

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>



INTERPRETACION DE LOS ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Dra. Elizabeth Palavecino Rosales
Profesor Auxiliar (Asociado)
UDA Laboratorios Clínicos
Pontificia Universidad Católica de Chile

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana o antibiogramas son métodos in vitro que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores (Tabla 1) que influyen la interacción de agentes antimicrobianos y microorganismos en un determinado paciente. La metodología usada para realizar el estudio de susceptibilidad toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder in vivo a un determinado antibiótico.

Tabla 1
FACTORES QUE INFLUENCIAN LA CORRELACION DE LOS RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA Y LA RESPUESTA CLINICA

- Factores del agente antimicrobiano
 - Farmacocinética
 - Unión a proteínas del plasma
 - Vías de administración
 - Acción bacteriostática o bactericida
 - Concentración en sitio de infección
- Factores del huésped
 - Enfermedad de base
 - Estado inmunológico
 - Formación de absceso
 - Presencia de cuerpo extraño
 - Función renal y hepática
 - Cumplimiento del tratamiento
- Factores del microorganismo
 - Virulencia
 - Alta concentración de organismos
 - Infección mixta
 - Desarrollo de resistencia durante el tratamiento

Factores que influyen en la respuesta al tratamiento antibiótico

Existen factores propios del agente antimicrobiano, como son absorción, distribución, metabolismo, eliminación, unión a proteínas plasmáticas y otros parámetros farmacocinéticos los cuales pueden influenciar la respuesta del paciente.

La concentración del antibiótico en el sitio de la infección es otro factor importante a considerar en la elección de un antibiótico. Por ejemplo, cefalotina no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que una meningitis causada por E.coli susceptible a cefalotina in vitro, no responderá a una terapia con este antibiótico. En cambio, una infección urinaria causada por una cepa de . coli resistente a cefalotina podría responder bien, ya que este antibiótico es concentrado en la orina.

Además de la propia virulencia del germen, el número de organismos presentes en el sitio de la infección ("efecto del inóculo") puede ser un factor muy importante. La concentración de organismos usados para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (CFU)/ml. Un aumento en el número de organismos en el sitio de infección puede variar significativamente la respuesta de un antibiótico, por lo que pueden ser necesarias concentraciones mayores de éste para inhibirlo.

Por último, y quizás los más importantes, son los factores propios del huésped. En un paciente inmunocomprometido, el efecto de la infección, unido a su enfermedad de base, puede resultar en falla de la terapia aunque el germen sea susceptible al antibiótico usado. Además, pacientes hospitalizados por largo tiempo tienen un riesgo más alto de contraer una infección sobreimpuesta a la infección original, la que puede ser causada por gérmenes generalmente más resistentes. En estos pacientes, por lo tanto, es necesario evaluar nuevamente el germen causal y repetir el estudio de susceptibilidad.

Para que exista una buena correlación entre los resultados de laboratorio y la respuesta clínica, es muy importante obtener una muestra que sea representativa del proceso infeccioso, por ejemplo si el organismo aislado es un contaminante del sitio de la infección en vez del organismo causal, la respuesta clínica puede ser independiente de los resultados obtenidos in vitro. Por lo tanto, es de extrema importancia una apropiada y cuidadosa obtención de la muestra, especialmente si la infección se encuentra en un área normalmente colonizada por bacterias, ya que en estos casos la interpretación del cultivo bacteriológico es más difícil.

Hasta ahora hemos revisado varios de los factores que pueden influenciar la respuesta clínica a un tratamiento antibiótico para una determinada infección. Si consideramos estas variables, el estudio de susceptibilidad antimicrobiana sigue siendo una ayuda importante en la elección de una apropiada terapia antimicrobiana. Se puede predecir una buena respuesta al tratamiento si sabemos que el germen es susceptible al antibiótico indicado y una falla terapéutica puede ser esperada si el germen es resistente.

Indicaciones para el estudio de suceptibilidad antimicrobiana

Debido a que los microorganismos tienen susceptibilidad variable a los agentes antimicrobianos, es necesario tener una herramienta que permita determinar la susceptibilidad del microorganismo causante de la infección.

Cada vez son menos los organismos que tienen susceptibilidad predecible, por lo que debemos hacer estudio de susceptibilidad en la mayoría de los microorganismos aislados. Hasta hace unos años atrás, los laboratorios de microbiología o realizaban estudios de susceptibilidad en *S. pneumoniae* o *S. pyogenes* porque se consideraban generalmente susceptibles a los antibióticos usados para tratar infecciones causadas por estos organismos.

Desafortunadamente, al igual que en el resto del mundo, en nuestro país han sido aisladas cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y *S. pyogenes* resistentes a eritromicina.

