

10

Streptococcus pneumoniae

OBJETIVO

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Describir una estrategia práctica para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (PSA) de *Streptococcus pneumoniae* aislados de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre y otras partes del cuerpo.
- Listar las condiciones de prueba, incluyendo la preparación del inóculo, medio de inoculación, duración y atmósfera de la incubación, recomendadas para difusión en disco y CIM de *S. pneumoniae*.
- Describir el uso apropiado de la prueba en disco de oxacilina para hacer la búsqueda (“screening”) de susceptibilidad a beta-lactámicos.
- Describir el fundamento para establecer puntos de corte separados para cefepime, cefotaxima y ceftriaxone para organismos aislados de sitios meníngeos y no meníngeos.
- Discutir una estrategia efectiva para reportar resultados de PSA en *S. pneumoniae*.

ANTECEDENTES

El *S. pneumoniae* es una de las principales causas de meningitis bacteriana en el mundo. La tasa de mortalidad es de aproximadamente el 25% con tasas más elevadas en pacientes no tratados. Con frecuencia ocurren secuelas neurológicas en niños/as si se demora el tratamiento. El *S. pneumoniae* es también la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad y es responsable de hasta el 50% de otitis media en niños/as en los Estados Unidos..

Cuando los pacientes acuden a su médico con neumonía neumocócica, no siempre es posible aislar el organismo de secreciones respiratorias o sangre. Es probable que esto se deba a la capacidad que tiene este organismo para producir su lisis espontánea. Los cultivos de sangre son positivos en alrededor del 25% de los casos de neumonía neumocócica. La interpretación de cultivos de esputo se complica porque entre el 5 y el 20% de los adultos saludables son portadores de *S. pneumoniae* en las vías respiratorias altas.

En los últimos años la resistencia del *S. pneumoniae* a antibióticos se ha incrementado. En 1967, se identificó por primera vez la disminución de susceptibilidad a la penicilina y en la actualidad se encuentra en todo el mundo. Muchas cepas resistentes a penicilina también son resistentes a macrólidos, tetraciclinas y trimetoprima/sulfametoxazol. La resistencia a las fluoroquinolonas es aún poco común pero está en aumento.

Una vacuna de polisacárido polivalente está disponible para los serotipos de neumococo que más comúnmente causan enfermedad invasiva. La vacunación está recomendada en mayores de 65 años de edad y en aquellos que tienen la función inmunológica alterada. Una nueva vacuna conjugada está disponible para uso en menores de 2 años de edad.

CASO DE ESTUDIO A

Una mujer de 52 años de edad busca atención médica después de una probable afección gripal que había persistido por varios días. Presenta fiebre de 39,5° C intensos escalofríos, congestión significativa y dificultad para respirar. En la sala de emergencia se obtienen muestras de sangre para cultivo y de esputo para tinción de Gram, cultivo y pruebas de susceptibilidad. Una placa de tórax revela un infiltrado basal en el lado izquierdo. El médico interna a la paciente al hospital y le prescribe 1 g de ceftriaxone cada 24 horas. La paciente responde a la terapia antimicrobiana y es dada de alta después de 48 horas. Del cultivo de esputo se obtiene crecimiento significativo de *S. pneumoniae* y los cultivos de sangre también fueron positivos para *S. pneumoniae*.

El reporte de laboratorio para el aislamiento del cultivo de sangre del paciente está a continuación:

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: Sangre

Resultados: *Streptococcus pneumoniae*

	CIM µg/mL	Interpretación
Ceftriaxone (meningitis)	1	I*
Ceftriaxone (no meningitis)	1	S
Eritromicina	2	R
Levofloxacin	0,5	S
Penicilina	2	R
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	>4/76	R
Vancomicina	0,5	S

* Los pacientes con meningitis requieren terapia con dosis máxima de ceftriaxone.

¿Por qué hubo dos interpretaciones diferentes para ceftriaxone en el reporte final del cultivo de sangre? Al completar este capítulo el lector será capaz de responder a esta pregunta.

Resistencia a Beta-Lactámicos

Penicilinas.

El *S. pneumoniae* se vuelve resistente a la penicilina a través de alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) de la pared celular. Estas PBPs alteradas tienen disminuida la afinidad por los antibióticos beta-lactámicos. Puesto que los beta-lactámicos no se unen a sus sitios blanco (primordialmente PBP 2b), estos no inician la lisis celular.

