en el sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson), los microorganismos se tiñeron con el fluorocromo SYTO 16, que solo penetra en los microorganismos con alteración de la membrana celular. Comparando la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida a partir de estos microorganismos con la obtenida a partir de microorganismos incubados durante el mismo tiempo sin la presencia del antituberculoso, pudieron diferenciar entre cepas sensibles, intermedias o resistentes, obteniendo unos resultados que mostraron una excelente concordancia con los obtenidos mediante una incubación de unas 3 semanas en el sistema BACTEC MGIT 960. Kirk et al.⁴⁶ determinaron la sensibilidad de *M. tuberculosis* estudiando la capacidad de la micobacteria para hidrolizar, mediante esterasas, el sustrato diacetato de fluoresceína que pasa a fluoresceína, compuesto que emite fluorescencia cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada. Si la micobacteria es sensible al antituberculoso, la capacidad hidrolítica de la micobacteria disminuye y, por lo tanto, la señal de fluorescencia detectada también disminuye. Comparando la señal de fluorescencia y la luz dispersa a 90 grados obtenidas mediante citometría de flujo a partir de micobacterias sin contacto con el antituberculoso con las señales obtenidas a partir de micobacterias con una incubación de 24 h con isonizida, etambutol y rifampicina obtuvieron concordancias del 95, del 92 y del 83%, respectivamente, con respecto al antibiograma obtenido mediante el método de las proporciones.

Quimioluminiscencia y bioluminiscencia

La quimioluminiscencia es un proceso de emisión de luz que ocurre en ciertas reacciones químicas cuando las moléculas excitadas vuelven al estado fundamental. Para la obtención de luz solo se requiere la adición de menadiona al cultivo del microorganismo. La membrana bacteriana es permeable a esta molécula. Una vez la menadiona se encuentra en el interior de los microorganismos, esta es reducida y se generan diversos compuestos que difunden al medio extracelular donde, al autooxidarse, se emiten fotones de luz². La viabilidad de los microorganismos se establece comparando la señal quimioluminiscente de cepas incubadas con antibióticos con la de las mismas cepas incubadas sin antibióticos⁴⁷⁻⁵⁰. Si la cepa es sensible al antibiótico, esta proporcionará, al ser incubada con antibiótico, una señal mucho menor que la del cultivo sin antibiótico; si es resistente, las señales obtenidas a partir de los cultivos incubados en presencia y ausencia de antibiótico serán muy similares. La quimioluminiscencia proporciona, con una incubación de unas 4 h, CMI que concuerdan entre un 88% y un 100% con las CMI obtenidas mediante macrodilución o microdilución en caldo^{47,48,50}. También permite, en un tiempo de 8 h, detectar cepas de *S. aureus*

intermedias y heterorresistentes a vancomicina⁴⁹. Finalmente, en micobacterias se ha observado que es posible determinar la sensibilidad mediante quimioluminiscencia en 4 días⁵¹.

La bioluminiscencia es una forma de quimioluminiscencia que aparece como consecuencia de una reacción química que tiene lugar en algunos organismos vivos, como por ejemplo las luciérnagas². Los trabajos realizados sobre antibiograma se fundamentan en la medida de los niveles de ATP bacteriano de origen intracelular, extracelular o total, comparando la señal bioluminiscente obtenida a partir de microorganismos incubados sin la presencia de antibiótico (grupo control) con la señal obtenida a partir de los mismos microorganismos incubados en presencia de antibiótico^{52,53}. Con respecto al grupo control, si se mide el ATP intracelular, las cepas sensibles al antibiótico estudiado proporcionarán una disminución de la señal de bioluminiscencia⁵⁴; si se mide el ATP extracelular las cepas sensibles producirán un aumento de la señal⁵⁵, y si se mide el ATP total las cepas sensibles proporcionarán una disminución de la señal de ATP^{52,53,56}. En cambio, si el microorganismo es resistente al antibiótico las medidas del grupo control serán prácticamente iguales que las obtenidas a partir de las cepas incubadas con antibiótico. Con esta metodología es posible obtener un antibiograma fiable en tan solo 2 h⁵⁶. Además, se han publicado varios trabajos que hacen referencia a antibiogramas obtenidos mediante bioluminiscencia a partir de muestra directa. Ivancic et al.⁵⁷ realizaron un antibiograma a partir de orina comparando la señal de ATP obtenida a partir de una alícuota de orina incubada sin antibiótico con la señal de ATP de otra alícuota de la misma orina incubada con antibiótico. De este modo, lograron, en 2 h, un 91% de concordancia con la CMI obtenida a partir de la colonia. Dong y Zhao⁵⁸ desarrollaron un simulador de microfluidos con anticuerpos inmovilizados mediante el cual se obtiene, a partir de orina, la identificación de 13 especies bacterias y el antibiograma en 6 h. En el caso de levaduras y micobacterias, la bioluminiscencia proporciona un antibiograma fiable en 6 h y 7 días, respectivamente^{59,60}.