La indicación primaria para el estudio de susceptibilidad es determinar el antibiótico más apropiado para iniciar la terapia en un paciente con un proceso infeccioso. En la mayoría de los casos, cuando el paciente comienza su enfermedad se indica un antibiótico de amplio espectro (o una combinación de antibióticos) hasta obtener resultados acerca de la identificación del germen causal de la infección. Posteriormente, cuando los resultados del antibiograma están disponibles, puede indicarse un antibiótico más específico.

Métodos de estudio de susceptibilidad antimicrobiana

La Tabla 2 muestra los métodos para realizar estudios de susceptibilidad antimicrobiana más frecuentemente usados, los que describiremos brevemente.

| Tabla 2 | | |
|---|-------------------|------------------|
| MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA | | |
| Método | Categorías | CIM ug/ml |
| Difusión en agar (discos) | S, I, R | No |
| Dilución en agar | S, I, R | Sí |
| Dilución en caldo | S, I, R | Sí |
| Métodos automatizados | S, I, R | Sí |
| E-test | S, I, R | Sí |
| Abreviaciones: S, susceptible; I, Intermedio; R, resistente; CIM, concentración inhibitoria mínima. | | |

Difusión en agar. Este método, que es el más frecuentemente usado, es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer. En este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto

determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a las tablas publicadas por el National Committee for Clinical Laboratories Standards. Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas, las categorías se correlacionan muy bien con los resultados de los otros métodos.

Dilución en agar. Es considerado el método de referencia. En este método, placas conteniendo una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 horas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el antibiótico. Si una cepa de *S. aureus* crece en una placa que contiene una concentración de oxalina de 0,06 ug/ml pero no crece en una placa con una concentración de oxalina 0,12 ug/ml, significa que la CIM de oxalina que se requiere para inhibir a ese organismo es 0,12 ug/ml.

Dilución en caldo. En este caso, tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución) contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en agar.

E-test. Este método ha sido descrito más recientemente y representa una sofisticada combinación de los métodos descritos anteriormente. El E-test es más simple que otros métodos para obtener una CIM. Utiliza una tira de plástico que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico que van desde 0,016 ug/ml hasta 256 ug/ml. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa por 16 a 18 horas, se forma un área de inhibición de forma elíptica, en la cual la concentración inhibitoria mínima puede ser leída directamente (ver Figura 1). Este es el método de elección para hacer estudios de susceptibilidad en gérmenes problemáticos o con requerimientos especiales, como por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y gérmenes anaeróbicos.

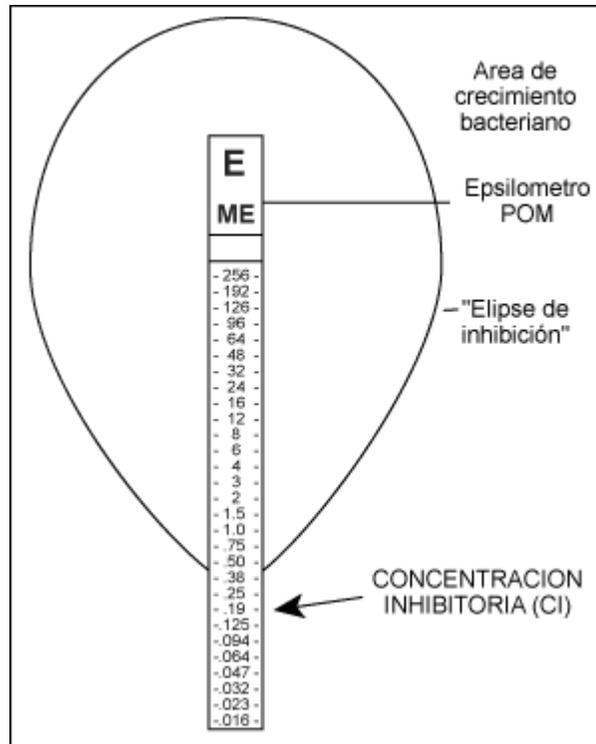


Figura 1

Representación esquemática del método del E-test. La flecha indica la zona donde se lee la Concentración Inhibitoria Mínima (Reproducida con la autorización de AB Biodisk, Solna, Suecia)

Métodos automatizados. En este momento existen varios sistemas que ofrecen diferentes niveles de automatización para el estudio de susceptibilidad. Utilizan una medición turbidimétrica o fluorométrica para detectar crecimiento bacteriano en un medio líquido. La mayoría de ellos emplea el método de microdilución y períodos de incubación menores que los habituales. Estos métodos son bastante confiables para el estudio de enterobacterias y otros gérmenes de crecimiento rápido, pero generalmente no son los adecuados para los de crecimiento lento o con requerimientos especiales.