Cefalosporinas de Espectro Extendido

Las alteraciones en la PBP 1a y la PBP 2x pueden resultar en resistencia a cefalosporinas de espectro extendido tales como cefepime, cefotaxima y ceftriaxone. En algunas regiones en los Estados Unidos la incidencia de la resistencia a estos medicamentos excede el 20%.

Como resultado del incremento en la resistencia de *S. pneumoniae* a los beta-lactámicos, la terapia inicial recomendada para meningitis neumocócica incluye una cefalosporina de espectro extendido más vancomicina. Si las tasas de resistencia en la región son altas se puede añadir rifampicina. Si el aislamiento es susceptible a cefalosporinas de espectro extendido, se puede discontinuar la vancomicina.

Resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas

La resistencia del *S. pneumoniae* a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas podría deberse a varios mecanismos.

- Producción de metilasa ribosómica
La síntesis de esta enzima es mediada por el gene *ermB* que confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas (eje. clindamicina) y agentes estreptogramina B. A esta resistencia se la conoce como MLS_B.
- Eflujo de macrólidos
Esta es mediada por el gene *mefA* y confiere resistencia a macrólidos. Esta resistencia se conoce como el fenotipo M (macrólido). Estos organismos se mantienen susceptibles a clindamicina.
- Mutaciones en los genes ribosómicos de ARN
Este mecanismo de resistencia es raro pero con frecuencia resulta en resistencia a macrólidos y estreptogramina. Se le conoce como el fenotipo MS.

Resistencia a Fluoroquinolonas

La resistencia a las nuevas fluoroquinolonas, como gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina, que tienen buena actividad en contra del *S. pneumoniae*, es todavía poco común (<3%) en los Estados Unidos pero es observada en más del 15% de los aislamientos en algunas partes del mundo. Las mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*, que contienen el código de enzimas involucradas en las fases de desenrollado y partición del ADN, resulta en una susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas. La resistencia de alto nivel ocurre con múltiples mutaciones en los genes *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*. La resistencia en los neumococos puede también estar mediada por mecanismos de eflujo.

Cambios en el MIC (μ/mL) de las fluoroquinolonas debido a la introducción de las mutaciones *parC* o *parC* y *gyrA* en *S. pneumoniae*.

	Mutación		
	Sin Mutación	<i>parC</i>	<i>parC</i> & <i>gyrA</i>
Ciprofloxacina*	1	8	64
Gatifloxacina	0,25 S	0,5 S	4 R
Levofloxacina	1 S	2 S	16 R
Moxifloxacina	0,12 S	0,5 S	4 R

* La NCCLS no tiene un criterio definido para esta interpretación.

Resistencia a Otros Tipos de Antibióticos

La resistencia a cloramfenicol, tetraciclinas y trimetoprima/sulfametoxazol también puede ocurrir y es más común en cepas resistentes a la penicilina. La resistencia a estos antibióticos es particularmente común en aislamientos pediátricos de los serotipos 6, 14, 19 y 23F. Algunas cepas resistentes a la penicilina que son susceptibles *in vitro* a cloramfenicol podrían sobrevivir *in vivo* restringiendo por tanto su uso en meningitis causada por cepas resistentes a la penicilina.

Estrategia de Prueba

Aislamientos asociados con meningitis:

Para *S. pneumoniae* aislados de pacientes con meningitis se debe realizar pruebas de CIM para penicilina y cefotaxima o ceftriaxone. La prueba de búsqueda (“screening”) de disco de oxacilina no debe realizarse ya que ésta tomaría un día adicional y podría retrasar innecesariamente el establecimiento de la terapia antimicrobiana apropiada.

Aislamientos asociados con infecciones no meníngeas:

Si la zona de inhibición alrededor de un disco de oxacilina de 1 µg es \leq 19 mm, se deben realizar pruebas de CIM para penicilina y cefotaxima o ceftriaxone. En general, las pruebas de CIM se deben realizar para antibióticos que no pueden ser probados confiablemente con la difusión por disco, eje. cefotaxima, ceftriaxone y otros beta-lactámicos. Si la zona de inhibición es $>$ 20 mm con el disco de oxacilina de 1 µg la cepa es considerada susceptible a los agentes beta-lactámicos.

Para otros agentes, eje. eritromicina y trimetoprima/sulfametoxazol, se pueden utilizar los métodos de difusión por disco o CIM. Note que estos agentes no se consideran apropiados para la terapia de meningitis y no deben ser reportados para infecciones meníngeas sin importar los resultados de susceptibilidad.