Microfluidos

Los avances en nanotecnología han posibilitado que el antibiograma se realice en plataformas o chips que llevan a cabo, utilizando pequeños volúmenes de trabajo, múltiples ensayos que aportan información acerca de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, como por ejemplo rotura celular, cultivo bacteriano e hibridación y amplificación de ácidos nucleicos, entre otros. Tang et al.⁶¹ desarrollaron una plataforma con la que, midiendo los cambios de pH que ocurren como consecuencia de la acumulación de productos metabólicos, es posible detectar el crecimiento bacteriano en 2 h. Mach et al.⁶² realizaron un antibiograma directamente a partir de muestras de orina utilizando un sistema de microfluidos que incorpora un sensor electroquímico para la cuantificación del ARN ribosómico 16S. Este grupo obtuvo, en 3 h y media, un 94% de concordancia con respecto a la sensibilidad obtenida mediante microdilución en caldo.

Métodos de lisis bacteriana

Otra metodología para la determinación de la sensibilidad consiste en la detección de la lisis bacteriana. Para ello, la bacteria es incubada en presencia del antibiótico a la concentración deseada; seguidamente la bacteria se inmoviliza en un microgel de agarosa y es expuesta a una solución de lisis que produce la liberación del ADN. Posteriormente, la preparación es incubada con el fluorocromo SYBR Gold y mediante observación al microscopio de fluorescencia es posible estudiar la integridad del ADN. Esta metodología proporciona un antibiograma en menos de 2 h⁶³.