Interpretación del antibiograma

Definiciones

Susceptible. Significa que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

Sensibilidad intermedia. Esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder pobremente a la terapia. Esta categoría, además, implica que ese antibiótico puede ser usado si la infección está localizada en sitios donde el fármaco es

fisiológicamente concentrado (por ejemplo las quinolonas en vías urinarias), o cuando pueden ser usadas altas dosis (ejemplo penicilina)....

Resistente. Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico.

Puntos de corte

El punto de corte se refiere a la CIM (si se ha usado un método de dilución) o el diámetro de inhibición (si se ha usado difusión por disco) con los cuales un organismo puede ser clasificado como S, I o R. Estos puntos han sido determinados de acuerdo a estudios microbiológicos que incluyen información sobre la distribución de los diámetros de inhibición a las CIM para un determinado antibiótico en variadas poblaciones bacterianas. El factor más importante para definir las categorías es la concentración que alcanza un antibiótico en el plasma. Obviamente, un organismo no puede ser definido como susceptible si las concentraciones que se necesitan para inhibir este organismo son mayores que aquellas que alcanzadas en el suero. En la Tabla 3 se muestran ejemplos de interpretación.

| Tabla 3 | | | | | |
|--|--------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------|
| EJEMPLOS DE INTERPRETACION DE CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA | | | | | |
| Cepa | Sitio | Ampicilina CIM (ug/ml) | Dosis y vía administración | Peak conc. (ug/l) | Interpretación |
| E.coli | Sangre | 8 | 1 gEV c/6h | Sangre, 40-60 | S |
| E.coli | Orina | 16 | 0,5 g oral c/6h | Orina, 250-500 | I* |
| E.coli | Herida | 16 | 0,5 g oral c/6h 1 gEV c/6h | Sangre, 2-4 Sangre 40-60 | I** |
| E.coli | LCR | 32 | 1 gEV c/6h | LCR, 8-36*** | R |
| <p>* Cepas aisladas de orina pueden ser consideradas susceptibles ya que el antibiótico es concentrado en orina en niveles sobre la CIM. ** La dosis puede ser aumentada o se puede cambiar la vía de administración para obtener niveles de antibiótico que sobrepasen la CIM. *** En meninges inflamadas</p> | | | | | |

Cuando el laboratorio informa que un organismo es susceptible, se debe a que se ha hecho una interpretación basada en las concentraciones que el antibiótico correspondiente alcanza en el suero. Como regla general la concentración alcanzada en el plasma (y en el sitio de infección) debe ser por

lo menos 2 a 4 veces más alta que la concentración inhibitoria mínima para que el antibiótico sea efectivo clínicamente.

En la Tabla 4 se muestra un ejemplo del informe habitual de un antibiograma realizado en el Laboratorio de Microbiología del Hospital de la Universidad Católica. El método utilizado es dilución en agar y los resultados son expresados como S, I, R. Además se informa la CIM en ug/ml a varios agentes antimicrobianos. En este ejemplo, el S.aureus es resistente a penicilina (R8) ya que la concentración mínima necesaria para inhibirlo es 8 ug/ml, lo cual está por encima del punto de corte para ser considerado susceptible ($S < 0.12$ ug/ml). Este mismo S.aureus es susceptible a cefazolina (S1), lo cual significa que se necesita 1 ug/ml de cefazolina para inhibirlo y eso se considera susceptible ($S = < 8$ ug/ml). El resto de los antibióticos son informados de acuerdo a sus propios puntos de corte. No todos los antibióticos analizados son informados, ya que si una cepa es susceptible a los antibióticos más comúnmente usados en este tipo de infecciones, el resto no se informa.

| Tabla 4 | | | |
|--|------|----------------|----|
| INFORME DE UN ANTIBIOGRAMA | | | |
| Antibiograma por concentración inhibitoria mínima (ug/ml): | | | |
| Cepa: S.aureus | | | |
| Cefazolina | S1 | Oxalina | S1 |
| Clindamicina | S.25 | Penicilina | R8 |
| Eritromicina | S25 | Ciprofloxacina | S1 |

Además, existen casos en los cuales sabemos que no existe una buena correlación entre los resultados in vitro y la eficacia clínica. Por ejemplo, los S.aureus. resistentes a meticilina deben ser considerados resistentes a todos los agentes beta-lactámicos a pesar que pueden aparecer susceptibles por los métodos in vitro.

Métodos adicionales para determinar suceptibilidad microbiana

Algunos de los métodos que se mencionarán a continuación, como la determinación de producción de beta-lactamasa,, son usados rutinariamente por los laboratorios, ya que proporcionan valiosa información al clínico en corto tiempo. Otros son empleados sólo en laboratorios especializados.