Métodos

El **método de difusión de disco** para *S. pneumoniae* se realiza utilizando agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero. La incubación es de 20-24 horas a 35°C en 5% de CO₂. El método de CIM en caldo se realiza usando el caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes conteniendo 2-5% de sangre lisada de caballo. La incubación es de 20-24 horas a 35°C en atmósfera de aire .

Notas para la preparación del inóculo:

El *S. pneumoniae* típicamente produce autolisinas (enzimas que inician la lisis de la pared celular) que conducen a una rápida reducción en el número de células viables en la fase de crecimiento logarítmica tardía y estacionaria temprana. Para evitar resultados susceptibles falsos por sub-inoculación del medio debido a autólisis, el inóculo debe ser preparado utilizando el método directo de inoculación. Se seleccionan colonias frescas de una placa de sangre de 20-24 horas y se suspenden en caldo o solución salina. La suspensión es inmediatamente estandarizada a una turbidez equivalente al 0,5 del estándar de McFarland. Para las pruebas de difusión por disco las placas son inmediatamente inoculadas con esta suspensión estandarizada. Para las pruebas de microdilución, la suspensión estandarizada es diluida para obtener a una concentración final de 5×10^5 CFU/mL en cada pocillo.

Sugerencia Técnica: Prepare la suspensión del inóculo justo antes de inocular el caldo de CIM o la placa de difusión por disco. No permita que el neumococo permanezca suspendido en medio líquido por más de unos pocos minutos.

Se necesita una **prueba alternativa de difusión en disco** para beta-lactámicos. Las pruebas estándar de difusión en disco no son confiables para neumococos cuando se prueban con beta-lactámicos, tales como penicilina y cefalosporinas, porque estos resultados no se correlacionan con los resultados de CIM. Sin embargo, se puede realizar una prueba alternativa usando un disco de oxacilina de 1- μ g para la búsqueda de resistencia a penicilina y beta-lactámicos. Un crecimiento bacteriano adecuado es cuando se obtiene desarrollo confluyente. No deben aparecer colonias aisladas. Las zonas de inhibición deben leerse del lado del agar usando luz reflejada. Las zonas de hemólisis no deben leerse. Una zona de oxacilina ≥ 20 mm indica susceptibilidad a la mayoría de los agentes beta-lactámicos. En contraste, diámetros de zona que son ≤ 19 mm indican una posible resistencia. En este caso, se deben realizar pruebas de CIM.

Las **pruebas de CIM** de neumococo deben realizarse en caldo Mueller-Hinton complementado con sangre de caballo lisada. Es importante que un adecuado crecimiento sea observado en el pocillo de control de crecimiento. La CIM es leída como la concentración más baja del agente que es capaz de inhibir el crecimiento visible. El *S. pneumoniae* mientras crece podría producir un ligero verdor del medio en los pocillos de microdilución. La presencia o ausencia de esta coloración verdusca no debe ser usada por sí sola para determinar el valor de la CIM.

Los *S. pneumoniae* susceptibles a penicilina también son susceptibles a los siguientes antibióticos β -lactámicos:

Amoxicilina	Cefepima	Ceftibuten
Amoxicilina-ácido clavulánico	Cefetamet	Ceftizoxima
Ampicilina	Cefixima	Ceftriaxona
Ampicilina-sulbactam	Cefotaxima	Cefuroxima
Cefaclor	Cefpodoxima	Imipenem
Cefdinir	Cefprozil	Loracarbef

Interpretación de Resultados

El Cuadro 2G del documento M100 del NCCLS debe ser usado para interpretar los resultados de las pruebas de difusión en disco y CIM en *S. pneumoniae*.

Vancomicina y linezolid

Ambos métodos solo tienen el punto de corte de susceptible para vancomicina y linezolid. Si con cualquier de estos antibióticos se obtienen resultados de no susceptible, la identificación del aislamiento y los resultados de susceptibilidad deben ser confirmados. Si los resultados son confirmados, el aislamiento debe ser conservado y enviado a un laboratorio de referencia que realice el método de referencia del NCCLS de microdilución en caldo.

