Recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards para el estudio de susceptibilidad en microorganismos fastidiosos y en microorganismos que presentan mecanismos de resistencia difíciles de detectar

ELIZABETH PALAVECINO R.

RECOMMENDATIONS OF THE NATIONAL COMMITTEE FOR
CLINICAL LABORATORY STANDARDS FOR *IN VITRO*
SUSCEPTIBILITY EVALUATION OF FASTIDIOUS MICROORGANISMS
AND SPECIES WITH HARD TO DETECT RESISTANCE MECHANISMS

Key words: *Fastidious organisms, Susceptibility testing, Haemophilus, Neisseria, Listeria, Bacillus.*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el personal del laboratorio de microbiología enfrenta diariamente la tarea de detectar en forma eficiente una gran variedad de microorganismos que presentan resistencia a los agentes antimicrobianos. En mi opinión hay tres grupos de patógenos que representan un desafío para los microbiólogos: el primero está formado por aquellos microorganismos con mecanismos difíciles de detectar, como los SAMR y los bacilos Gram negativos productores de BLEE; estos patógenos serán discutidos en artículos separados. El segundo grupo incluye aquellos microorganismos que son fastidiosos y requieren medios especiales, no sólo para desarrollarse, sino que también para detectar la resistencia en forma adecuada, a este grupo pertenecen *Haemophilus* spp y *Neisserias* spp. El tercer grupo está represen-

tado por aquellos microorganismos que se aíslan infrecuentemente, pero que son capaces de causar infecciones en determinados pacientes y para los cuales no existen puntos de corte ni métodos de susceptibilidad estandarizados; en este último grupo podemos incluir a *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp, miembros del grupo HACEK, etc.

En esta revisión, trataremos de resumir lo descrito en la literatura y presentar recomendaciones basadas en nuestra propia experiencia.

Estudio de susceptibilidad en microorganismos fastidiosos

***Haemophilus* spp.** Este microorganismo causa una gran variedad de infecciones en adultos y en niños, tales como otitis media aguda, sinusitis, bacteremia y meningitis. El uso de

* Department of Pathology University Hospitals of Cleveland, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA.

una vacuna conjugada en contra de *Haemophilus influenzae* tipo b, ha eliminado prácticamente el riesgo de infecciones graves causadas por cepas capsuladas del tipo b, pero las infecciones producidas por cepas no capsuladas de *H. influenzae* siguen siendo un problema importante.

La resistencia a ampicilina en *Haemophilus* spp es causada por la producción de una β lactamasa del tipo TEM. Aunque han sido descritas cepas resistentes a ampicilina que son β lactamasa negativa, estas cepas son muy inusuales y no representan en este momento un problema clínico; en ellas la resistencia es mediada por modificaciones en las PBPs.

El número de cepas de *H. influenzae* productoras de β lactamasa ha ido creciendo en los últimos años; en E.U.A. su prevalencia aumentó de 16% en 1986 a 41,6% en 1997.¹ En un estudio realizado por nosotros en Chile durante el año 1998, encontramos que 20% de los *Haemophilus influenzae* eran productores de β lactamasa.²

Recomendaciones para el estudio de susceptibilidad *in vitro* en *Haemophilus*. En la mayoría de los casos basta con realizar la prueba de la β lactamasa. Con este test rápido se puede predecir la susceptibilidad a ampicilina y a amoxicilina ya que si la cepa es β lactamasa negativa, será susceptible a ambos antimicrobianos y si la β lactamasa es positiva, la cepa será resistente. Sin embargo, las cepas que son β lactamasa positiva son susceptibles a las com-

binaciones de un β lactámico con un inhibidor de β lactamasa como por ejemplo amoxicilina/ácido clavulánico. Por lo tanto, no es necesario realizar la susceptibilidad a estos agentes, muchos estudios han demostrado su eficacia en estas cepas.