A modo de conclusión podemos señalar que las metodologías descritas en esta revisión permiten acortar, respecto a los métodos habituales, el tiempo necesario para determinar la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos. Para la interpretación del antibiograma es indispensable conocer la especie bacteriana que se está estudiando. En este sentido, la identificación rápida proporcionada por el sistema MALDI-TOF permite la implementación de las metodologías que realizan un antibiograma rápido. Sin embargo, para determinar si estas técnicas proporcionan una sensibilidad y una especificidad aceptables para la práctica clínica, es necesario ampliar el número de cepas bacterianas y antibióticos estudiados. Dados los importantes beneficios que se derivan de proporcionar un resultado rápido de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (aumento de la supervivencia, reducción de gastos y retraso de la selección de cepas bacterianas resistentes), se puede afirmar que el antibiograma en Microbiología Clínica, lejos de estar definitivamente establecido, es un campo en continuo avance.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Food and Drug Administration (FDA). Guidance on Review Criteria for Assessment of Antimicrobial Susceptibility Devices. 1991 [consultado 15 Nov 2016]. Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/000109gd.pdf>
- March Rosselló GA, Bratos Pérez MA. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;**34**:61–8.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med.* 2013;**33**:651–84.
- Ledeboer NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavnagolo R, Carroll KC, Granato P, et al. Identification of gram-negative bacteria and genetic resistance determinants from positive blood culture broths by use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based molecular assay. *J Clin Microbiol.* 2015;**53**:2460–72.
- Dubouix-Bourandy A, de Ladoucette A, Pietri V, Mehdi N, Benzaquen D, Guinand R, et al. Direct detection of *Staphylococcus* osteoarticular infections by use of Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011;**49**:4225–30.
- Agrawal M, Bajaj A, Bhatia V, Dutt S. Comparative study of GeneXpert with ZN stain and culture in samples of suspected pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res.* 2016;**10**:DC09–12.
- Hrabak J, Chudackova E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;**20**:839–53.
- Spanu T, Fiori B, d'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (blaKPC). *J Clin Microbiol.* 2012;**50**:2783–5.
- Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2015;**70**:1338–42.
- Hinic V, Ziegler J, Straub C, Goldenberger D, Frei R. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) detection directly from urine samples with the rapid isothermal amplification-based eazyplex(R) SuperBug CRE assay: Proof of concept. *J Microbiol Methods.* 2015;**119**:203–5.
- Bloemberg GV, Polsfuss S, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Evaluation of the AID ESBL line probe assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and KPC carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2014;**69**:85–90.
- Oviano M, Torres I, Gonzalez M, Bou G. Evaluation of a novel procedure for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) using the LightMix® modular carbapenemase kits. *J Antimicrob Chemother.* 2016;**71**:3420–3.
- Willemsen I, Hille L, Vrolijk A, Bergmans A, Kluytmans J. Evaluation of a commercial real-time PCR for the detection of extended spectrum beta-lactamase genes. *J Med Microbiol.* 2014;**63**:540–3.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Probe ligation and real-time detection of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;**76**:502–5.
- Anandan S, Damodaran S, Gopi R, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. Rapid screening for carbapenem resistant organisms: Current results and future approaches. *J Clin Diagn Res.* 2015;**9**:DM01–3.
- Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluitt AC, Leverstein-van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol.* 2012;**61**:809–12.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;**67**:1865–9.
- Bogaerts P, Cuzon G, Evrard S, Hoebeke M, Naas T, Glupczynski Y. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum beta-lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;**48**:189–93.
- Boyer A, Medrano J, Mzali F, Balick-Weber CC, Bessède E, Picard W, et al. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;**73**:107–10.
- Bouza E, Torres MV, Radice C, Cercenado E, de Diego R, Sánchez-Carrillo C, et al. Direct E-test (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2007;**44**:382–7.
- Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, Leclipteux T, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016;**71**:1217–22.
- Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2015;**70**:3014–22.
- Coban AY. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J Clin Microbiol.* 2012;**50**:2191–3.
- Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC, Cetinkaya E, Bilgin K, Darka O, et al. Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2006;**44**:580–2.
- March-Rosselló GA, Gutiérrez-Rodríguez MP, Simarro-Grande M, Orduña-Domingo A, Bratos-Pérez MA. A two-hour procedure for determining the susceptibility of enterococci and staphylococci to antibiotics by a colorimetric method. *Rev Esp Quimioter.* 2015;**28**:247–55.
- March GA, Gutiérrez MP, Simarro M, Orduña A, Bratos MA. Antibiograma rápido en enterobacterias mediante un método colorimétrico. Comunicación 605. XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) [consultado 15 Nov 2016]. Disponible en: <http://seimc.org/contenidos/congresosyeventos/seimcanteriores/seimc-EIMC-2015.pdf>
- Dixit P, Singh U, Sharma P, Jain A. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of *M. tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2012;**88**:122–6.
- Chantell C. Multiplexed automated digital microscopy for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria and yeast directly from clinical samples. *Clin Microbiol NewsL.* 2015;**37**:161–7.
- Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. *J Chemother.* 2006;**18**:12–9.
- Rondinelli V, Giglio S, Masciari R. New method for rapid Susceptibility Testing on blood culture with HB&L system: Preliminary data. *Microbiologia Medica.* 2010;**25**:238–43.
- Lasserre C, de Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al. Efficient detection of carbapenemase activity in enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol.* 2015;**53**:2163–71.
- Oviano M, Fernandez B, Fernandez A, Barba MJ, Mourino C, Bou G. Rapid detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014;**20**:1146–57.
- Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* 2009;**37**:5420–31.
- Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;**74**:5487–91.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;**50**:2918–31.
- Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, Feldman AB. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;**24**:1194–201.
- Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a semi-quantitative MALDI-TOF MS method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2016;**54**:2820–4.
- Shrestha NK, Scalera NM, Wilson DA, Procop GW. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by flow cytometry after brief antibiotic exposure. *J Clin Microbiol.* 2011;**49**:2116–20.
- Broeren MA, Maas Y, Retera E, Arents NL. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect.* 2013;**19**:286–91.
- March GA, Garcia-Loygorri MC, Simarro M, Gutiérrez MP, Orduña A, Bratos MA. A new approach to determine the susceptibility of bacteria to antibiotics directly from positive blood culture bottles in two hours. *J Microbiol Methods.* 2015;**109**:49–55.

41. Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, Santos-Antunes J, Rodrigues AG, Cantón R, et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E8–15.
42. Gauthier C, St-Pierre Y, Villemur R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *J Med Microbiol.* 2002;51:192–200.
43. Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2752–8.
44. Benaducci T, Matsumoto MT, Sardi JC, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. A flow cytometry method for testing the susceptibility of *Cryptococcus* spp. to amphotericin B. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32:159–63.
45. Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. *J Med Microbiol.* 2005;54:77–81.
46. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1568–73.
47. Manome I, Ikedo M, Saito Y, Ishii KK, Kaku M. Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2003;41:279–84.
48. Nagasawa Z, Manome I, Nagayama A. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Chemother.* 2004;10:220–6.
49. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, Hiramatsu K. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. *J Microbiol Methods.* 2007;70:434–41.
50. Yamashoji S, Takeda M. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for the viability of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Microbiol Immunol.* 2001;45:737–41.
51. Yamashoji S. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for viability of *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol.* 2002;46:571–3.
52. Wheat PF, Hastings JG, Spencer RC. Rapid antibiotic susceptibility tests on Enterobacteriaceae by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1988;25:95–9.
53. Wheat PF, Spencer RC, Hastings JG. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1989;29:277–82.
54. Thore A, Nilsson L, Hojer H, Ansehn S, Brote L. Effects of ampicillin on intracellular levels of adenosine triphosphate in bacterial cultures related to antibiotic susceptibility. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1977;85:161–6.
55. Barton AP. A rapid bioluminescent method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies. *J Antimicrob Chemother.* 1985;15:61–7.
56. March Rossello GA, Garcia-Loygorri Jordan de Urries MC, Gutierrez Rodriguez MP, Simarro Grande M, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. A two-hour antibiotic susceptibility test by ATP-bioluminescence. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:334–9.
57. Ivancic V, Mastali M, Percy N, Gornbein J, Babbitt JT, Li Y, et al. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1213–9.
58. Dong T, Zhao X. Rapid identification and susceptibility testing of uropathogenic microbes via immunosorbent ATP-bioluminescence assay on a microfluidic simulator for antibiotic therapy. *Anal Chem.* 2015;87:2410–8.
59. Kretschmar M, Nichterlein T, Kuntz P, Hof H. Rapid detection of susceptibility to fluconazole in *Candida* species by a bioluminescence assay of intracellular ATP. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996;25:117–21.
60. Limb DI, Wheat PF, Spencer RC, Harris GS, Rayner AB, Watt B. Comparison of techniques for antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *J Clin Pathol.* 1993;46:403–7.
61. Tang Y, Zhen L, Liu J, Wu J. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem.* 2013;85:2787–94.
62. Mach KE, Mohan R, Baron EJ, Shih MC, Gau V, Wong PK, et al. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples. *J Urol.* 2011;185:148–53.
63. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Bou G, Fernandez MC, Fernandez JL. A rapid in situ procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. *BMC Microbiol.* 2011;11:191.