Beta-lactámicos

Como se muestra en el siguiente cuadro, en la actualidad existen dos grupos de criterios de interpretación para las pruebas de CIM de cefotaxima, ceftriaxone y

Criterios de interpretación CIM ($\mu\text{g/mL}$) para *S. pneumoniae*

Agente Antimicrobiano	CIM ($\mu\text{g/mL}$) Estándar de Interpretación			Comentarios
	S	I	R	
Penicilina	$\leq 0,06$	0,12–1	≥ 2	La penicilina no debe ser usada como terapia en meningitis con aislamientos en las categorías I o R
Cefepime (meningitis)	$\leq 0,5$	1	≥ 2	Reporte solo interpretaciones para “no meningitis” e incluya la acotación “no meningitis” en el reporte. La cefepime no tiene una indicación aprobada de la FDA para meningitis.
Cefepime (no-meningitis)	≤ 1	2	≥ 4	
Cefotaxima (meningitis)	$\leq 0,5$	1	≥ 2	Para aislamientos de LCR, reporte solo la interpretación de “meningitis” porque estos pacientes requieren dosis máximas. Para otras localizaciones reporte ambas interpretaciones.
Cefotaxima (no-meningitis)	≤ 1	2	≥ 4	
Ceftriaxone (meningitis)	$\leq 0,5$	1	≥ 2	Reporte como se describe arriba para cefotaxima.
Ceftriaxone (no-meningitis)	≤ 1	2	≥ 4	

cefepime. Los límites originales para penicilina y cefalosporinas de espectro extendido se establecieron pensando en el tratamiento de meningitis y se basaron en los niveles alcanzables en líquido ceforraquídeo. Más tarde, datos clínicos y farmacocinéticos sugirieron que algunas infecciones neumocócicas no meníngeas, como la neumonía adquirida en la comunidad, pueden tratarse con cefalosporinas de espectro extendido aun cuando las CIMs fueron tan altas como $1 \mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, un segundo grupo de puntos de corte fue establecido para infecciones neumocócicas no meníngeas como se muestra en el siguiente cuadro.

Para aislamientos de pacientes con meningitis, se deben usar los límites originales ($\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ susceptible, $1 \mu\text{g/mL}$ intermedia, $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ resistente). Para aislamientos de infecciones no meníngeas, se deben usar los nuevos límites ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$ susceptible, $2 \mu\text{g/mL}$ intermedia, $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ resistente). Además, para aislamientos de LCR, reporte solo los resultados de agentes apropiados para tratar meningitis, tales como cefotaxima o ceftriaxone (límites para meningitis), meropenem, penicilina y vancomicina.

Los siguientes agentes antimicrobianos: cefalosporinas de primera y segunda generación, clindamicina, la mayoría de fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas, no deberían ser reportados para el tratamiento de meningitis a pesar de obtener resultados de susceptible en las pruebas de susceptibilidad, ya que clínicamente no son efectivos para esta patología.:

Para aislamientos que no son LCR (eje. especímenes respiratorios) también podrían ser reportados otros antibióticos, tales como clindamicina, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y trimetoprima/sulfametoxazol. Para aislamientos que no provienen de LCR, el resultado para cefotaxima y ceftriaxone debe ser reportado según ambas interpretaciones “meningitis” y “no-meningitis” ya que pacientes con meningitis neumocócica podrían tener *S. pneumoniae* en otras fuentes diferentes a LCR.

Control de Calidad

Consulte el Capítulo 6 de aseguramiento de calidad/control de calidad en este manual para obtener instrucciones específicas sobre los métodos de control de calidad para *S. pneumoniae*. La cepa de control de calidad recomendada por el NCCLS es *S. pneumoniae* ATCC 49619 con la cual la CIM de penicilina está en la categoría intermedia.

REVISIÓN

Hay muchos puntos importantes que hay que considerar al realizar pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana en *S. pneumoniae*.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M2 y M7) para obtener las instrucciones de las pruebas de *S. pneumoniae*. Usar el documento actualizado M100 del NCCLS para consultar los cuadros con los criterios de interpretación y los rangos de control de calidad.
 - Manejar a los *S. pneumoniae* cuidadosamente ya que estos tienden a la autólisis si se les deja en suspensión líquida por más de unos pocos minutos antes de inocular las placas de difusión por disco o los paneles de CIM.
 - Usar métodos de CIM para pruebas de beta-lactámicos tales como penicilina, cefotaxima y ceftriaxone. No existen criterios de interpretación de difusión por disco para estos agentes.
 - Reportar las interpretaciones tanto de meningitis como de infecciones no meníngeas para aislamientos de fuentes diferentes a LCR. Para aislamientos de LCR, reportar solo las interpretaciones para meningitis.
 - Leer cuidadosamente las instrucciones adjuntas antes de usar cualquier producto comercial. Algunos sistemas comerciales no son confiables para pruebas de *S. pneumoniae*.
-