En la actualidad el NCCLS recomienda realizar estudio de susceptibilidad rutinario sólo en aquellos *Haemophilus* spp aislados de pacientes con meningitis. En este caso, sólo ampicilina, una cefalosporina de tercera generación, cloranfenicol y meropenem deben ser informado por el laboratorio (Tabla 1).³ El estudio de susceptibilidad de *Haemophilus* a estos agentes antimicrobianos puede hacerse mediante difusión por disco, microdilución en caldo o por epsilometría (E-test®) usando el medio denominado HTM (Medio para el Test de *Haemophilus*). Consulte la Tabla 2 para las recomendaciones específicas de cada método. El HTM incluye hematina, nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) y extracto de levadura y debe ser cuidadosamente preparado usando un control de calidad muy estricto con las cepas recomendadas ya que pequeñas diferencias de pH pueden causar una gran diferencia en la CIM.

Las cepas de *Haemophilus* resistentes a las combinaciones de un β lactámico con un inhibidor de β lactamasa o que son resistentes a cefalosporinas de tercera generación o a las fluoroquinolonas, son extremadamente infrecuentes. Si se aísla una cepa con resistencia a

Tabla 1. Puntos de corte (en μ g/ml) para los antimicrobianos que se pueden informar en *Haemophilus influenzae* aislado de LCR

Agente antimicrobiano	Interpretación			Comentarios
	S	I	R	
Ampicilina	< 1	2	> 4	Correlacione con prueba de β lactamasa Las cepas susceptibles a ampicilina son también susceptibles a amoxicilina
Cefotaxima	< 2	-	-	No se han descrito cepas resistentes Si una cepa aparece como resistente, envíe a laboratorio de referencia para confirmar
Ceftriaxona	< 2	-	-	
Meropenem	< 0,5	-	-	No se han descrito cepas resistentes
Cloranfenicol	< 2	4	> 8	

cualquiera de estos agentes, debe ser enviada a un laboratorio de referencia para su confirmación. Aunque el NCCLS ha definido puntos de corte para las cefalosporinas orales que pueden ser usadas empíricamente en infecciones respiratorias,³ no es recomendado el estudio rutinario de susceptibilidad a estos agentes. La actividad de las diferentes cefalosporinas sobre *H. influenzae* varía bastante dependiendo de la cefalosporina. El estudio de susceptibilidad en cefalosporinas orales se puede realizar por razones epidemiológicas para elegir la terapia empírica más adecuada, pero no es de mucho valor en casos individuales. Además, como explicaremos más abajo, estos puntos de corte no siempre reflejan la susceptibilidad *in vivo* de *H. influenzae* a los agentes orales.

Interpretación de resultados de acuerdo a los puntos de corte PK/PD. Generalmente el NCCLS establece los puntos de corte de acuerdo a la distribución de la CIM de las cepas de una especie y de acuerdo a la concen-

tración que ese antibacteriano alcanza en el suero. Sin embargo, la concentración de un determinado antimicrobiano puede variar sustancialmente dependiendo del sitio de infección. Es por esto que muchos médicos clínicos prefieren saber el punto de corte de acuerdo al parámetro de PK/PD (*pharmacokinetics/pharmacodynamics*) ya que estos puntos de corte tienen mayor correlación con la respuesta clínica, especialmente para los agentes orales. La actividad de β lactámicos y macrólidos depende del porcentaje de tiempo en que la concentración del antimicrobiano permanece por sobre la CIM del microorganismo causante de la infección. Estudios realizados en animales y en humanos han demostrado que si la concentración de un β lactámico en el sitio de infección es mantenida por sobre la CIM durante al menos 40% del intervalo de tiempo entre una dosis y la siguiente, se alcanza una buena respuesta clínica al tratamiento.^{1,4}

En el caso de las cefalosporinas orales para

Table 2. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en microorganismos fastidiosos