Presencia de beta-lactamasa. Las beta-lactamasas son enzimas producidas por algunos microorganismo, capaces de hidrolizar penicilina y cefalosporinas. La detección de beta-lactamasas es muy importante en el caso de gérmenes como Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis y algunos gérmenes anaeróbicos. Si estos organismos producen beta-lactamasa, son resistentes a penicilina, ampicilina y amoxicilina; combinaciones de estos agentes con un inhibidor de beta lactamasa, como ácido clavulánico o sulbactam, pueden ser más apropiados en este caso.

Beta lactamasas de espectro extendido. En el ultimo tiempo, ha habido un aumento en el número de cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* y otros bacilos Gram negativos que producen beta-lactamasas que no sólo hidrolizan a las penicilinas, sino que además hidrolizan cefalosporinas de tercera generación. Ceftazidima y aztreonam son más vulnerables a la acción de este tipo de beta-lactamasas, por lo que pueden servir como marcadores para determinar su presencia. Estas cepas son susceptibles al imipenem y pueden ser susceptibles a combinaciones de un beta-lactámico con un inhibidor de beta-lactamasas.

Actividad bactericida del suero. Este método es también llamado "Schlicter test" y fue desarrollado para medir la actividad antimicrobiana del suero de un paciente que está recibiendo antibióticos. La actividad bactericida es la dilución más alta del suero del paciente capaz de matar 99,9% del inóculo bacteriano original. El suero del paciente es diluido seriadamente e inoculado con el organismo aislado en ese mismo paciente. El resultado es expresado en un título que indica la dilución: a mayor título, mayor actividad antimicrobiana. En general se considera que un título de actividad bactericida del suero de 1:8 a 1:16 es terapéutico. Este método, que está indicado principalmente en pacientes con endocarditis, es difícil de realizar e interpretar, por lo que necesita aprobación previa del laboratorio antes de ser indicado.

Métodos genéticos de detección de resistencia

En este momento existen varios métodos basados en la biología molecular que pueden ser usados para detectar resistencia específica a varios antimicrobianos, pero su uso de rutina no está indicado. Estos métodos son principalmente usados con fines epidemiológicos, para monitorear resistencia a antibióticos. Por ejemplo, estos métodos han sido fundamentales para entender los mecanismos de resistencia a meticilina en *S.aureus*, lo cual permitió modificar las técnicas de detección usadas en el laboratorio, y también han ayudado a documentar la diseminación de enterococos resistentes a vancomicina en Estados Unidos. En el futuro, ellos pueden ser muy importantes para determinar resistencia antimicrobiana en *Micobacterium tuberculosis*. Actualmente existen métodos que detectan resistencia a rifampicina en este patógeno, lo que tiene gran importancia clínica, ya que estas cepas son generalmente multiresistentes, las cuales, afortunadamente, no son frecuentes en nuestro país, pero sí representan un grave problema en otros lugares.

A pesar de los múltiples factores que intervienen en el estudio de susceptibilidad antimicrobiana, los resultados tienen buena correlación con la respuesta clínica, ya que esta correlación es verdadera e independiente del método de estudio empleado. Existen, sin embargo, situaciones en las cuales deben usarse métodos especiales: los laboratorios deben estar preparados para ejecutar estos nuevos métodos y los clínicos para interpretar esta nueva tecnología en beneficio de sus pacientes.

Referencias escogidas

1. Appelbaum PC., Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. Clin, Infect.Dis.15:77-83.1992.

2. Fasola E.L., S. Bajaksouzian, P.C. Appelbaum, and M.R. Jacobs. Variation in erythromycin and clindamycin susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* with four test methods. *Antimicrob Chemother.* 41:129-134. 1997.
3. Fasola E.L., C.E. Fasching, and L.R. Peterson. Molecular correlation between in vitro and in vivo activity of Beta-lactam and Beta-lactamase inhibitor combinations against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Lab. Clin. Med.* 125:200-211, 1995.
4. Isenberg H.D. Antimicrobial susceptibility testing: a critical evaluation. *J. Antimicrob. Chemother.* 22(Suppl.A):73-76, 1988.
5. McCabe W.R., and T.L. Treadwell. In vitro susceptibility tests: correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients, p.925-937. In V. Lorain (ed), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1985.
6. Palavecino-Fasola E.L., S. Bajaksouzian and M.R. Jacobs. *Streptococcus pyogenes* resistente a macrólidos, pero sensible a clindamicina: Un hallazgo común en diferentes países. Libro de Resúmenes Congreso Chileno de Infectología, 25. 1996.
7. Peterson R. and C.J. Shaholtzer. Test for bactericidal effects of antimicrobial agents: theoretical performance and clinical relevance, *Clin. Microbiol. Rev.* 5:420-432. 1992.