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Cuál de los siguientes pares de agentes antimicrobianos y mecanismos de resistencia son correctos? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Levofloxacin/ mutación en parC
 - B. Eritromicina/ PBP alterada
 - C. Cefotaxima/ eflujo
 - D. Eritromicina y clindamicina/ metilasa ribosómica
2. ¿Cuáles de los siguientes perfiles de susceptibilidad están basados en mecanismos conocidos de resistencia en *S. pneumoniae*? Seleccione todas las opciones que apliquen.
3. Para el estudio de caso A: ¿Por qué hubo dos resultados diferentes para ceftriaxone en el reporte final del cultivo de sangre?
 - A. Una dosis baja de ceftriaxone puede ser usada para el tratamiento de infecciones meníngeas y los criterios separados de interpretación pueden ayudar a los médicos a determinar si una dosis baja sería apropiada.

Antimicrobianos	A	B	C	D
Ceftriaxone	S	R	R	S
Clindamicina	S	R	S	R
Eritromicina	S	R	S	S
Levofloxacina	R	S	S	S
Penicilina	S	R	S	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole	S	R	R	S
Vancomicina	S	R	S	S

- B. Las infecciones no meníngeas de *S. pneumoniae* (como la neumonía) causada por cepas para las cuales la CIM de ceftriaxone es 1 µg/mL pueden ser efectivamente tratadas con dosis rutinarias de ceftriaxone y son catalogadas como susceptibles.
- C. Es más importante detectar resistencia emergente en aislamientos de *S. pneumoniae* que causan meningitis que en aquellos asociados con otro tipo de infecciones. Por lo tanto, criterios de interpretación más conservadores deben ser aplicados a los aislamientos que causan meningitis.
4. ¿Cuál de los siguientes métodos podría resultar en crecimiento inadecuado al realizar la prueba de difusión por disco en *S. pneumoniae*? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Usando colonias frescas para la preparación del inóculo pero dejando que la suspensión permanezca a temperatura ambiente por dos horas antes de la inoculación de la placa de agar Mueller-Hinton.
- B. Usando la suspensión en fase logarítmica de organismos que crecieron en caldo Mueller-Hinton por dos horas a 35°C.
- C. Incubando la placa inoculada en aire ambiente por 20 horas.
5. ¿Cuáles de los siguientes métodos son aceptables para determinar susceptibilidad del *S. pneumoniae* a la penicilina? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Prueba CIM de ampicilina
- B. Prueba de disco de oxacilina
- C. Prueba CIM de penicilina
- D. Prueba de beta-lactamasa
6. Un aislamiento de *S. pneumoniae* analizado con un disco de oxacilina de 1 µg produce una zona de inhibición de 16 mm. ¿Cómo procedería?
- A. Reportar como resistente a oxacilina
- B. Reportar como resistente a penicilina
- C. Realizar pruebas de CIM con penicilina y cefotaxima o ceftriaxone
- D. Realizar prueba de CIM con oxacilina
7. Usted está trabajando en un pequeño hospital comunitario que realiza rutinariamente pruebas de difusión por disco y envía los aislamientos que requieren pruebas de CIM a un laboratorio de referencia. Un médico le pide que analice un aislamiento de *S. pneumoniae* para resistencia a cefotaxima, ya que los resultados de la búsqueda de oxacilina dieron 14 mm. No hay criterios de interpretación para difusión por disco y *S. pneumoniae*. ¿Qué debería hacer?

- A. Informar al médico que la prueba no se puede realizar.
- B. Enviar el aislamiento al laboratorio de referencia para que realice la prueba de CIM de cefotaxima
- C. Realizar una prueba de difusión por disco y usar los criterios de interpretación de cefotaxima que se presentan en el cuadro de Enterobacteriaceae.

Indique si las siguientes frases son Verdaderas o Falsas

- 8. En los Estados Unidos, los resultados de cefepime deben ser reportados para aislamientos de LCR.
- 9. La eritromicina no es reportada en aislamientos de LCR de *S. pneumoniae* porque ésta solo puede administrarse oralmente.
- 10. La prueba de difusión por disco de oxacilina es realizada en la mayoría de los laboratorios clínicos de los Estados Unidos para predecir la susceptibilidad a la penicilina en aislamientos de *S. pneumoniae*, antes que otras pruebas de susceptibilidad.
- 11. Una fluoroquinolona debe ser probada rutinariamente en aislamientos clínicos de *S. pneumoniae*.
- 12. Las interpretaciones para cefotaxima y ceftriaxone en meningitis deben ser reportadas para *S. pneumoniae* aislados de esputo, sangre y otros sitios.