Microorganismo	Método	Medio de cultivo	Incubación	Comentarios
<i>Haemophilus</i> spp	Dilución en caldo	Caldo de HTM	Aire ambiental (20 a 24 horas)	La prueba de β lactamasa predice susceptibilidad a las penicilinas
	Difusión por discos	Agar de HTM	5% de CO ₂ (16 a 18 horas)	No se recomienda el estudio rutinario de cefalosporinas orales
	E test®	Agar de HTM	5% CO ₂ (16 a 18 horas)	En cepas de LCR informe ampicilina, cefalosporina de tercera generación, cloranfenicol y meropenem solamente
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Dilución en agar	Agar de GC con suplementos	5% CO ₂ (20 a 24 horas)	Para el estudio de carbapenems y ácido clavulánico se requiere un medio sin cisteína
	Difusión por discos	Agar de GC con suplementos	5% CO ₂ (20 a 24 horas)	Cisteína no interfiere en la lectura de discos.
<i>N. meningitidis</i>	Microdilución en caldo	CAMHB* + LHB (2-5% v/v)	5% CO ₂ (24 horas)	Cepas resistentes son extremadamente infrecuentes
	Dilución en agar	Agar de M-H con 5% sangre (24 horas)	5% CO ₂	Puntos de corte no disponibles

Cepas de control: Para el estudio de *Haemophilus* spp. use las cepas *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766. Si está estudiando inhibidores de β lactamasa debe incluir la cepa de control *E. coli* ATCC 35218.

Para el estudio de *N. gonorrhoeae* use cepa de *N. gonorrhoeae* ATCC 49266.

* CAMHB: caldo de Muller-Hinton con ajuste de cationes.

Tabla 3. Actividad de las cefalosporinas orales en *H. influenzae* de acuerdo a los puntos de corte del NCCLS y a los puntos de corte de los parámetros de farmacocinética y farmacodinamia (PK/PD)

Agente antimicrobiano	Punto de corte del NCCLS (µg/ml)*	Punto de corte de PK/PD (µg/ml)*	% Susceptible por PK/PD (Basado en referencia 4)
Amoxicilina/ ac. clavulánico	< 4/2	2	97
Azitromicina	< 4	0,12	0
Cefaclor	< 8	0,5	2
Cefuroxima	< 4	1	80
Cefixima	< 1	1	100
Cefpodoxima	< 2	0,5	100
Cefprozil	< 8	1	18
Ciprofloxacina	< 1	1	100
Levofloxacina	< 2	2	100

* El punto de corte usado en esta tabla es para la categoría de susceptible.

el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por *H. influenzae*, la interpretación de los resultados de susceptibilidad varía enormemente dependiendo si se usan los puntos de corte del NCCLS o los puntos de corte de PK/PD. Los puntos de corte del NCCLS están por sobre la concentración que la mayoría de los fármacos orales alcanza en el sitio de la infección. Cefixima y cefpodoxima son muy activas para *H. influenzae*, en cambio cefaclor y cefprozil no alcanzan las concentraciones necesarias para inhibir este patógeno en infecciones respiratorias. (Tabla 3).

Para resumir, podemos decir que aunque en la actualidad existen puntos de corte para una gran cantidad de antimicrobianos orales y parenterales, en la práctica basta con realizar el test de β lactamasa en aquellos *Haemophilus* spp aislados de infecciones respiratorias. El resultado de esta prueba sirve para predecir la susceptibilidad de estos patógenos a penicilinas, habitualmente usadas para tratar este tipo de infecciones. El estudio de susceptibilidad puede ser realizado en cepas β lactamasas positivas aisladas de sitios estériles. Además, es muy importante tener en cuenta los parámetros de PK/PD al momento de decidir la terapia empírica para infecciones respiratorias causadas por *H. influenzae*.

***Neisseria gonorrhoeae*:** Debido a que la mayoría de las infecciones producidas por *N.*

gonorrhoeae son tratadas empíricamente, el estudio de susceptibilidad puede realizarse sólo para evaluar la eficacia de estos agentes por motivos epidemiológicos o puede realizarse en casos de fallas al tratamiento de primera línea. Muchos laboratorios en E.U.A. usan métodos de biología molecular para detectar simultáneamente *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* y por lo tanto el microorganismo no siempre está disponible para el estudio de susceptibilidad.

En la actualidad en E.U.A. no se recomienda hacer la prueba de β lactamasa en *N. gonorrhoeae* ya que penicilina prácticamente no se usa como terapia en infecciones por este patógeno, pero en otros lugares la prueba de β lactamasa podría tener todavía algún valor. Sí es importante realizar estudios de susceptibilidad cada cierto tiempo para monitorear la resistencia y guiar la terapia empírica en una región determinada. El estudio de susceptibilidad en *N. gonorrhoeae* puede realizarse por dilución en agar o mediante difusión por disco. (Tabla 2). Se debe usar el medio de agar GC suplementado con las vitaminas y las coenzimas necesarias para el crecimiento de esta especie.³ Se recomienda un medio libre de cisteína para el estudio de susceptibilidad a imipenem y meropenem cuando se usa el método de dilución en agar. Sin embargo, la cisteína no interfiere en el estudio de estos fármacos cuando se usa difusión por disco.

***Neisseria meningitidis*.** En general, *N. meningitidis* se ha mantenido muy susceptible a penicilina. Aunque han sido reportadas en la literatura cepas de *N. meningitidis* productoras de β lactamasa, estas cepas son todavía, y afortunadamente, muy poco frecuente de encontrar. Por lo tanto, en la actualidad no se recomienda el estudio de susceptibilidad rutinario en esta especie. En casos de fallas al tratamiento, el NCCLS ha descrito los métodos que se pueden usar si el estudio de susceptibilidad es necesario (Tabla 2). Sin embargo, los puntos de cortes están todavía en estudio. En nuestra experiencia y en la experiencia de otros investigadores, la mayoría de las cepas de *N. meningitidis* presentan una CIM a penicilina $< 0,03 \mu\text{g/ml}$. En algunos casos se han aislado cepas que tiene una CIM de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$, estas cepas han sido denominadas “relativamente resistentes”; pareciera que el mecanismo de resistencia esta mediado por alteraciones en las PBPs. En general las CIMs de *N. meningitidis* a las cefalosporinas de tercera generación son también muy bajas ($< 0,015 \mu\text{g/ml}$).

Recomendaciones para el estudio de susceptibilidad en microorganismos poco habituales

El estudio de susceptibilidad en determinadas especies es bastante problemático debido a que presentan mecanismos de resistencia intrínsecos difíciles de detectar por los medios habituales y para los cuales muchas veces no existen puntos de corte. En muchas ocasiones además, diferentes métodos pueden dar resultados discrepantes lo cual hace aún más difícil la interpretación de los resultados. En la mayoría de los casos la terapia es empírica y está determinada por estudios epidemiológicos. Revisaremos aquí algunos de estos patógenos.

***Listeria* spp.** Debido a que las infecciones producidas por *Listeria* spp. responden bien al tratamiento con ampicilina o penicilina, no se recomienda realizar el estudio de susceptibilidad en forma rutinaria, pero si se necesitara en casos determinados hacer este estudio, el NCCLS recomienda actualmente usar el método

de microdilución en caldo usando medio de Mueller-Hinton con sangre hemolizada de caballo (2-5% v/v) y suplementado con calcio y magnesio. Las bandejas de microdilución deben ser incubadas a 35° C durante 16 a 20 horas en aire ambiental. Se recomienda informar sólo ampicilina y penicilina. Las cefalosporinas no deben ser informadas ya que no son efectivas clínicamente, de manera independiente del resultado del estudio de susceptibilidad. Los puntos de corte son los siguientes: CIM a ampicilina o penicilina $< 2 \mu\text{g/ml}$ es susceptible. Como hasta el momento no existen cepas resistentes, sólo se han definido los puntos de corte para susceptibilidad.

***Bacillus* spp.** En la actualidad no existe mucho consenso sobre cuándo se debe realizar el estudio de susceptibilidad en *Bacillus* spp. y tampoco se tiene suficiente información sobre si los resultados *in vitro* tendrán algún significado clínico. Pero como en el último tiempo se ha visto que *Bacillus* spp es capaz de causar infecciones severas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y además han habido publicaciones referente a brotes de diarrea causados por *Bacillus cereus*, los médicos clínicos se han mostrado interesados en saber en forma más objetiva la susceptibilidad de *Bacillus* spp.

Los hechos dramáticos acaecidos en E.U.A. y los casos documentados de ántrax, han estimulado sin duda, la preocupación por el estudio de susceptibilidad en *Bacillus*. En el caso de *Bacillus anthracis*, el estudio de susceptibilidad se ha hecho con el método de microdilución en caldo usando medio de Mueller-Hinton e incubación a 35° C durante 16 a 18 horas. El estudio de susceptibilidad en este patógeno se debe realizar en un gabinete de seguridad de nivel 3 y por lo tanto, sólo puede ser realizado por aquellos centros de referencia. Para la interpretación de los resultados de penicilina se pueden usar los puntos de corte de *S. aureus*. La prueba de β lactamasa es un buen indicador de la susceptibilidad a penicilina en *Bacillus* spp.

***Corynebacterium* spp.** En esta revisión hemos tratado de dar a conocer los métodos

recomendados y los puntos de corte a usar en algunos microorganismos que habitualmente no son sometido a estudio de susceptibilidad. En el caso de *Corynebacterium* spp no existen métodos estandarizados ni puntos de corte, lo que indudablemente agudiza el problema de interpretación de los resultados.

En el último tiempo se han descrito numerosas nuevas especies de *Corynebacterium*. La identificación de especies en la rutina diaria del laboratorio no es de mucho valor clínico. En este momento, existen varios productos comerciales que son capaces de identificar la mayoría de las especies de *Corynebacterium* y además diferenciar este género de otros microorganismos como por ejemplo *Dermatobacter hominis*, *Microbacterium*, *Turicella otitidis*, *Cellulomonas*, *Brevibacterium*, y *Arthrobacter*.

El estudio de susceptibilidad en *Corynebacterium* spp. se puede realizar en cepas aisladas de sitios estériles y que son seguramente causantes de la infección (en muchos casos estos microorganismos pueden ser sólo contaminantes). Los métodos que se pueden usar para estudiar la susceptibilidad de *Corynebacterium* son el test de dilución en agar y la epsilometría (E-test®) usando placas de Mueller-Hinton con 5% sangre. Las placas se deben incubar a 35^o C en aire ambiental durante 24 horas. La mayoría de los investigadores usa los puntos de corte de *S. aureus*. El NCCLS, como fuera mencionado arriba, no tiene hasta este momento métodos estandarizados ni puntos de corte para este género de microorganismos por lo

que las recomendaciones mencionadas aquí están basadas en publicaciones en este tema.

En resumen, podemos decir que en general, la profundidad del estudio de susceptibilidad realizado en los microorganismos fastidiosos o que presentan mecanismos difíciles de detectar, dependerá de la población de pacientes que un determinado laboratorio de microbiología tenga. En general, los estudios de susceptibilidad en estos microorganismos pueden ser realizados por razones epidemiológicas y en la mayoría de los casos serán realizados por laboratorios de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- PALAVECINO E L. The crisis of the resistant pathogens in respiratory tract infections-Use of pharmacodynamic principles. Am J Managed Care 2001; 7: S170-S177.
- 2.- LÓPEZ-VIDAL Y, PALAVECINO E L, ROSSI F and the Latin America Surveillance and Epidemiology Research (LASER) Group. Prevalence of Beta-lactamase production in *H. influenzae* isolated in Latin America in 1998-1999: Results of the LASER Study. Int J Antimicrob Agents. 2002. In press.
- 3.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelve informational supplement M102-S12. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.
- 4.- JACOBS M R, BAJAKSOUZIAN S, ZILLES A, LIN G, PANKUCH G, APPELBAUM P. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1901-8.

Correspondencia a:
Elizabeth Palavecino Rosales
E-mail: epalavecino@hotmail.com